

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

FERNANDA CORRÊA LEAL PENIDO

**PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA
PILOTO A PARTIR DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO
LÁCTICO E LEVEDURAS**

**Belo Horizonte
2019**

FERNANDA CORRÊA LEAL PENIDO

**PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA
PILOTO A PARTIR DE BACTÉRIAS DO ÁCIDO
LÁCTICO E LEVEDURAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

**Belo Horizonte
2019**

Dedico este trabalho ao Renato, aos meus pais e à minha irmã pelo amor e apoio incondicional, sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar coragem, paciência e sabedoria para concluir esta importante etapa em minha carreira acadêmica.

À Professora Doutora Inayara Cristina Alves Lacerda, pela orientação deste trabalho e pela parceria, comprometimento e dedicação durante o desenvolvimento da tese. Agradeço pela confiança, paciência e por todo o crescimento que obtive como sua aluna desde o mestrado.

Ao Professor Carlos Augusto Rosa, pela coorientação deste trabalho e pela contribuição para a publicação dos resultados obtidos.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Ana Luiza Freire, Profa. Dra. Beatriz Martins Borelli, Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira e Prof. Dra. Verônica Ortiz Alvarenga, pelo privilégio de tê-los contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, pelos ensinamentos e por continuarem contribuindo para a minha formação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos (PPGCA) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAFAR/UFMG), pela oportunidade de realizar este doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e da taxa de bancada, e ainda pelo financiamento do projeto através da Chamada Universal MCTI/CNPq – 014/2013.

À Secretaria do PPGCA, por toda a assistência na resolução de questões administrativas.

Aos amigos dos laboratórios de Microbiologia de Alimentos (MICROAL) e Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) do Departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG, por toda a contribuição durante o período do doutorado. Às funcionárias, Elaine e Ludmila, e

aos alunos, Beatriz, Carmen, Cosme, Flávia, Kellen, Luciana, Mariana, Mauro, Mayra, Michele, Murielle (em memória), Renata e Vanessa.

À Professora Denise, por toda a contribuição e ideias que foram essenciais para o engrandecimento deste trabalho.

Ao Dr. Gustavo, por todo o auxílio na realização das análises cromatográficas.

Às alunas de iniciação científica Yara, Fernanda e Carolina, por todo o auxílio, envolvimento e amizade durante estes anos de parceria.

Ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG por disponibilizar os materiais e equipamentos necessários à realização dos experimentos para a elaboração da presente tese. Aos integrantes desse laboratório, pela cooperação e momentos compartilhados.

Aos alunos Sávio e Gabriele, por toda a dedicação e auxílio na execução de testes complementares.

Aos meus pais e minha irmã, pelo amor incondicional, empenho na minha formação e incentivo de sempre. Ao meu pai, pelo suporte sem o qual não seria possível seguir em frente. Aos demais familiares, pelo carinho.

Ao meu marido Renato, por todo amor, compreensão, parceria e por sempre acreditar em mim.

À minha amiga Penha, pelos conselhos e pela fonte de inspiração.

À minha amiga Marina (Chica), por me escutar e por compartilhar das mesmas batalhas.

Aos meus amigos e familiares, pela companhia e apoio.

A todos que, de uma maneira ou outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar, mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Produziu-se polvilho azedo em escala piloto a partir do uso de culturas iniciadoras selecionadas visando a padronização do produto final. Os isolados selecionados foram *Lactobacillus plantarum* Lp3, que apresentou atividade antagonista e capacidade de acidificação, e *Pichia scutulata* Ps9, que apresentou atividade amilolítica. Culturas puras e mistas dos isolados selecionados e também fermento biológico seco instantâneo comercial foram testados na fermentação da fécula de mandioca como quatro culturas iniciadoras: *L. plantarum*, *L. plantarum* com *P. scutulata*, *L. plantarum* com fermento comercial e apenas fermento comercial. Observou-se que a acidez aumentou gradativamente durante a fermentação. As contagens de *L. plantarum* se mantiveram próximas a $7 \log_{10}$ UFC/mL, tanto em cultura pura quanto mista, e as contagens das leveduras reduziram ao longo do processo. A acidez total titulável foi maior para os polvilhos obtidos a partir da cultura pura de *L. plantarum* ($3,02 \pm 0,21\%$) e mista com *P. scutulata* ($3,06 \pm 0,44 \%$). Os produtos finais estavam de acordo com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos e foram considerados polvilhos azedos. Quando comparados à fécula de mandioca, os polvilhos obtidos com *L. plantarum* e *L. plantarum* com *P. scutulata* resultaram na redução da gordura saturada de 3,6% e 8,1%, respectivamente, e num aumento da gordura insaturada de aproximadamente 2,3 vezes, aumentando inclusive a proporção dos ácidos oleico, linoleico e linolênico. Comparados aos polvilhos comerciais, os polvilhos obtidos com as culturas iniciadoras apresentaram um maior teor de ácidos graxos insaturados. Ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éter, fenol e hidrocarbonetos estavam entre os compostos voláteis identificados nas amostras. O polvilho obtido com a cultura mista apresentou maior variedade e maior proporção de compostos voláteis do que a cultura pura e a fécula de mandioca, incluindo compostos que se caracterizam por conferir aroma aos alimentos como o ácido 4-hexil-2,5-di-hidro-2,5-dioxo-3-furanacético (2,84%) e o isovalerato de geranila (0,81%). Apesar da presença da levedura não ocasionar uma alteração significativa na acidez e no índice de expansão do produto final, auxiliou na produção de compostos aromáticos desejáveis contribuindo para o aroma característico de polvilho azedo. Desta forma, sugere-se que a cultura de *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* apresenta potencial para ser aplicada na produção industrial de polvilho azedo.

Palavras-chave: Fermentação. Culturas iniciadoras. Monitoramento molecular. Perfil de ácidos graxos. Compostos voláteis.

ABSTRACT

Sour cassava starch was produced in a pilot-scale fermentation process with selected starter cultures to standardize the final product. The selected isolates were *Lactobacillus plantarum* Lp3, which presented antagonistic and acidification activities, and *Pichia scutulata* Ps9, which showed amylolytic capacity. Single and mixed cultures of the selected isolates and also commercial baker's yeast were tested in the fermentation of cassava starch as four starter cultures: *L. plantarum*, *L. plantarum* with *P. scutulata*, *L. plantarum* with commercial baker's yeast and commercial baker's yeast. The acidity gradually increased during fermentation. The counts of *L. plantarum* remained close to $7 \log_{10}$ CFU/mL, in both single and mixed cultures, and the yeasts showed a decrease in their counts throughout the process. The total titratable acidity was higher for the sour cassava starches obtained with *L. plantarum* in a single culture (3.02 ± 0.21) and in association with *P. scutulata* (3.06 ± 0.44). The final products were in agreement with the physicochemical and microbiological parameters. When compared to the cassava starch, the sour cassava starches obtained with *L. plantarum* and *L. plantarum* with *P. scutulata* resulted in the reduction of saturated fat of 3.6% and 8.1%, respectively, and an increase of unsaturated fat of approximately 2.3 times, the proportion of oleic, linoleic and linolenic acids also increased. Compared to the commercial sweet and sour cassava starches, the sour cassava starches obtained with the starter cultures led to a higher content of unsaturated fatty acids. Acids, alcohols, aldehydes, ketones, esters, ether, phenol and hydrocarbons were among the volatile compounds identified in the samples. The sour cassava starch obtained with the mixed culture had a greater variety and greater proportion of volatile compounds than the cassava starch and the sour cassava starch obtained with the single culture. Among these volatile compounds, there were compounds which are characterized by imparting aroma to foods such as the 4-hexyl-2,5-dihydro-2,5-dioxo-3-furanacetic acid (2.84%) and the geranyl isovalerate (0.81%). Although the presence of the yeast did not cause a significant change in acidity nor the expansion capacity, it helped in the production of desirable aromatic compounds contributing to the characteristic aroma of sour cassava starch. Thus, it is suggested that *L. plantarum* in association with *P. scutulata* shows potential to be applied in the industrial production of sour cassava starch.

Keywords: Fermentation. Starter cultures. Molecular monitoring. Fatty acids profile. Volatile compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma do processamento de raízes de mandioca para a produção de polvilho doce e polvilho azedo.....	23
Figura 2 - Produção de polvilho azedo em escala piloto: Inóculos das culturas iniciadoras em erlenmeyers de 100 mL (A); Inóculos das culturas iniciadoras em erlenmeyers de 500 mL (B); Biorreatores (bacias de plástico) no qual foram realizadas as fermentações (C); Polvilho armazenado em frascos esterilizados (D).....	50
Figura 3 - Produtos de amplificação obtidos pela análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene <i>recA</i> . Canaletas: 1 e 7: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-6 e 8-10: <i>Lactobacillus plantarum</i>	62
Figura 4 - Dendrograma gerado após análise de agrupamento pela técnica de rep-PCR <i>fingerprinting</i> utilizando o iniciador (GTG) ₅ de linhagens de <i>Lactobacillus plantarum</i> isoladas do processo fermentativo de polvilho azedo.....	63
Figura 5 - Halos de inibição de <i>Lactobacillus plantarum</i> contra <i>Bacillus cereus</i> (A), <i>Escherichia coli</i> (B) e <i>Salmonella Typhimurium</i> (C) pelo método <i>spot-on-lawn</i>	64
Figura 6 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos isolados de <i>Lactobacillus plantarum</i> contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella Typhimurium</i> pelo método <i>spot-on-lawn</i>	64
Figura 7 - Halos de inibição de <i>Lactobacillus brevis</i> contra <i>Bacillus cereus</i> (A), <i>Escherichia coli</i> (B) e <i>Salmonella Typhimurium</i> (C) pelo método <i>spot-on-lawn</i>	65
Figura 8 - Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos isolados de <i>Lactobacillus brevis</i> contra <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella Typhimurium</i> pelo método <i>spot-on-lawn</i>	66
Figura 9 - Variação da Acidez Total Titulável (%) e do pH ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto com as culturas iniciadoras.....	74
Figura 10 - Variação da contagem (log ₁₀ UFC/g) ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto com as culturas iniciadoras.....	75
Figura 11 - Perfis de digestão de BAL isoladas da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4; 5-7; 8-10; 11-13; 14-16; 17-19: <i>Lactobacillus plantarum</i> (enzimas <i>MspI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i> , respectivamente).....	77
Figura 12 - Dendrograma obtido após análise de agrupamento pela técnica de rep-PCR <i>fingerprinting</i> de isolados da fermentação da fécula de mandioca em escala piloto para obtenção de polvilho azedo.....	78
Figura 13 - Perfis de PCR <i>fingerprinting</i> de leveduras isoladas da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-6 e 8-9: <i>Pichia scutulata</i> ; 10: controle negativo.....	79

Figura 14 - Perfis de DNA mitocondrial de leveduras isoladas da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1 e 14: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-13: leveduras isoladas do fermento comercial.....	79
Figura 15 - Variação da Acidez Total Titulável (%) e do Índice de expansão para os polvilhos obtidos em escala piloto com as diferentes culturas.....	81
Figura 16 - Aspecto dos biscoitos de polvilho antes (A) e depois (B) de assados a 220 °C por 20 minutos na análise de expansão da massa.....	82
Figura 17 - Perfil de ácidos graxos da fécula de mandioca.....	85
Figura 18 - Perfil de ácidos graxos do polvilho doce comercial.....	85
Figura 19 - Perfil de ácidos graxos do polvilho azedo comercial.....	86
Figura 20 - Perfil de ácidos graxos do polvilho obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i>	86
Figura 21 - Perfil de ácidos graxos do polvilho obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pichia scutulata</i>	87
Figura 22 - Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para a fécula de mandioca	90
Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho doce comercial.....	91
Figura 24 - Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho azedo comercial.....	91
Figura 25 - Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i>	92
Figura 26 - Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho obtido com <i>Lactobacillus plantarum</i> e <i>Pichia scutulata</i>	92

LISTA DE TABELAS

1	Acidez total titulável nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação produzida pelos isolados de <i>Lactobacillus plantarum</i>	69
2	Acidez total titulável nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação produzida pelos isolados de <i>Lactobacillus brevis</i>	69
3	Acidez total titulável nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação produzida pelos isolados de <i>Pichia scutulata</i>	70
4	Perfil de ácidos graxos em amostras de fécula de mandioca e polvilho após análise por cromatografia gasosa.....	84
5	Identificação e área do pico (%) de compostos voláteis em amostras de fécula de mandioca e polvilho após análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABAM	Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATT	Acidez total titulável
BAL	Bactéria(s) do ácido láctico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
CERAT	Centro de Raízes Tropicais
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i> (pirocarbonato de dietila)
DGGE	Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante
DNase	Desoxirribonuclease
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
ESALQ	Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”
FAFAR	Faculdade de Farmácia
FAME	<i>Fatty Acid Methyl Ester</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of The United Nations</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
GYMP	<i>Glucose - Yeast extract - Malt extract - Phosphate</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
LAMIB	Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MRS	de Man, Rogosa e Sharpe
mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
MYP	<i>Mannitol - Egg Yolk - Polymyxin</i>
NEPA	Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação

NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
NMP	Número Mais Provável
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PPGCA	Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RAPD	DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
<i>rep</i> -PCR	<i>Repetitive element sequence-based PCR</i>
RFLP	Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição
RNase	Ribonuclease
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
SDS	Sódio Dodecil Sulfato
TBE	Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidades formadoras de colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
YM	<i>Yeast extract - Malt extract</i>
YPD	<i>Yeast extract - Peptone - Dextrose</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 MANDIOCA.....	18
3.2 FÉCULA DE MANDIOCA, POLVILHO DOCE E POLVILHO AZEDO.....	19
3.3 O POLVILHO AZEDO E OS PRODUTOS SEM GLÚTEN.....	21
3.4 PROCESSAMENTO DO POLVILHO DOCE E DO POLVILHO AZEDO.....	22
3.4.1 Efeito das condições de processamento nas características do polvilho.....	24
3.5 MICROBIOTA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA.....	26
3.5.1 Bactérias do Ácido Láctico.....	27
3.5.1.1 Atividade antagonista das bactérias do ácido láctico.....	30
3.5.2 Leveduras.....	32
3.6 CULTURAS INICIADORAS.....	34
3.7 TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA.....	37
3.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS NA MANDIOCA E SEUS DERIVADOS.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 MICRO-ORGANISMOS INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	43
4.1.1 Reativação dos micro-organismos.....	43
4.2 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GRUPO <i>Lactobacillus plantarum</i> ...	44
4.3 DIFERENCIAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	44
4.4 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA A PRODUÇÃO DE POLVILHO.....	46
4.4.1 Atividade antagonista.....	46
4.4.2 Capacidade amilolítica.....	47
4.4.3 Capacidade de acidificação.....	48
4.5 PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO.....	48
4.6 MONITORAMENTO DAS CULTURAS INICIADORAS DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO.....	50
4.6.1 Monitoramento molecular das bactérias do ácido láctico.....	50
4.6.1.1 Isolamento das bactérias do ácido láctico.....	50
4.6.1.2 Extração de DNA das bactérias do ácido láctico.....	51
4.6.1.3 Amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA.....	51
4.6.1.4 Análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP.....	52
4.6.2 Monitoramento molecular das leveduras.....	53
4.6.2.1 Isolamento das leveduras.....	53
4.6.2.2 Extração de DNA das leveduras.....	53

4.6.2.3 Análise dos perfis moleculares obtidos por PCR <i>fingerprinting</i>	53
4.6.3 Monitoramento molecular do fermento comercial.....	54
4.6.3.1 Isolamento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
4.6.3.2 Extração do DNA mitocondrial.....	54
4.6.3.3 Análise dos perfis moleculares obtidos por digestão.....	55
4.7 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO.....	56
4.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	56
4.9 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	57
4.9.1 Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	57
4.9.1.1 Extração dos lipídeos.....	57
4.9.1.2 Perfil de ácidos graxos.....	58
4.9.2 Análise de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa.....	58
4.9.2.1 Extração dos compostos voláteis.....	58
4.9.2.2 Identificação de compostos voláteis.....	59
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
5.1 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GRUPO <i>Lactobacillus plantarum</i> ...	61
5.2 DIFERENCIAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Lactobacillus plantarum</i>	62
5.3 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA A PRODUÇÃO DE POLVILHO.....	63
5.3.1 Atividade Antagonista.....	63
5.3.2 Capacidade amilolítica.....	67
5.3.3 Capacidade de acidificação.....	68
5.4 PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO.....	72
5.4.1 Monitoramento físico-químico da fermentação em escala piloto.....	72
5.4.2 Monitoramento molecular das culturas iniciadoras.....	74
5.5 CARACTERIZAÇÃO DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO.....	80
5.6 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	84
5.6.1 Perfil de ácidos graxos.....	84
5.6.2 Compostos voláteis.....	88
6 CONCLUSÃO.....	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
APÊNDICE A.....	116
APÊNDICE B.....	117
APÊNDICE C.....	118
APÊNDICE D.....	119
APÊNDICE E.....	120
APÊNDICE F.....	121
ANEXO A.....	122
ANEXO B.....	123

1 INTRODUÇÃO

O cultivo e o consumo da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) está enraizado na cultura e história de diferentes povos e possui grande importância para as economias sul-americana, africana e asiática. De acordo com o relatório semestral sobre mercados globais de alimentos da *Food and Agriculture Organization of The United Nations* (FAO), em 2016, a mandioca retomou seu status de uma das culturas alimentares que mais se expande, devido ao retorno de condições climáticas mais favoráveis. A previsão da produção mundial de mandioca nesse mesmo ano foi de 288,4 milhões de toneladas, com um consumo mundial per capita de 21,0 kg/ano (FAO, 2016). Em 2016, a produção brasileira de mandioca foi de 21.082.867 toneladas (t) (FAOSTAT, 2016).

Apesar de amplamente consumida, como fonte de carboidratos, alguns minerais e vitaminas, a mandioca apresenta limitações de comércio e de aplicações industriais principalmente pela rápida deterioração pós-colheita e toxicidade intrínseca (ALAMU *et al.*, 2017; FRANZ *et al.*, 2014;). Além disso, a baixa concentração de nutrientes, como proteínas e ácidos graxos insaturados (tais como ômega 6 e ômega 3) afeta populações subnutridas que utilizam essa raiz e seus subprodutos como principal fonte de calorias (ALAMU *et al.*, 2017; BURNS *et al.*, 2012). Assim, diferentes processamentos tecnológicos têm sido aplicados e propostos para contornar essas limitações e aumentar o valor comercial desse cultivo (PADONOU *et al.*, 2010).

A fermentação natural do amido extraído da raiz da mandioca seguida por secagem ao sol para a obtenção do polvilho azedo, denominado de *almidón agrío*, é uma tecnologia tradicional utilizada na América Latina (DEMIATE; KOTOVICZ, 2011). O polvilho azedo é um produto típico brasileiro de grande consumo, sendo geralmente produzido em indústrias rurais de pequeno e médio porte (ABAM, 2009) e utilizado na fabricação de biscoitos e pão de queijo. Na Colômbia, é amplamente utilizado como ingrediente básico na fabricação do *pan de yuca* e do *pandebono*, além de outros produtos de panificação (ALONSO-GOMEZ *et al.*, 2016; DÍAZ *et al.*, 2018a, 2018b). Entretanto, ainda se trata de um produto artesanal, que mesmo quando produzido em polvilharias modernas, apresenta qualidade heterogênea.

Uma microbiota variada proveniente da matéria-prima, da água e dos tanques de fermentação inicia uma competição que resulta na fermentação natural da fécula de mandioca com participação de leveduras como *Issatchenkia* spp. e *Galactomyces geothricum* e, predominância de bactérias do ácido láctico (BAL), principalmente do

gênero *Lactobacillus* (LACERDA *et al.*, 2005; PENIDO *et al.*, 2018). Durante a fermentação, o metabolismo desses micro-organismos altera a fécula da mandioca, auxiliando na remoção dos glicosídeos cianogênicos (MONTAGNAC *et al.*, 2009). As BAL hidrolisam o amido e acidificam o meio por fermentação láctica e acética, o que contribui para o aroma do polvilho, e, juntamente com a produção de compostos antimicrobianos, promovem uma ação antagonista que inibe o crescimento de micro-organismos patogênicos no produto final (GÁLVEZ *et al.*, 2007; NARDI *et al.*, 2005). As leveduras, por sua vez, em associação com as BAL podem contribuir para a melhoria das características sensoriais de produtos obtidos em processos fermentativos através da síntese de diferentes ésteres aromáticos, além de degradar fatores antinutricionais, substâncias que podem diminuir a biodisponibilidade de nutrientes, e tornar o meio mais propício à sobrevivência das bactérias (LIU *et al.*, 2004; SWIEGERS *et al.*, 2005).

A fermentação natural para produção de polvilho é realizada de maneira muito empírica e rudimentar e, mesmo quando realizada em polvilharias modernas, resulta em pouca homogeneidade e baixa qualidade entre os lotes do produto em função da falta de padronização do processo e da complexidade e variabilidade da microbiota natural (LACERDA *et al.*, 2005; PENIDO, 2013). Assim, o uso de BAL e leveduras como culturas iniciadoras pode reduzir o tempo de fermentação, além de aumentar o rendimento, a qualidade e o valor nutricional do produto final (AIDOO *et al.*, 2006; CAPLICE; FITZGERALD, 1999; HOLZAPFEL, 2002).

Desta forma, considerando a importância da mandioca na dieta mundial, sua relevância para as economias sul-americana, africana e asiática, somadas à falta de padronização do processo fermentativo, e à inexistência de culturas iniciadoras adequadas para a produção de polvilho azedo, justifica-se o estudo do presente trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produção de polvilho azedo em escala piloto a partir do uso de culturas iniciadoras selecionadas visando a melhoria da qualidade do produto final.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a identificação das espécies estritamente relacionadas pertencentes ao grupo *Lactobacillus plantarum* e diferenciar suas linhagens;
- Testar os isolados de *L. plantarum* e *Lactobacillus brevis* provenientes da fermentação de mandioca quanto à atividade antagonista, capacidade de degradação do amido e produção de ácidos totais;
- Testar um isolado de *Pichia scutulata* proveniente da fermentação de mandioca quanto à capacidade de degradação do amido e produção de ácidos totais;
- Produzir polvilho azedo em escala piloto utilizando culturas puras e mistas das linhagens selecionadas e fermento biológico seco instantâneo comercial;
- Realizar o monitoramento físico-químico da fermentação em escala piloto;
- Realizar o monitoramento das culturas iniciadoras na fermentação em escala piloto por técnicas moleculares;
- Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do polvilho produzido em escala piloto;
- Avaliar o perfil de ácidos graxos e de compostos voláteis dos polvilhos produzidos, além da fécula de mandioca, polvilhos doce e azedo comerciais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MANDIOCA

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é um cultivo originário da América do Sul, cujas raízes são importantes fontes de carboidratos. A produção mundial de mandioca, em 2016, foi estimada em 288,4 milhões de toneladas (t). Os principais produtores foram Nigéria, com 57.134.478 t; Tailândia responsável por 31.161.000 t e o Brasil que apareceu em terceiro lugar com 21.082.867 t (FAOSTAT, 2016). No Brasil, neste mesmo ano, os principais estados produtores foram Pará (4.263.013 t), Paraná (3.888.111 t) e Bahia (1.956.103 t), Minas Gerais apareceu em oitavo lugar com 844.308 t produzidas (EMBRAPA, 2016). Em 2018, a estimativa da produção brasileira de mandioca foi de 20.936.782 t (IBGE, 2018).

A mandioca crua tem 61,8% de umidade, 1,1% de proteína, 0,3% de lipídeos, 36,2% de carboidratos, sendo 1,9% de fibras, e 0,6% de cinzas (NEPA, 2011). Industrialmente, é utilizada para consumo humano, alimentação animal e como matéria-prima para a indústria de amido (BALAGOPALAN, 2002). Embora suas raízes sejam ricas em calorias, são deficientes em proteínas e lipídeos, além de serem perecíveis e potencialmente tóxicas. Isso porque a mandioca contém glicosídeos cianogênicos, tais como a linamarina (95%) e a lotaustralina (5%), que liberam o ácido cianídrico (HCN) por meio da enzima linamarase, presente no tubérculo. A mandioca também contém fitatos, fibras, nitratos, polifenóis, oxalato e saponinas capazes de reduzir a biodisponibilidade de nutrientes (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014; MONTAGNAC *et al.*, 2009).

O HCN, substância responsável pela toxicidade da mandioca, varia de 150 a 1000 mg/kg de raiz fresca (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014). Em relação ao teor dessa substância na raiz fresca sem casca, as variedades de mandioca com concentrações menores que 50 mg HCN/kg são classificadas como inócuas ou mansas; entre 50 e 100 mg HCN/kg, moderadamente venenosas; e superiores a 100 mg HCN/kg, perigosamente venenosas ou bravas (COHEN *et al.*, 2007). O consumo de 50 a 100 mg de cianeto, sal do HCN, está associado a intoxicação aguda, sendo que se considera como dose letal aproximadamente 10 mg de HCN/kg de peso do indivíduo. Contudo, casos de toxicidade aguda são raros e, geralmente, estão associados a circunstâncias acidentais. A ingestão crônica de pequenas quantidades de cianeto também pode causar graves problemas de saúde, tais como neuropatia tropical, intolerância à glicose e konzo (paraparesia

espástica não-progressiva) (CHISTÉ *et al.*, 2005; MONTAGNAC *et al.*, 2009; UYOH *et al.*, 2009).

A vida útil da mandioca é inferior a 5 dias e sua deterioração, resultante de danos mecânicos, fisiológicos e microbiológicos, começa dentro de 24 horas após a colheita (FRANZ *et al.*, 2014). Assim, diferentes métodos de processamento podem prolongar a vida útil dessa raiz, além de torná-la segura para o consumo humano. Tais métodos visam reduzir a toxicidade, melhorar a palatabilidade dos produtos derivados e converter a raiz fresca perecível em produtos estáveis e com maior valor agregado (PADONOU *et al.*, 2010; UYOH *et al.*, 2009). Uma redução substancial do conteúdo de cianeto da polpa de mandioca ocorre pela cocção (entre 56 e 80%) e pela fritura (entre 70 e 82%) (BORGES; FUKUDA, 1989). Entretanto, esmagar e secar ao sol as raízes da mandioca transformadas em farinha consegue remover de 96% a 99% do conteúdo total de cianogênicos (MONTAGNAC *et al.*, 2009).

A fermentação da mandioca, por sua vez, além de reduzir sua toxicidade, resulta no aumento do conteúdo de nutrientes, degradação de fatores antinutricionais e ainda aumento da biodisponibilidade de micronutrientes. É eficiente para remover, por exemplo, 85,6% dos fitatos presentes nas raízes de mandioca (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014; MONTAGNAC *et al.*, 2009). Se caracteriza por ser um método capaz de alterar a estrutura do amido da mandioca que ocorre em três fases. A primeira está associada à rápida queda na concentração de oxigênio e ao início do ataque de enzimas amilolíticas ao amido granular, fornecendo uma fonte de carbono para o metabolismo do micro-organismos responsáveis pela fermentação. Na segunda fase, micro-organismos mais exigentes, produtores de ácidos e gases se desenvolvem. À medida que os ácidos orgânicos são liberados, o pH do meio diminui. Por fim, na terceira etapa, saprófitos e micro-organismos contaminantes consomem os ácidos orgânicos na superfície. O processo fermentativo modifica os grãos de amido e suas características físicas, químicas e reológicas, além do aroma e do sabor do produto final (ALONSO-GOMEZ *et al.*, 2016).

3.2 FÉCULA DE MANDIOCA, POLVILHO DOCE E POLVILHO AZEDO

A fécula de mandioca é o produto amiláceo extraído das raízes de mandioca, não-fermentado e seco em forno. Contém 17,8% de umidade, 0,5% de proteína, 0,3% de lipídeos, 81,1% de carboidratos, sendo 0,6% de fibras, e 0,3% de cinzas (NEPA,

2011). Em 2016, a produção brasileira da fécula de mandioca foi de 616,2 mil toneladas (FELIPE, 2018). Apresenta versatilidade de aplicações industriais, sendo utilizada em sua maior parte como fécula nativa ou como amido modificado. Uma porcentagem menor, é utilizada como matéria-prima para a produção de polvilho doce e polvilho azedo (CEPEA/ESALQ-USP, 2007), que também podem ser obtidos a partir da fermentação do amido extraído diretamente das raízes da mandioca (PENIDO, 2013).

O polvilho doce e a fécula de mandioca são produtos similares, se diferenciam pelo fato de que o polvilho doce é o produto obtido por um curto período de fermentação e seco ao sol, mas têm composição química semelhante. O polvilho doce contém 12,6% de umidade, 0,4% de proteína, apenas traços de lipídeos, 86,8% de carboidratos, sendo 0,2% de fibras, e 0,2% de cinzas (NEPA, 2011). O polvilho doce e o azedo passam pelo mesmo processo de extração do amido e secagem ao sol, mas diferem no tempo de fermentação, o que lhes confere teores de acidez diferentes. Após a etapa de decantação, o polvilho azedo é submetido a uma fermentação mais prolongada. Este último é um produto típico brasileiro de grande consumo, principalmente nos estados de Minas Gerais, Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Geralmente, é produzido em indústrias rurais de pequeno e médio porte. É utilizado na fabricação de biscoitos, sequilhos, bolos, pães de queijo (como o pão de queijo brasileiro e o *pandebono* e *pan de yuca*, ambos colombianos) e ainda como revestimento em ovinhos de amendoim e amendoim japonês (DÍAZ *et al.*, 2018b; LACERDA, 2006; PENIDO, 2013; PENIDO *et al.*, 2018).

A Legislação Brasileira regulamentada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução nº12 da CNNPA e o Decreto nº 12.486, de 20 de outubro de 1978, que dispõem sobre as normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas, definem o polvilho como o “produto amiláceo extraído da mandioca (*Manihot utilissima*)¹”, sendo que “de acordo com o teor de acidez, será classificado em polvilho doce ou polvilho azedo” (BRASIL, 1978a, 1978b). A diferença entre os dois produtos está nos índices de pH, acidez total titulável e aspectos gerais como cor, granulação e aroma. A resolução e o decreto citados anteriormente (BRASIL, 1978a,1978b) também definem os parâmetros físico-químicos para determinar a qualidade dos polvilhos doce e azedo. Estes fatores são umidade máxima de 14,0%; acidez máxima para o polvilho doce de 1

¹ Denominação anteriormente utilizada para as variedades de mandiocas conhecidas como amargas ou bravas (SILVA; MURRIETA, 2014).

mL de solução de NaOH 1 N/100 g e 5 mL de solução de NaOH 1 N/100 g para polvilho azedo; mínimo de 80,0% de amido; e resíduo mineral de no máximo 0,5%.

3.3 O POLVILHO AZEDO E OS PRODUTOS SEM GLÚTEN

Durante as últimas décadas, o mercado de produtos sem glúten expandiu com uma taxa de crescimento anual de cerca de 10%. Esse crescimento se deve não apenas à demanda dos pacientes celíacos, mas também às mudanças nos hábitos alimentares do consumidor e à maior conscientização sobre as intolerâncias alimentares. O tratamento de pacientes celíacos é fundamentalmente dietético e consiste em excluir o glúten da dieta. Isso significa eliminar produtos à base de trigo, centeio, cevada, aveia (que contém glúten por contaminação) e também seus derivados. Os amidos mais utilizados para a fabricação de produtos sem glúten são os amidos de: cereais alternativos, como milho e arroz; de pseudocereais, como quinoa; e de algumas raízes e tubérculos, como a mandioca e a batata inglesa (ARAÚJO *et al.*, 2010; DÍAZ *et al.*, 2018b). Contudo, o uso de farinhas feitas com esses cereais alternativos, pseudocereais, raízes e tubérculos é restrito devido à sua baixa qualidade de cozimento e baixa qualidade sensorial quando assados. A fermentação dessas farinhas é capaz de melhorar tanto suas propriedades sensoriais quanto suas propriedades de panificação (VOGELMANN *et al.*, 2009).

Na América do Sul, uma alternativa tradicional para substituir a farinha de mandioca é a utilização do polvilho azedo, ingrediente que se destaca para a elaboração de produtos de panificação por sua propriedade de expansão peculiar, sem a necessidade da adição de fermentos (químicos ou biológicos) e ainda isento de glúten. Além disso, o polvilho azedo apresenta propriedades sensoriais desejáveis, que são consequência da fermentação láctica (MARCON *et al.*, 2009; DÍAZ *et al.*, 2018b; ZHU *et al.*, 2015). Comparado à fécula de mandioca, não-fermentada e seca em fornos, o polvilho azedo permite obter produtos de panificação menos densos, ou seja, mais leves e volumosos.

Uma possível explicação para essa propriedade de expansão peculiar durante o forneamento, pode ser atribuída à vaporização da água e à viscosidade da massa. A fermentação e a etapa de secagem ao sol conferem propriedades funcionais específicas ao polvilho azedo, pois levam à formação de radicais livres que resultam na oxidação e despolimerização do amido presente na fécula de mandioca. Essa despolimerização do

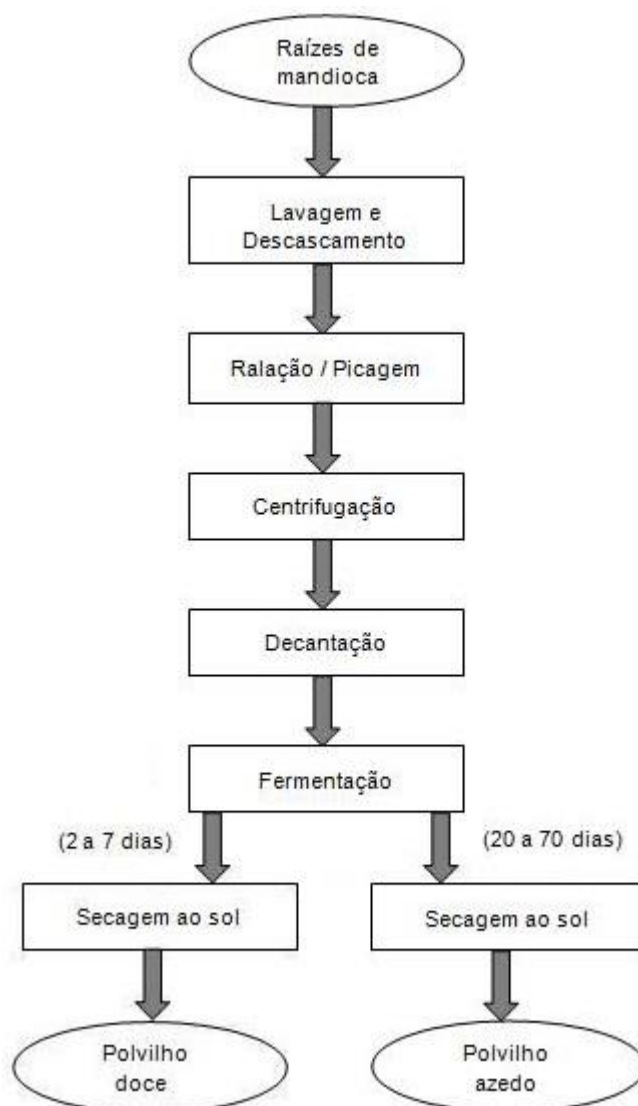
amido diminui a força de resistência da massa à expansão e, portanto, contribui para a capacidade de panificação do polvilho azedo (ALVARADO *et al.*, 2013; BERTOLINI *et al.*, 2001; DÍAZ *et al.*, 2018a; VATANASUCHART *et al.*, 2005; ZHU *et al.*, 2015).

O pão de queijo tem como principais ingredientes o polvilho azedo, água ou leite, queijo, sal, açúcar e gordura. Esse produto não contém farinha de trigo; nem precisa de fermento. A massa é levada ao forno imediatamente após sovada. Assim, sua expansão durante o cozimento não envolve a rede formada pelo glúten, nem a produção de dióxido de carbono pelas leveduras, mas, sim, a capacidade de expansão peculiar do polvilho azedo. Apesar de sua grande aceitação pelos consumidores, o pão de queijo, um produto de panificação sem glúten, não tem uma qualidade padrão. Isso se deve principalmente, ao fato de que polvilho azedo utilizado como principal ingrediente não é um produto padronizado, resultando em pães cuja massa pode não suportar a estrutura desejável (RODRÍGUEZ-SANDOVAL *et al.*, 2014, 2015).

3.4 PROCESSAMENTO DO POLVILHO DOCE E DO POLVILHO AZEDO

Nas polvilharias de pequeno e médio porte, as etapas para a produção do polvilho doce são realizadas de maneira artesanal, manualmente ou com o uso de alguns equipamentos simples (Figura 1). As raízes são lavadas em tanques para remoção de terra e outras sujidades, e, em seguida, raladas à mão ou com o auxílio de pás giratórias para obtenção de uma massa contendo o amido. Essa massa é, então, lavada em peneiras até que a água não esteja mais leitosa. No caso de polvilharias de médio porte, após a etapa de ralação, o material é centrifugado. A massa também pode ser filtrada antes da etapa de decantação. A água leitosa obtida, que corresponde ao extrato aquoso da mandioca, é denominada pelos produtores de “leite de amido”. Esse “leite de amido” é, então, recolhido e decantado em cochos de madeira (nas polvilharias de pequeno porte) ou em tanques de alvenaria (nas polvilharias de médio porte) até que a fase sobrenadante se apresente límpida. O líquido sobrenadante é removido, bem como as impurezas superficiais. O amido decantado e fermentado por um período de dois a sete dias é submetido a sucessivas lavagens para retirada das demais impurezas e, posteriormente, é espalhado em jiraus de bambu para secar ao sol e moído ou triturado (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014; COHEN *et al.*, 2007; LACERDA, 2006; PENIDO, 2013).

Figura 1 – Fluxograma do processamento de raízes de mandioca para a produção de polvilho doce e polvilho azedo



Quando comparado ao polvilho doce, o processamento do polvilho azedo se diferencia apenas pelo tempo de fermentação, que geralmente dura de 20 a 70 dias, podendo chegar até 120 dias. O tempo de fermentação sofre influência das condições climáticas. Em algumas áreas da Colômbia, especialmente aquelas com climas quentes, os tanques de fermentação são enterrados para manter a temperatura constante (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014). O que define o polvilho azedo como um produto de características especiais é o modo como é produzido. O polvilho azedo pode ser obtido a partir da fermentação da fécula de mandioca, do polvilho doce ou do líquido de prensagem da massa ralada, um subproduto da fabricação da farinha de mandioca. Entretanto, a maioria dos produtores inicia o processamento com o emprego direto da

raiz da mandioca (Figura 1). Inicialmente, o processo pode ser considerado como uma fermentação submersa e, em seguida, após a evaporação da água são formados blocos compactos, caracterizando uma fermentação semissólida (PENIDO, 2013).

Durante o processamento do polvilho azedo, 40% a 70% do teor de cianeto é liberado na água utilizada para a lavagem da mandioca, enquanto 5% a 10% estão presentes no farelo de mandioca (subproduto obtido após a passagem da massa por peneiras ou pela centrífuga), que é habitualmente utilizado na alimentação animal ou para a flotação do minério de ferro, e, finalmente, após a fermentação reduz para 4%. Na secagem ao sol, esse teor se torna inferior a 1% (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014).

Apesar de amplamente consumido, o polvilho azedo é ainda um produto artesanal e mesmo quando fabricado em polvilharias modernas, apresenta qualidade heterogênea (DÍAZ, *et al.*, 2018a). Além disso, os produtores também têm seus próprios critérios para definir o ponto final do processo fermentativo, como a inspeção visual da superfície do tanque, a avaliação da acidez pelo paladar ou os testes de panificação, que medem o poder de expansão da massa por meio da elaboração de biscoitos e pães de queijo. Essa avaliação torna o procedimento empírico e sem padronizações. A falta de controle do processo fermentativo é um fator preocupante, considerando a demanda de polvilho azedo de qualidade para a produção de pão de queijo, destinado inclusive a mercados internacionais (FANI, 2010), e de produtos de panificação sem glúten.

3.4.1 Efeito das condições de processamento nas características do polvilho

O processo fermentativo do polvilho azedo se caracteriza por um aumento do teor de acidez e também de proteína, este último devido à biomassa microbiana. A microbiota presente no meio de fermentação converte o amido e os açúcares em ácidos orgânicos (principalmente os ácidos láctico, acético, butírico, propiônico, fórmico, succínico e valérico), que conferem odor e sabor característicos aos produtos fermentados. Além de influenciar as características estruturais e as propriedades térmicas do polvilho azedo (GARCIA *et al.*, 2016). Embora o ácido láctico seja um dos ácidos mais comuns, muitos ácidos graxos de cadeia curta e longa, ésteres e aldeídos também podem ser detectados. Assim, a fermentação da mandioca resulta no aumento do conteúdo de nutrientes (através da biossíntese de vitaminas, aminoácidos essenciais e proteínas) e contribui para o sabor e o aroma do produto final (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2016).

A temperatura e as condições de secagem também exercem grande influência sobre as características do polvilho azedo seco. O padrão de cristalinidade do amido não é afetado por temperaturas de secagem na faixa entre 40 e 60 °C em estufa, porém o grau de cristalinidade do amido diminui com o aumento da temperatura de secagem na faixa mencionada. A capacidade de ligação com a água e a clareza da massa são diretamente proporcionais à temperatura de secagem. Por outro lado, o poder de inchaço e solubilidade, a viscosidade de pico, a viscosidade de quebra, a viscosidade de reversão e o tempo de pico diminuem com o aumento da temperatura. A viscosidade final aumenta significativamente com o aumento da temperatura de secagem até 55 °C, porém a tendência se inverte quando a temperatura de secagem chega a 60 °C (AVIARA *et al.*, 2010).

O efeito da radiação ultravioleta (UV) no amido de mandioca foi avaliado por Vatanasuchart *et al.* (2005). Para isso, os autores trataram fécula de mandioca comercial com 1% de ácido láctico por 15 min e a expuseram às radiações UVA, UVB e UVC. As amostras irradiadas com UVB e UVC por 7 e 9 h, durante a secagem, apresentaram volumes específicos maiores que a amostra seca em forno convencional de ar quente a 40 °C pelo mesmo tempo, o que indica a formação de uma estrutura de rede estável adequada para a expansão. Isso ocorreu porque as moléculas de amido nas regiões amorfas foram parcialmente despolimerizadas pela hidrólise ácida e pela radiação UV, fornecendo pequenas moléculas lineares que facilitam a formação de uma matriz amorfa da massa de amido quando o polvilho é assado, gerando uma boa expansão. Assim, a etapa de secagem é citada entre as mais críticas para as características do produto final, já que a radiação UV é capaz de despolimerizar o amido (ZHU *et al.*, 2015).

Alvarado *et al.* (2013) avaliaram a influência do genótipo da mandioca, da fermentação (0 e 30 dias) e da secagem (em forno, a 40 °C por 24 h, ou ao sol, por 12 h) nas propriedades de panificação do polvilho azedo. Os tratamentos pós-colheita (fermentação e secagem) tiveram maior influência do que o genótipo da mandioca. Entre esses tratamentos, a fermentação teve um efeito mais pronunciado do que a secagem ao sol, em particular na estrutura dos grânulos de amido. No entanto, a combinação de ambos os tratamentos foi, necessária para obtenção da maior expansão da massa. Em relação à capacidade de panificação, as féculas de mandioca fermentada e não-fermentada e secas em forno não diferiram, ambas apresentaram resultados inferiores aos obtidos para a fécula de mandioca não-fermentada e seca ao sol. Os melhores resultados foram obtidos para a fécula de mandioca fermentada e seca ao sol.

Desta forma, pode-se considerar o polvilho azedo como um amido fisicamente modificado por oxidação causada pela ação dos ácidos orgânicos, produzidos durante a fermentação natural da mandioca, e pela radiação UV durante a etapa de secagem. Essa oxidação é capaz de modificar a estrutura dos grânulos de amido, além de alterar suas propriedades funcionais e estruturais que são essenciais para a expansão da massa durante o forneamento.

3.5 MICROBIOTA PRESENTE NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA

As alterações que ocorrem na mandioca durante seu processo fermentativo são atribuídas ao desenvolvimento de uma microbiota variada proveniente da própria mandioca, da água utilizada no processamento e do meio, no caso do polvilho azedo, dos tanques de fermentação (PENIDO *et al.*, 2018). A fermentação natural de alimentos ricos em amido é feita por uma sucessão de micro-organismos, com prevalência de BAL, e ocorre de forma espontânea como resultado da competição entre micro-organismos autóctones e contaminantes. Os micro-organismos melhores adaptados às condições do processo fermentativo em questão, conseguem eventualmente predominar e se tornam os principais responsáveis pela fermentação. Contudo, esse processo se inicia lentamente e corre risco de falhar, propiciando uma situação favorável ao surgimento de micro-organismos indesejados, tais como os deteriorantes e os patógenos (PENIDO, 2013; SANNI *et al.*, 2002).

Os micro-organismos predominantes envolvidos no processo fermentativo da mandioca para a obtenção do polvilho azedo são as BAL, em altas contagens, com prevalência do gênero *Lactobacillus*, seguidas pelas leveduras, em contagens relativamente menores, como *Issatchenkia* spp., atualmente denominada *Pichia* spp., e *G. geothricum* (LACERDA *et al.*, 2005). Penido *et al.* (2018), ao investigar a microbiota predominante na fermentação natural de mandioca em uma polvilharia localizada em Formiga (MG), também encontrou prevalência do gênero *Lactobacillus*, sendo que *Lactobacillus brevis* representou o maior número de isolados (21,52%), seguido por *Lactobacillus fermentum* (15,19%) e *Lactobacillus plantarum* (13,92%). A levedura predominante foi *Pichia scutulata* que representou 52,17% dos isolados.

A associação entre bactérias e leveduras na fermentação da mandioca contribui para o aprimoramento das características sensoriais do produto fermentado, uma vez que esses micro-organismos apresentam propriedades importantes, tais como a

capacidade de produzir enzimas e compostos voláteis (RAMOS *et al.*, 2015). Essa associação ocorre da seguinte forma: as BAL acidificam o meio, criando uma condição ácida capaz de inibir o crescimento de patógenos e contribuir para o crescimento de leveduras, que usam os ácidos orgânicos, produzidos como fonte de carbono; as leveduras, por sua vez, tornam o meio mais propício à sobrevivência das bactérias e contribuem para a melhoria das características sensoriais dos produtos obtido no processo fermentativo, através da síntese de diferentes ésteres aromáticos e da degradação de fatores antinutricionais (LIU *et al.*, 2004; SWIEGERS *et al.*, 2005). Além disso, algumas espécies de BAL são amilolíticas e, ao hidrolisarem o amido, liberam derivados que podem ser utilizados pelas leveduras (HATTINGH *et al.*, 2015).

Mugula *et al.* (2003) observaram que todas as BAL testadas (*L. brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*) poderiam ser utilizadas como culturas puras para a produção de *togwa*, alimento fermentado africano à base de mandioca, milho, sorgo, milheto ou suas combinações. O mesmo não foi observado para as leveduras *Candida pelliculosa*, *Candida tropicalis*, *Issatchenkia orientalis* e *Saccharomyces cerevisiae* como culturas puras, pois reduziram levemente o pH do meio. No entanto, a associação entre essas BAL e a levedura *I. orientalis* resultou em uma maior produção de compostos voláteis, responsáveis pelo sabor e aroma do produto final. Esse aumento da produção de metabólitos, quando em cultura mista, é um indicativo da interação entre BAL e leveduras.

Entre os principais motivos para a heterogeneidade e baixa qualidade dos produtos fermentados a partir da mandioca estão a diversidade e a complexidade da microbiota envolvida em seu processo fermentativo. Desta forma, o uso de BAL e leveduras como culturas iniciadoras em potencial pode contribuir para otimizar o processo de fermentação da mandioca. Isso porque essa associação de micro-organismos é capaz de melhorar o valor nutricional dos alimentos fermentados, pelo aumento da digestibilidade de proteínas e da biodisponibilidade de nutrientes, e de levar ao seu enriquecimento biológico, por meio da biossíntese de vitaminas e aminoácidos essenciais (PENIDO, 2013; HOLZAPFEL, 2002).

3.5.1 Bactérias do Ácido Lático

As bactérias do ácido láctico (BAL), também denominadas de bactérias lácticas, constituem um grupo diverso de micro-organismos que se caracterizam por serem Gram-

positivas, catalase e oxidase negativas, não formadoras de esporos e apresentarem morfologia de cocos, bacilos ou bastonetes. Em geral, não apresentam motilidade e crescem em condições microaerófilas (TODOROV; FRANCO, 2010). São heterotróficas e têm necessidades nutricionais complexas, incluindo aminoácidos e vitaminas (REDDY *et al.*, 2008).

A fermentação de carboidratos por BAL geralmente ocorre através da via glicolítica, também chamada de Embden-Meyerhof-Parnas, e leva à obtenção de ácido láctico como único produto metabólico final. Esse metabolismo é denominado de fermentação homoláctica e as BAL que produzem apenas ácido láctico como metabólito são conhecidas como homofermentativas. Por outro lado, BAL que metabolizam carboidratos com a formação de dióxido de carbono, ácido acético, ácido fórmico e etanol, além do ácido láctico, são denominadas de heterofermentativas e realizam fermentação heteroláctica através da via-6-fosfogluconase/fosfoquetolase. Deste modo, as BAL são classificadas em três grupos com base no produto final de sua fermentação: homofermentativas estritas, heterofermentativas estritas e heterofermentativas facultativas (TODOROV; FRANCO, 2010).

Pertencem a sete gêneros taxonômicos: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*. O gênero *Lactobacillus* inclui micro-organismos com morfologia de bastonetes que são classificados como heterofermentativos facultativos. Com base na capacidade de metabolizar diferentes carboidratos e crescer a 45 °C, o gênero é dividido em 3 subgêneros: *Streptobacterium*, *Betabacterium* e *Thermobacterium* (TODOROV; FRANCO, 2010).

São muito aplicadas na indústria de alimentos, devido à capacidade de reduzir o conteúdo de carboidratos e o pH dos alimentos que fermentam. Um dos efeitos mais desejáveis de seu crescimento é a acidificação, pois conseguem reduzir o pH a um valor baixo o suficiente para inibir o crescimento de várias bactérias, incluindo os patógenos mais comuns, prolongando, assim, a vida de prateleira dos alimentos fermentados (REDDY *et al.*, 2008).

As fermentações tradicionais de mandioca pelas BAL levam à obtenção de diferentes produtos. Entre os fermentados tradicionais africanos, estão *agbelima*, *akyeke* ou *attiéké*, *cingwada*, *fufu*, *gari*, *kivunde*, *kokonte* ou *lafun* e *togwa*. *Cingwada*, *kivunde* e *togwa* são fermentados de mandioca originários do leste africano, sendo que o último é um mingau feito a partir de cereais e mandioca de grande consumo na Tanzânia (FRANZ *et al.*, 2014; MUGULA *et al.*, 2003). Os demais produtos citados são produzidos no oeste

africano. A *agbelima* é uma massa fermentada de textura suave produzida em Gana a partir das raízes descascadas e raladas da mandioca (MANTE *et al.*, 2003). *Akyeke* ou *attiéke* é uma refeição de mandioca fermentada e cozida no vapor muito comum em Gana e na Costa do Marfim (COULIN *et al.*, 2006; OBILIE *et al.*, 2004). *Fufu* é um produto pastoso obtido a partir de pedaços de mandioca descascados e fermentados e preparado com água fervente. Enquanto o *gari* é obtido espremendo a água da raiz de mandioca descascada que é, então, fermentada, peneirada e frita até secagem, sendo de grande consumo na Nigéria (AYOADE *et al.*, 2018). O processamento do *kokonte* ou *lafun* consiste em mergulhar pedaços de mandioca descascados em água a temperatura ambiente por 2 a 5 dias, secar ao sol e moer. É um produto típico do Benim e da Nigéria (PADONOU *et al.*, 2009).

Os fermentados de mandioca brasileiros têm sua origem na culinária indígena. Entre eles, podemos citar: *cauim*, polvilho azedo, *puba*, *tarubá*, *tucupi* e *yakupa*. *Cauim* e *yakupa* são bebidas fermentadas não alcoólicas. *Puba* é uma massa obtida da fermentação submersa das raízes de mandioca, enquanto *tarubá* é uma bebida obtida pela fermentação em estado sólido. O *tucupi* é um molho fermentado e submetido à cocção, obtido após a fermentação espontânea da manipueira, que é o líquido residual da prensagem da massa ralada de mandioca (ALMEIDA *et al.*, 2007; CAETANO, 2018; CRISPIM *et al.*, 2013; FREIRE *et al.*, 2014; MENEZES *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2015).

A espécie *L. plantarum* já foi encontrada em todos os produtos citados. Entre as espécies de BAL frequentemente encontradas, alguns autores relatam a presença de *L. fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *L. brevis* entre as predominantes. Outras espécies previamente identificadas foram *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus bif fermentans*, *Lactobacillus buchneri*, *L. casei*, *L. cellobiosus*, *Lactobacillus confuses*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa* e *Weissella paramesenteroides* (ALMEIDA *et al.*, 2007; AYOADE *et al.*, 2018; BANWO *et al.*, 2012; CAETANO, 2018; COULIN *et al.*, 2006; CRISPIM *et al.*, 2013; FRANZ *et al.*, 2014; FREIRE *et al.*, 2014; KIMARYO *et al.*, 2000; KOSTINEK *et al.*, 2007; LACERDA *et al.* 2005, 2011; MANTE *et al.*, 2003; MENEZES *et al.*, 2018; MUGULA *et al.*, 2003; OBILIE *et al.*, 2003, 2004; OGUNTOYINBO; DODD, 2010; OMAR *et al.*, 2000; PADONOU *et al.*, 2009; PENIDO, 2013; RAMOS *et al.*, 2015).

L. plantarum, *L. brevis* e *L. mesenteroides*, além de predominarem em fermentações de mandioca, já tiveram sua habilidade de degradar glicosídeos cianogênicos descrita (LEI *et al.*, 1999; OBILIE *et al.*, 2004), característica importante para a redução da toxicidade da mandioca. Outras características de interesse no processo fermentativo da mandioca são a atividade antagonista contra patógenos, capacidade de acidificação, atividade amilolítica e atividade proteolítica (ESSID *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2015).

Ao estudar o polvilho azedo, Lacerda *et al.* (2005) encontraram *L. plantarum* e *L. fermentum* como as BAL predominantes no polvilho isolado de duas polvilharias em Conceição dos Ouros (MG). Além disso, os autores também isolaram *L. brevis* em menores proporções. Em 2011, Lacerda *et al.*, por meio de técnicas moleculares, identificaram as seguintes espécies de bactérias, após cinco dias de fermentação para a produção de polvilho azedo, *L. mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. citreum* e *Enterobacter* sp. Penido (2013), ao estudar a microbiota presente na fermentação natural da mandioca para produção de polvilho azedo em uma polvilharia em Formiga (MG), observou que *L. brevis* representou o maior número de isolados (21,52%), seguido por *Enterococcus faecium* (16,46%), *L. fermentum* (15,19%) e *L. plantarum* (13,92%). Em menores porcentagens, também foram identificadas as espécies *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei* (8,86%), *Lactobacillus harbinensis* (6,33%), *Lactobacillus parabuchneri* (5,06%), *W. cibaria* (3,80%), *Lactococcus garvieae* (3,80%), *L. lactis* subsp. *lactis* (2,53%), *L. mesenteroides* (1,27%) e *Lactobacillus ghanensis* (1,27%).

3.5.1.1 Atividade antagonista das bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico apresentam propriedades tecnológicas importantes que contribuem para o processo fermentativo da mandioca. Além da capacidade de acidificação do meio, algumas linhagens exibem atividade antagonista contra patógenos. Entre os principais metabólitos associados à inibição microbiana, pode-se citar os ácidos orgânicos, o peróxido de hidrogênio; o diacetil e as bacteriocinas (BOTTHOULATH *et al.*, 2018; GÁLVEZ *et al.*, 2007; LV *et al.*, 2018; NARDI *et al.*, 2005).

Mante *et al.* (2003) investigaram as interações antimicrobianas das espécies envolvidas na fermentação do *agbelima* com ênfase no efeito inibitório de BAL em cinco

patógenos entéricos. O efeito antimicrobiano das bactérias do ácido láctico, incluindo linhagens de *L. plantarum*, que foi a espécie dominante nessa fermentação, foi determinado utilizando a difusão em ágar pela técnica de poços. *L. brevis* foi identificado como a segunda BAL predominante isolado dessa fermentação. Os patógenos entéricos que foram inoculados na massa de mandioca no início da fermentação não foram mais detectados depois de 24 horas. Os autores atribuíram o efeito antimicrobiano de linhagens de BAL principalmente à produção de ácidos, já que as linhagens testadas não foram capazes de produzir bacteriocinas nem peróxido de hidrogênio, além de perder o efeito inibitório após neutralização do sobrenadante.

As atividades de preservação biológica das linhagens de *L. plantarum* durante a fermentação do *fufu*, foram estudadas por Obadina *et al.* (2006), que determinaram os efeitos antimicrobianos dessas linhagens contra os patógenos *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Typhi pelo método de difusão em ágar. Todos os patógenos testados foram altamente inibidos por linhagens de *L. plantarum*, sendo que *S. aureus* apresentou o maior halo de inibição seguido por *E. coli* e *S. Typhi*. Os autores concluíram que os produtos tradicionais de mandioca cuja fermentação é bem-sucedida com um procedimento de saneamento adequado combinado com a adição de *L. plantarum*, que produziu metabólitos antimicrobianos, poderiam fornecer uma garantia razoável do controle dos micro-organismos patogênicos.

Adebayo *et al.* (2013) exploraram as propriedades antimicrobianas das BAL, que foram identificadas como *Leuconostoc lactis*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Leuconostoc carnosum* e *L. brevis*, isoladas durante a fermentação da mandioca para a produção de *fufu*. Essas bactérias foram testadas, pelo método de difusão em ágar, contra as seguintes bactérias enteropatogênicas: *Shigella flexi*, *Bacillus subtilis* e *E. coli*. Com a exceção de *L. fermentum*, todas as BAL isoladas da massa fermentada de mandioca apresentaram atividade inibitória contra as bactérias enteropatogênicas testadas. Os autores atribuíram esse efeito inibitório das BAL à produção de bacteriocinas, que possivelmente foram produzidas como resultado da estimulação pela presença de micro-organismos competidores.

A atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, de BAL isoladas e identificadas a partir da fermentação submersa de mandioca foi avaliada por Anyogu *et al.* (2014). Quatro isolados testados de *L. plantarum*, a espécie predominante nessa fermentação, apresentaram ação inibitória classificada como forte, com zonas de inibição de 2 a 4 mm, em relação a *B. cereus*. Para *E. coli* e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. Typhimurium*), a atividade foi fraca para dois isolados e forte para outros

dois. Apenas dois isolados apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*. Os autores também investigaram o efeito da neutralização ácida na atividade inibitória destes micro-organismos. Após a neutralização com NaOH 0,1 M, observou-se a ausência de zonas de inibição. Desta forma, o efeito antimicrobiano foi atribuído à produção de ácidos orgânicos.

3.5.2 Leveduras

Várias leveduras já foram isoladas de processos fermentativos tradicionais para a obtenção de produtos fermentados da mandioca, principalmente, em associação com as BAL, que predominam neste tipo de fermentação. Existem muitos relatos da presença de *S. cerevisiae* durante a fermentação desses produtos (COULIN *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2014; OYEWOLE, 2001; PADONOU *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012; SCHWAN *et al.*, 2007). Estudos indicam que esta levedura tem papel importante nesse processo fermentativo, contribuindo para o amolecimento da mandioca e enriquecimento nutricional do produto fermentado (BOONNOP *et al.*, 2009; PADONOU *et al.*, 2010).

Leveduras do gênero *Candida* também foram frequentemente isoladas na fermentação de mandioca para obtenção de diferentes produtos. A espécie *C. tropicalis* é uma das predominantes e já foi encontrada na fermentação para produção de *attiéké*, *fufu*, *lafun*, polvilho azedo, *tarubá* e *tucupi* (CAETANO, 2018; COULIN *et al.*, 2006; LACERDA *et al.*, 2005; OYEWOLE, 2001; PADONOU *et al.*, 2009; RAMOS *et al.*, 2015). A levedura *Candida krusei* também é frequentemente isolada e já foi identificada na fermentação de *attiéké*, *fufu*, *gari* e *yakupa* (COULIN *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2014; OGUNTOYINBO, 2008; OYEWOLE, 2001). Outras espécies do gênero *Candida* foram isoladas da fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo, *Candida rugosa*, *Candida humilis* e *Candida ethanolica* (LACERDA *et al.*, 2005; PENIDO, 2013), e de *gari*, *Candida guilliermondii*, *Candida maris* e *Candida glabrata* (OGUNTOYINBO, 2008). Esta última também foi isolada do *lafun*, juntamente com *P. scutulata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia kudriavzevii* e *Trichosporon asahii* (PADONOU *et al.*, 2009).

As leveduras predominantes identificadas na bebida alcoólica *caxiri*, fermentada a partir de mandioca e batata-doce por povos indígenas no Brasil, foram: *S. cerevisiae*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia guilliermondii* e *Cryptococcus luteolus* (SANTOS *et al.*, 2012). Utilizando tanto os métodos dependentes quanto os

métodos independentes de cultivo foi possível identificar as leveduras *S. cerevisiae* e *P. kudriavzevii*, também conhecida como *C. krusei*, na bebida *yakupa* (FREIRE *et al.*, 2014).

Ramos *et al.* (2015), ao identificar e caracterizar a microbiota presente no processo fermentativo e no produto final, a bebida *tarubá*, encontraram *Torulaspora delbrueckii* como a espécie de levedura predominante, que apresentou atividade proteolítica. As leveduras *Pichia exigua*, *C. rugosa*, *C. tropicalis*, *P. kudriavzevii*, *Wickerhamomyces anomalus* e *C. ethanolica* foram isoladas em menor proporção e exibiram atividade amilolítica. *Pichia manshurica* também foi identificada, porém não apresentou atividade proteolítica nem amilolítica.

Em amostras de *tucupi*, as leveduras identificadas foram *Yarrowia lipolytica* (28,2%), *C. ethanolica* (20,5%), *C. tropicalis* (18,0%) e *P. scutulata* (15,4%). Além destas, foram isoladas em menores proporções (2,6% de cada) *C. humilis*, *P. exigua* e *Wickerhamomyces anomalus* (CAETANO, 2018).

Na fermentação para a produção de *gari* e *fufu*, Ayoade *et al.* (2018) encontraram os fungos *Neurospora crassa*, *Aspergillus fumigatus* e *Saccharomyces* spp. A fermentação pelos fungos em associação com as BAL reduziu os níveis de cianeto da raiz de mandioca, tornando os produtos finais seguros para consumo humano. O ambiente ácido criado pelas BAL não só favorece a proliferação de fungos, mas também fornece fatores de crescimento como vitaminas e compostos que têm impacto significativo na qualidade sensorial e nutricional dos alimentos (AYOADE *et al.*, 2018; BOONNOP *et al.*, 2009).

Lacerda (2002), ao caracterizar a microbiota associada ao processo fermentativo da mandioca para a produção do polvilho azedo, encontrou leveduras em números representativos durante o processo, sendo que entre as espécies mais encontradas estava *Issatchenkia scutulata* var. *exigua-similar*, atualmente conhecida como *Pichia scutulata*. Penido (2013), ao caracterizar a microbiota do mesmo produto, também encontrou *P. scutulata* representando o maior número de isolados (52,17%), seguida por *Kazachstania exigua* (17,39%). *C. humilis* e *Geotrichum fragrans* apareceram na mesma proporção (13,04%). Em menores porcentagens, foi identificada a espécie *C. ethanolica* (4,35%).

3.6 CULTURAS INICIADORAS

Um maior conhecimento sobre a microbiota dos alimentos fermentados pode ter consequências diretamente aplicáveis na otimização do processo fermentativo. Uma dessas possíveis consequências seria o estabelecimento uma cultura iniciadora pura ou mista para a padronização da fermentação para a fabricação de diferentes produtos. Segundo Kimaryo *et al.* (2000), a inoculação de mandioca com uma ou mais espécies ou linhagens selecionadas de BAL proporcionaria melhor controle da fermentação e melhor qualidade do produto do produto final.

O desenvolvimento de culturas iniciadoras foi sugerido como um dos pré-requisitos para o estabelecimento da produção industrial de pequena escala de alimentos fermentados na Ásia e na África (AIDOO *et al.*, 2006; FRANZ *et al.*, 2014). Para isso, é necessário selecionar micro-organismos apropriados, ou seja, capazes de predominar no processo fermentativo e com características desejáveis que irão contribuir para a qualidade do produto final. Entre essas características podemos citar: rápida acidificação do meio, atividade antagonista contra patógenos, produção de compostos que conferem um aroma e sabor agradáveis, além da capacidade de reduzir o tempo de fermentação. Desta forma, após a seleção, se torna possível utilizar culturas iniciadoras adequadas, de forma confiável e também reprodutível (MENEZES *et al.*, 2018; PADONOU *et al.*, 2010; PENIDO, 2013).

As BAL e leveduras são micro-organismos ideais para uso como culturas iniciadoras na obtenção de alimentos fermentados. Essas bactérias acidificam o meio, devido à produção principal de ácido láctico e também de ácido acético, enquanto as leveduras são as principais responsáveis pela produção de aroma (MENEZES *et al.*, 2018). Além disso, as BAL podem produzir compostos antimicrobianos, que promovem uma ação antagonista capaz de inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos no produto final. Esses compostos são ácidos orgânicos; peróxido de hidrogênio; diacetil, composto com anel aromático (fenilalanina) ligado *in tandem* a resíduos glicosídicos (n = 1 a 6) de m/z 192, provavelmente heptose; e bacteriocinas (BOTTHOULATH *et al.*, 2018; GÁLVEZ *et al.*, 2007; LV *et al.*, 2018; NARDI *et al.*, 2005).

Estudos de isolamento e identificação da microbiota de produtos tradicionais obtidos a partir da fermentação de mandioca revelaram a diversidade de BAL e leveduras envolvidas nesse processo fermentativo. A partir dos micro-organismos isolados nesses estudos, culturas iniciadoras puras e mistas começaram a ser testadas em escala piloto. Egounlety *et al.* (2007) produziram *gari* a partir de mandioca brava utilizando culturas

iniciadoras de BAL (*L. plantarum*; *L. fermentum* e *W. paramesenteroides*) liofilizadas em uma planta piloto rural usando boas práticas de fabricação. O uso de culturas iniciadoras puras ou mistas resultou em uma rápida acidificação do meio, melhora do rendimento e obtenção de um produto final seguro, além de reduzir do tempo de fermentação pela metade.

Kostinek *et al.* (2007) selecionaram *L. plantarum*, *L. pentosus*, *Leuconostoc fallax*, *W. paramesenteroides* e *L. fermentum* como culturas iniciadoras em potencial, após avaliar suas propriedades bioquímicas (acidificação, fermentação de alguns açúcares, além de produção de enzimas e compostos antimicrobianos). Huch (*née* Kostinek) *et al.* (2008) testaram linhagens de *L. plantarum* e *L. fermentum* como culturas iniciadoras na fermentação de mandioca para a produção de *gari*. A utilização dessas bactérias em altas contagens (10^7 a 10^8 UFC/g) resultou em uma contagem um a dois logaritmos mais elevada de BAL durante toda fermentação quando comparada com o controle, que não havia sido inoculado. O monitoramento molecular indicou que *L. plantarum* conseguiu se estabelecer como micro-organismo predominante, o mesmo não aconteceu com *L. fermentum*. O sucesso da linhagem de *L. plantarum* em predominar na fermentação de mandioca indica que essa linhagem é uma boa candidata a cultura iniciadora para a produção de *gari* em escala industrial.

Vogelmann *et al.* (2009) inocularam 1% de fermento comercial (composto por *S. cerevisiae*) e 10% de uma mistura de culturas iniciadoras consistindo de $2,0 \times 10^6$ BAL (45% de *L. fermentum*, 45% de *L. plantarum* e 10% de bactérias do grupo *L. casei*) e $5,3 \times 10^5$ leveduras (70% de *I. orientalis*, 20% de *Torulaspota* spp. e 10% de leveduras desconhecidas) como culturas iniciadoras para avaliar a adaptação e competitividade desses micro-organismos na fermentação de mandioca. No final da fermentação, a maioria das linhagens de culturas iniciadoras fez parte da microbiota dominante, sendo que *L. plantarum* foi a espécie predominante na massa fermentada de mandioca.

Yao *et al.* (2009), com o objetivo de selecionar culturas iniciadoras apropriadas para a fermentação da mandioca para a produção de *gari*, avaliaram o potencial de BAL pré-selecionadas como culturas liofilizadas adequadas. Linhagens de *L. plantarum* (que demonstraram alta concentração de células e alta taxa de sobrevivência após a liofilização, além de estabilidade durante o armazenamento), uma linhagem de *L. fermentum* (que apresentou capacidade de rápida acidificação e alto crescimento em caldo de Man, Rogosa e Sharpe – MRS, após o processo de desidratação) e uma linhagem de *W. paramesenteroides* (estável durante o armazenamento) foram

selecionadas para serem desenvolvidas como culturas iniciadoras liofilizadas para produção de *gari*.

Edward *et al.* (2011) investigaram o uso de linhagens liofilizadas de BAL como culturas iniciadoras também para a produção de *gari* e observaram que *L. plantarum* poderia ser produzido como cultura iniciadora a baixo custo. Dolly *et al.* (2011) utilizaram os métodos de secagem por liofilização e nebulização-liofilização e obtiveram *L. plantarum* microencapsulado com uma viabilidade celular 20% maior do que o obtido pela técnica de secagem por atomização em *spray dryer*.

Ramos *et al.* (2015), após identificar e caracterizar a microbiota presente no processo fermentativo e na bebida final, o *tarubá*, consideraram os isolados de *T. delbrueckii*, *P. exigua* e espécies do gênero *Bacillus* candidatos em potencial para uso como culturas iniciadoras em alimentos fermentados a partir da mandioca. Isso porque todos esses isolados apresentaram simultaneamente atividade amilolítica e proteolítica, propriedades de interesse para que ocorram alterações bioquímicas desejáveis durante o processo fermentativo dessa raiz.

L. plantarum, a espécie mais frequentemente isolada de fermentações espontâneas de mandioca, apresenta características de interesse para o desenvolvimento de culturas iniciadoras em vários processos tradicionais e industriais de fermentação de alimentos, tais como laticínios, vegetais, carnes, peixes, produtos de panificação e bebidas. Essa bactéria contribui para as propriedades sensoriais dos alimentos fermentados, principalmente sabor e textura. Devido à produção de ácido láctico e outros compostos antimicrobianos, *L. plantarum* também ajuda a assegurar a inocuidade do produto final, além de atuar como probiótico em alguns alimentos (TODOROV; FRANCO, 2010).

Uma linhagem de *L. plantarum* foi usada como cultura iniciadora para a produção de *fufu* a partir de farinhas de mandioca enriquecidas. A linhagem adicionada aumentou rapidamente a acidez titulável de 0,24 para 0,96% de ácido láctico em 24 h e para 1,18% em 96 h. Os autores concluíram que não só o uso de *L. plantarum* é viável para a produção de *fufu* a partir de mandioca enriquecida, como também é recomendado, devido à efetiva diminuição do pH em um tempo menor de fermentação (ROSALES-SOTO *et al.*, 2016).

Há relato de duas linhagens de *L. plantarum*, isoladas da cevada sul-africana, produtoras de α -amilase (HATTINGH *et al.*, 2015). Também há relato na literatura de linhagem de *L. plantarum* conhecidamente produtora de bacteriocina contra *B. cereus* (LV *et al.*, 2018). BAL com atividades antagonista e amilolítica permitem a otimização

dos processos fermentativos e auxiliam na garantia da inocuidade de alimentos fermentados, e são, portanto, altamente desejáveis como culturas iniciadoras. Abedfar *et al.* (2018) isolaram *L. plantarum* da massa de farelo de trigo e observaram que esses isolados eram capazes de produzir exopolissacarídeos com propriedade antioxidante em potencial. Além da atividade antioxidante, exopolissacarídeos produzidos por BAL também apresentaram propriedades de estabilização, emulsificação e gelificação de matrizes alimentares. No polvilho azedo, auxiliam na formação de uma estrutura viscoelástica responsável pela retenção de gás e, conseqüentemente, pela expansão da massa quando submetida ao aquecimento (MAEDA; CEREDA, 2001).

3.7 TÉCNICAS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE CULTURAS INICIADORAS NA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA

A fermentação espontânea de substratos amiláceos, como a mandioca, é utilizada mundialmente, resultando em uma variedade de produtos tradicionais. Estudos sobre a caracterização da microbiota de tais produtos revelaram a diversidade de BAL e leveduras envolvidas no processo fermentativo. Tradicionalmente, a identificação das espécies pertencentes à microbiota dessas fermentações se baseava apenas em testes fenotípicos (envolvendo critérios fisiológicos e padrões fermentativos) que são demorados, difíceis de interpretar e insuficientes na identificação de BAL (MOHAMMED *et al.*, 2009; VOGELMANN *et al.*, 2009). Esses testes clássicos vêm sendo substituídos por métodos moleculares que se mostraram mais rápidos, específicos e com maior poder de diferenciação (tanto no nível de espécies, quanto de linhagens) (SINGH *et al.*, 2009). Assim, as técnicas moleculares surgem como importantes ferramentas para identificar culturas iniciadoras em potencial, auxiliar no monitoramento do processo fermentativo e verificar a viabilidade das culturas iniciadoras inoculadas (BANWO *et al.*, 2012; GEVERS *et al.*, 2001).

Várias técnicas moleculares já foram utilizadas para estudar as fermentações tradicionais de mandioca e têm demonstrado eficiência, entre elas é possível citar: DGGE (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante), Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *fingerprinting*, RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso), rep-PCR (*Repetitive element sequence-based PCR*), PFGE (Eletroforese em Gel de Campo Pulsado) e RFLP (Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição).

Omar *et al.* (2000) estudaram a diversidade molecular de BAL isoladas da fermentação de mandioca para a produção de polvilho azedo utilizando as seguintes técnicas de monitoramento: RAPD, hibridização com sondas filogenéticas de RNA e sequenciamento parcial da subunidade 16S do gene do RNA. Os resultados revelaram a presença de *Lactobacillus manihotivorans*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. hilgardii*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. mesenteroides* e o gênero *Pediococcus*, sendo as duas primeiras as espécies predominantes.

Um total de 375 BAL foi isolado a partir da fermentação de mandioca e caracterizado por testes fenotípicos e genotípicos como linhagens pertencentes ao grupo *L. plantarum* (54,4%); ao gênero *Lactobacillus* ou *Weissella* (14,1%); e aos gêneros *Weissella* ou *Leuconostoc* (13,9%). Um total de 32 linhagens com propriedades bioquímicas desejáveis foram pré-selecionadas e identificadas utilizando *rep*-PCR *fingerprinting* em combinação com sequenciamento da região 16S do gene do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA). Dessas linhagens, dezoito foram identificadas como *L. plantarum*, quatro como *L. pentosus*, duas de cada como *L. fallax*, *W. paramesenteroides* e *L. fermentum*, uma de cada como *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* e *W. cibaria*, enquanto duas permaneceram não identificadas. Essas linhagens foram investigadas, utilizando RAPD-PCR, e, após a análise das relações clonais, 16 linhagens foram finalmente selecionadas para o posterior desenvolvimento de culturas iniciadoras para a produção de *gari* (KOSTINEK *et al.*, 2007).

Técnicas rápidas como DGGE e RFLP têm sido úteis para revelar a diversidade microbiana em alimentos (MEROOTH *et al.*, 2003). A DGGE de fragmentos do gene rRNA gerados por PCR demonstrou-se uma ferramenta útil para a caracterização rápida das espécies pertencentes à microbiota dominante da fermentação. PCR-DGGE foi utilizada com sucesso não apenas para caracterizar a microbiota, como também para monitorar o desenvolvimento de sua composição durante a fermentação a longo prazo (VOGELMANN *et al.*, 2009). Ampe *et al.* (2001), em um estudo molecular utilizando técnica independente de cultivo, DGGE, feito durante a fermentação tradicional de polvilho azedo, confirmaram que este processo é dominado pelas BAL.

A adaptabilidade de BAL e leveduras em massa azeda preparada a partir de cereais, pseudocereais e mandioca foi investigada por Vogelmann *et al.* (2009) usando as técnicas de PCR-DGGE e cultura bacteriológica combinados com RAPD-PCR e sequenciamento do gene do rRNA. As fermentações foram inoculadas com uma mistura de culturas iniciadoras, isoladas previamente a partir de fermentações tradicionais, e continuamente propagadas até que uma microbiota estável fosse estabelecida. Ao final

da fermentação da massa azeda de mandioca, as espécies presentes eram *S. cerevisiae*, *L. fermentum*, *Lactobacillus paralimentarius*, *L. plantarum* (espécie dominante) e *Lactobacillus spicheri*. Por comparação dos padrões de RAPD dos isolados obtidos da fermentação foi possível rastrear a origem das BAL e leveduras predominantes na microbiota.

A dinâmica e a diversidade de BAL durante a fermentação de mandioca para a produção de *gari* foram investigadas por Oguntoyinbo e Dodd (2010). Para o monitoramento microbiológico, eles utilizaram análise de sequenciamento do gene 16S do ácido desoxirribonucleico ribossômico (rDNA) a partir da análise de DNA da comunidade microbiana por PCR-DGGE e também PFGE, além de técnicas de cultivo utilizando diferentes meios seletivos. Com o sequenciamento dos amplicons obtidos por DGGE foram identificados *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. pentosus*, *L. acidophilus* e *L. casei*. A diversidade de leveduras durante a fermentação para a produção de *gari* foi estudada por Oguntoyinbo (2011) usando métodos independentes de cultivo baseados na região 18S do rDNA de eucariotos e PCR-DGGE. A análise do gene do rDNA 18S por sequenciamento dos fragmentos de bandas de PCR-DGGE encontrou as leveduras *I. scutulata* (atualmente conhecida como *P. scutulata*), *Candida rugopelliculosa*, *Candida maritime*, *Zygosaccharomyces rouxii* e *G. geotrichum*. O autor concluiu que a PCR-DGGE pode ser útil para identificar o perfil de leveduras *in situ* durante a fermentação, o que irá contribuir para a segurança dos alimentos tradicionais fermentados e também para a otimização da produção em larga escala.

Guyot *et al.* (2003) foram bem-sucedidos, ao caracterizar e diferenciar linhagens de *L. manihotivorans* isoladas de polvilho azedo usando análise de RFLP, ribotipagem e perfis de plasmídeos. Caetano (2018) utilizou a análise de RFLP aliada ao sequenciamento da região 16S do gene de rRNA para caracterizar a microbiota presente no processo de fermentação de mandioca para a produção de tucupi e identificou as seguintes BAL: *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* e *L. parabuchneri*. Penido *et al.* (2018) utilizaram a mesma técnica molecular para identificar as bactérias isoladas de uma polvilharia em Formiga (MG) e também para monitorar BAL selecionadas e utilizadas como culturas iniciadoras durante a fermentação em escala piloto da fécula de mandioca para a obtenção de polvilho azedo. Foi possível comprovar a permanência das linhagens iniciadoras inoculadas no início do processo fermentativo em escala piloto.

Apesar de ser frequente em fermentações tradicionais de mandioca, o estudo da diversidade das espécies estritamente relacionadas pertencentes ao grupo *L. plantarum* por métodos convencionais, sejam eles microbiológicos, fisiológicos ou bioquímicos, não

é o ideal. Esses métodos são demorados, difíceis de interpretar e, em alguns casos, ineficientes, o que se deve à presença de sequências altamente conservadas (DEVI *et al.*, 2016). Nesse contexto, as técnicas moleculares representam importantes ferramentas para o monitoramento de *L. plantarum*.

A técnica de rep-PCR foi reconhecida como uma técnica simples, barata e com alto poder discriminatório, além de ser considerada uma ferramenta confiável para classificar uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BANWO *et al.*, 2012; GEVERS *et al.*, 2001). A técnica de rep-PCR já foi utilizada para monitorar o domínio e a persistência de uma linhagem iniciadora de *L. plantarum* presente no pré-inóculo da fermentação. Esse método pode ser aplicado para monitorar o desempenho de uma linhagem de cultura iniciadora pura de forma rápida (DOLCI *et al.*, 2017). Banwo *et al.* (2012) caracterizaram e identificaram *L. plantarum* e *L. fermentum* como as espécies predominantes na massa fermentada de mandioca para a produção de *gari* com o objetivo do desenvolvimento de potenciais culturas iniciadoras. Para isso, utilizaram testes fenotípicos e as seguintes técnicas genotípicas: RAPD-PCR com o iniciador M13, rep-PCR com o iniciador (GTG)₅ e sequenciamento do gene 16S rRNA, também reconhecido como uma ferramenta importante na classificação de linhagens de BAL.

Em relação à identificação de leveduras, a técnica de PCR-*fingerprinting* se mostrou uma ferramenta eficiente. Silva-Filho *et al.* (2005) avaliaram a dinâmica da população de leveduras no processo de fermentação do etanol combustível e usaram PCR-*fingerprinting* com o iniciador microsatélite (GTG)₅ para discriminação das leveduras isoladas da fermentação em destilarias. Os isolados de leveduras produziram um padrão básico de bandas que possibilitou identificá-los como *S. cerevisiae*. Além disso, espécies semelhantes morfológicamente, tais como *Saccharomyces paradoxus* apresentaram um padrão de amplificação completamente diferente, o que provou a eficiência do método. Penido *et al.* (2018) usaram essa técnica com o iniciador (GTG)₅ para monitorar a levedura *P. scutulata* e conseguiram detectá-la até o 14º dia da fermentação em escala piloto para produção de polvilho. Ao identificar as leveduras predominantes durante a produção de *tucupi*, Caetano (2018) utilizou a mesma técnica molecular e concluiu que *Y. lipolytica*, *C. ethanolica* e *P. scutulata* eram as espécies de leveduras mais frequentes.

Assim, as técnicas moleculares são importantes ferramentas para a verificação da permanência das culturas iniciadoras na fermentação de mandioca para a obtenção de diferentes produtos. Essas culturas iniciadoras, por sua vez, se bem estabelecidas irão

contribuir para o processo fermentativo como um todo, resultando em benefícios não somente para o produtor (pois são capazes de, por exemplo, reduzir o tempo de fermentação), como para o consumidor (que terá disponível um produto de qualidade homogênea).

3.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS NA MANDIOCA E SEUS DERIVADOS

A mandioca é cultivada por suas raízes tuberosas ricas em amido, porém sabe-se que suas sementes são ricas em óleos e gorduras. Essa é uma característica inerente às sementes, pois representa uma das melhores maneiras de armazenamento de energia. Sementes pertencentes à coleção da Embrapa de Mandioca e Frutas foram avaliadas quanto à composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa. Os ácidos graxos encontrados em todas as espécies com teor médio desses foram: linoleico (61,5%); oleico (20,0%); palmítico (12,3%); esteárico (4,5%); e linolênico (1,7%) (ALVES *et al.*, 2014). Além dos ácidos graxos provenientes da matéria-prima, os micro-organismos também podem contribuir para a concentração desses uma vez que em organismos vivos, os lipídeos, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados, são componentes das membranas celulares e também resíduos do metabolismo microbiano. A variação da composição desses ácidos graxos nas membranas dos micro-organismos está sujeita a fatores externos como redução da atividade de água e aumento na temperatura.

Os ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico foram identificados como ácidos graxos celulares de cepas de *L. plantarum* e *Leuconostoc ssp. mesenteroides* (COULIBALY *et al.*, 2009). Vanaja *et al.* (2011) também relataram que isolados nativos de *L. plantarum* e isolados adaptados para resistir ao trato gastrointestinal (TGI) foram capazes de produzir ácidos graxos. Entre os ácidos graxos produzidos pelos isolados nativos estão: ácido oleico (19,2%); ácido palmítico (44,0%) e ácido esteárico (14,5%). Além dos ácidos graxos citados, os isolados microbianos adaptados para resistir ao TGI também produziram 2,3% de ácido linoleico. Em relação aos compostos voláteis, os isolados nativos produziram 7,8% de ácido nonahexacontanoico.

Freire *et al.* (2015) produziram *yakupa* utilizando culturas puras e mistas de *L. fermentum* e cinco cepas de leveduras, e avaliaram os compostos voláteis produzidos.

Na fermentação utilizando a cultura pura de *S. cerevisiae* CCMA 0232, foram detectados: ácido palmítico (0,097 µg/L) e ácido esteárico (0,024 µg/L). Na fermentação utilizando a cultura pura de outra linhagem de *S. cerevisiae* (CCMA 0233), foram identificados: ácido linoleico (0,009 µg/L) e ácido palmítico (0,019 µg/L). E na fermentação utilizando a cultura pura de *Torulospora delbrueckii* CCMA 0235, foram quantificados: ácido linoleico (0,016 µg/L); ácido palmítico (0,414 µg/L); ácido esteárico (0,075 µg/L), além de ácido oleico (0,061 µg/L). As leveduras também tiveram, portanto, papel importante na produção dos ácidos graxos dessas fermentações. As variações na síntese dos ácidos graxos de diferentes micro-organismos também podem influenciar no ecossistema fermentativo e, conseqüentemente, no produto final.

Em relação aos compostos voláteis, Freire *et al.* (2015) detectaram 22 compostos diferentes após 48 h de fermentação, os quais variaram entre as culturas puras e mistas. Foram detectados em ambas culturas o álcool 2-feniletílico, o álcool isoamílico e a acetoína. Os autores concluíram que culturas mistas contendo BAL e leveduras foram capazes de melhorar o perfil de aroma do produto final, além de contribuir para redução do pH e inocuidade do produto final.

A produção de ácidos carboxílicos em alimentos obtidos a partir de fermentações tradicionais de mandioca já foi relatada na literatura (MOORTHY; MATHEW, 1998). Em *gari*, foram encontrados os seguintes ácidos carboxílicos: acético, propiônico, butírico, isobutírico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico, linoleico e linolênico. Em *fufu*, foram identificados os ácidos: acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico. Em polvilho azedo, já foi detectada a presença dos ácidos acético e butírico, além do ácido láctico que representou 66 a 82% do ácido produzido (CÁRDENAS; BUCKLE, 1980).

Desta forma, a adição de culturas iniciadoras, sejam elas puras ou mistas com associação entre BAL e leveduras, ao processo fermentativo pode representar um benefício para o produto final, contribuindo para o aumento do teor de ácidos graxos e também de compostos voláteis de interesse.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Onze isolados de *Lactobacillus plantarum*, doze isolados de *Lactobacillus brevis* e onze isolados de *Pichia scutulata* identificados em uma polvilharia localizada em Formiga (MG) (PENIDO, 2013) foram incluídos no presente estudo, bem como o fermento biológico seco instantâneo (Dr. Oetker, Bielefeld, Alemanha), composto por *Saccharomyces cerevisiae* desidratado e pelo emulsificante monoestearato de sorbitana, conforme indicado pelo fabricante, e foram submetidos a uma seleção visando definir a melhor cultura iniciadora para a produção de polvilho azedo. Os isolados foram numerados cronologicamente de acordo com as sucessivas coletas realizadas na polvilharia e foram utilizadas as siglas *Lb* para os isolados de *L. brevis*, *Lp* para os isolados de *L. plantarum* e *Ps* para os isolados de *P. scutulata*.

O fermento comercial foi incluído como cultura iniciadora no presente estudo devido ao relato dos produtores da polvilharia em Formiga (MG) do seu uso bem-sucedido na fermentação de mandioca para obtenção de polvilho azedo, com redução do tempo de fermentação de 56 dias para cerca de 20 dias. Além disso, existem relatos na literatura da presença de *S. cerevisiae* em fermentações tradicionais de mandioca (COULIN *et al.*, 2006; FREIRE *et al.*, 2014; OYEWOLE, 2001; PADONOU *et al.*, 2009; PADONOU *et al.*, 2010).

4.1.1 Reativação dos micro-organismos

Após o descongelamento das BAL, uma alçada do microtubo contendo cada um dos isolados foi inserida em um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo MRS (Acumedia, Lansing, MI, EUA) esterilizado. Este tubo foi incubado em estufa a temperatura de 37 °C por 48 h. Após este período, foi inoculada uma alçada do caldo em placas de Petri com ágar MRS esterilizado, o material foi estriado e as placas foram incubadas invertidas em jarras de anaerobiose de 2,5 L (Permutation, Curitiba, PR, Brasil) com gerador e indicador de anaerobiose Anaerobac (Probac, Santa Cecília, SP, Brasil), para um melhor crescimento das colônias, a 37 °C por 48 h. A partir das culturas puras, foram realizados

os testes de coloração de Gram e a reação de catalase (NORRIS *et al.*, 1981) para verificação de sua pureza.

Após o descongelamento das leveduras, uma alçada do microtubo contendo cada um dos isolados foi inserida em um tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo GYMP (*Glucose - Yeast extract - Malt extract - Phosphate* – glicose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, e fosfato de sódio monobásico 0,2%) esterilizado. Este tubo foi incubado em estufa a temperatura de 30 °C por 48 h. Após este período, foi inoculada uma alçada do caldo em placas de Petri com ágar YM (*Yeast extract - Malt extract* – extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1,0%, ágar 2,0% - Acumedia, Lansing, MI, EUA). O material foi estriado para verificação da pureza e as placas foram incubadas invertidas em condições de aerobiose a 30 °C por 48 h.

4.2 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GRUPO *Lactobacillus plantarum*

Os onze isolados presumivelmente identificados por sequenciamento da região 16S do gene do rRNA como pertencentes ao grupo de *L. plantarum* foram submetidos à análise de PCR Multiplex com os seguintes primers derivados do gene *recA*: 5'-TT(C,T) AT(A,T,C) GA(C,T) GC(A,T,C,G) GA(A,G) CA(C,T) GC-3' (primer iniciador, correspondente à região de aminoácidos 92 a 98 da proteína *recA* de *Escherichia coli*) e 5'-CC (A,T) CC(A,T) G(T,G) (A,T) GT(A,T,C) GT(C,T) TC(A,T,C,G) GG-3' (primer reverso, correspondente à região de aminoácidos 206 a 211 da proteína *recA* de *E. coli*). Esta análise permite a separação das três espécies estreitamente relacionadas do grupo *L. plantarum* por comparação do tamanho de seus amplicons: 107 pares de base (pb) para *Lactobacillus paraplantarum*, 218 pb para *Lactobacillus pentosus* e 318 pb para *L. plantarum* (TORRIANI *et al.*, 2001).

4.3 DIFERENCIAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Lactobacillus plantarum*

Os onze isolados presumivelmente identificados por sequenciamento da região 16S do gene do rRNA como pertencentes ao grupo de *L. plantarum* e confirmados como pertencentes à espécie *L. plantarum* pela análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene *recA* foram submetidos à técnica de amplificação por *rep*-PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGT-3') adaptada de

Gevers *et al.* (2001) para verificação da ocorrência de diferentes linhagens entre os isolados. A diferenciação de linhagens deve ser uma das primeiras etapas na seleção de bactérias como culturas iniciadoras. Isso porque as capacidades tecnológicas, probióticas, antagonistas e ainda as sensoriais são específicas de cada linhagem (ADESULU-DAHUNSI *et al.*, 2017a; ADESULU-DAHUNSI *et al.*, 2017b; DE LAS RIVAS *et al.*, 2006).

Primeiramente, o DNA bacteriano foi extraído utilizando o método lítico adaptado de Zanirati (2012). Colônias puras de cada uma das BAL foram ressuspensas em 1 mL de cloreto de lítio, levadas ao Vortex (QL-901, Biomixer, Santa Clara, CA, EUA) e deixadas em repouso por 15 min. Agitadas novamente e mantidas em repouso por mais 15 min. Os tubos, contendo essa suspensão, foram lavados duas vezes com 1 mL de tampão fosfato salino ou *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e centrifugadas por 5 min a 8.000 rpm (MiniSpin® Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Decorrido esse tempo, foram adicionados 500 µL de tampão de lise aos tubos, os quais foram levados ao Vortex e, em seguida, à incubadora *shaker* de bancada CT712 (Cientec, Viçosa, MG, Brasil) a 37 °C por 1 h a 150 rpm. Em seguida, adicionou-se 10 µL de proteinase K e os tubos foram incubados a 55 °C por 1 h em banho-maria. A suspensão foi transferida para tubo cônico contendo 0,3 g de microesferas de zircônia, que foi agitado por 30 min no Analog Disruptor Genie®. O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo, onde foram adicionados 500 µL da mistura de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1). Os tubos foram homogeneizados e centrifugados a 12.000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e foram adicionados 1/10 do volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após homogeneização, os tubos foram armazenados em freezer a -20 °C *overnight*. Decorrido este período, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 12 min, para posterior remoção do sobrenadante, e seca em estufa a 75 °C por 10 min. Ao final, foram adicionados 50 µL de Tris-EDTA (TE).

A purificação do DNA foi realizada com o auxílio do *Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System* (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, EUA). Para isso, adicionou-se 200 µL de tampão de lise aos tubos e todo o conteúdo foi vertido em um novo tubo contendo sílica, para retenção do DNA. Estes tubos foram centrifugados a 13.000 rpm por 3 min e o líquido residual foi descartado. Adicionou-se 650 µL de etanol e foi feita uma nova centrifugação a 13.000 rpm por 1 min, sendo esta etapa repetida. O conteúdo foi eluído com 100 µL de água livre de nucleases aquecida a temperatura de 70 °C. Após 3 min, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 3 min. O DNA purificado foi,

então, dosado no espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) no comprimento de onda de 230 nm.

Para a reação de amplificação por *rep*-PCR *fingerprinting*, em um volume final de 20 µL, foram utilizados 10 µL de Pré-Mix IV-B 2X (Phoneutria, Belo Horizonte, MG, Brasil), 20 µM do iniciador (GTG)₅ 10 u/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1 µM de MgCl₂, e 50 ng de DNA. A amplificação ocorreu através de uma desnaturação inicial a 94 °C por 7 min, 30 ciclos contendo os passos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 40 °C por 1 min e extensão a 65 °C por 8 min. A reação foi finalizada com uma extensão final a 65 °C por 16 min. Os amplicons obtidos foram separados por 16 horas a 1,55 V/cm em gel de agarose (Pronadisa, Madri, Espanha) a 1,5%.

4.4 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA A PRODUÇÃO DE POLVILHO

4.4. 1 Atividade antagonista

Os isolados de BAL identificadas em estudo anterior (PENIDO, 2013) como pertencentes às espécies *L. plantarum* e *L. brevis* foram testados, em triplicata, quanto à atividade antagonista contra linhagens de *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella* Typhimurium CCD S004 pelo método de *spot-on-lawn* para verificar atividade inibitória direta de acordo com a metodologia adaptada de Moraes (2015). Esses patógenos foram escolhidos com base nos parâmetros microbiológicos para amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados, contidos na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), que preconiza, para a matriz em questão, a realização das seguintes análises microbiológicas: *Bacillus cereus*, Coliformes a 45 °C e *Salmonella* spp.

A análise da atividade inibitória direta baseou-se no cultivo dos isolados em ágar MRS com a ajuda de um palito de dente esterilizado e subsequente incubação em jarras de anaerobiose de 2,5 L a 37 °C durante 48 h. Após este período de crescimento das BAL, as placas foram colocadas de cabeça para baixo e 1 mL de clorofórmio (Fmaia, Belo Horizonte, MG, Brasil) foi introduzido em suas tampas. Aproximadamente 30 min, foi o tempo necessário para inativar as culturas e reter apenas os metabólitos produzidos e distribuídos através do ágar.

O sobrenadante com as culturas reveladoras foi constituído por linhagens de *B. cereus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, que foram previamente cultivadas em caldo BHI (*Brain*

Heart Infusion – Merck®, Darmstadt, Alemanha), caldo EC (*Escherichia coli* – ISO FAR, MG, Brasil) e caldo de enriquecimento Selenito-Cistina (ISO FAR, MG, Brasil), respectivamente. As culturas reveladoras foram incubadas a 37 °C durante 48 h. Na preparação dos sobrenadantes de *B. cereus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*, 500 µL, 300 µL e 500 µL dos caldos incubados foram inoculados em 15 mL de ágar BHI, ágar nutriente e ágar nutriente semissólidos 0,9%, respectivamente.

As colônias de BAL crescidas em ágar MRS foram seladas com BHI semissólido ou ágar nutriente 0,9% esterilizados e, logo depois, foi adicionada uma sobrecamada de 15 mL de ágar semissólido contendo cada uma das culturas reveladoras. Após a solidificação, a placa foi incubada a 37 °C durante 48 h para posterior interpretação dos resultados. Os halos de inibição formados em torno do local de inóculo das BAL, que consistiam em uma zona clara ao redor delas, indicaram a inibição das bactérias patogênicas. Placas com BAL cujos botões de crescimento estavam irregulares foram desconsideradas. Os diâmetros desses halos, incluindo o diâmetro das colônias, foram medidos utilizando um paquímetro universal (Série 530, Mitutoyo, Takatsu-ku, Kanagawa, Japão).

4.4.2 Capacidade amilolítica

Todos os isolados de *L. plantarum* e *L. brevis* foram testados em triplicata quanto à produção de α -amilase em ágar MRS modificado contendo 0,2% de amido solúvel em vez de glicose (peptona bacteriológica 1,0%, extrato de carne 1,0%, extrato de levedura 0,5%, acetato de sódio 0,5%, amido solúvel 0,2%, fosfato de potássio 0,2%, Tween® 80 0,1%, citrato de amônio 0,2%, sulfato de magnésio 0,01%, sulfato de manganês 0,005% e ágar 1,5%) (KOSTINEK *et al.*, 2005). As placas foram incubadas a 30 °C *overnight*. Após o crescimento, a revelação foi realizada com solução de iodo para visualização da hidrólise do amido, caracterizada por uma área incolor em torno da colônia.

A habilidade de produzir amilase dos onze isolados de *Pichia scutulata* foi testada em triplicata conforme metodologia descrita por Oyewole (2001), que consiste em cobrir com solução de iodo, durante 2 a 5 minutos, os inóculos das culturas após 72 horas de crescimento em placas de ágar Batata Dextrose contendo 2% de amido solúvel. A produção de amilase é evidenciada por um halo claro em torno das colônias enquanto o restante da placa permanece com a coloração azul escuro. Este teste foi repetido variando o meio de cultura, utilizando ágar YM. Como controles positivos foram utilizadas

linhagens amilolíticas das leveduras *Cryptococcus magnus* e *Cryptococcus adaliensis*, provenientes da coleção de cultura de leveduras do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia do ICB da UFMG.

4.4.3 Capacidade de acidificação

Também foi avaliada a produção de ácidos totais pelo inóculo dos isolados em 100 mL de caldo contendo 2% de fécula de mandioca (Marinêz, Bom Despacho, MG, Brasil), 1% de glicose e 0,5% de extrato de carne (LACERDA, 2006), sendo o processo fermentativo mantido por 24 a 48 horas. Em seguida, alíquotas de 10 mL do caldo foram retiradas e utilizadas para a dosagem de acidez total por titulometria com hidróxido de sódio 0,1 M utilizando fenolftaleína como indicador, segundo AOAC (2016).

4.5 PRODUÇÃO DE POLVILHO EM ESCALA PILOTO

Para a produção de polvilho azedo em escala piloto foram avaliadas quatro culturas iniciadoras contendo os isolados previamente selecionados, sendo duas culturas puras e duas culturas mistas (associação de BAL e levedura). Os experimentos foram realizados em quatro blocos, sendo que cada um dos blocos continha as quatro culturas iniciadoras ordenadas de forma aleatória, totalizando quatro repetições para cada cultura iniciadora.

As culturas iniciadoras testadas foram:

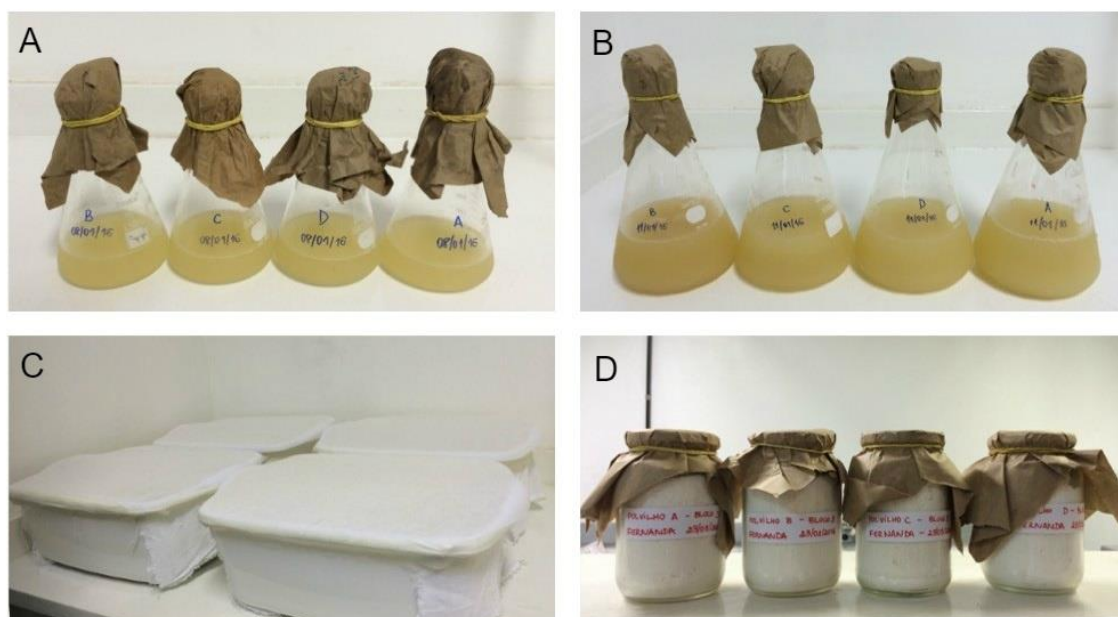
- **A:** *Lactobacillus plantarum* (isolado Lp3);
- **B:** *Lactobacillus plantarum* (isolado Lp3) em associação com *Pichia scutulata* (isolado Ps9);
- **C:** *Lactobacillus plantarum* (isolado Lp3) em associação com o fermento comercial (composto principalmente por *Saccharomyces cerevisiae*);
- **D:** Fermento comercial (composto principalmente por *S. cerevisiae*).

Culturas puras do isolado de BAL selecionado (*L. plantarum* Lp3) e do fermento comercial, além de culturas mistas do isolado da BAL em associação com as leveduras (fermento comercial e *P. scutulata* Ps9) foram inoculadas em triplicata em 100 mL de meio de cultura líquido contendo 2% de fécula de mandioca, 1% de glicose, 0,5% de

extrato de carne e incubadas a temperatura ambiente por um período entre 24 a 48 h (Figura 2A). Em seguida, todo o cultivo foi empregado para inocular 500 mL do mesmo meio de cultivo, mantido em condições de temperatura ambiente, por um período de aproximadamente 24 a 48 h (Figura 2B). O cultivo resultante foi usado para inocular 5 L de um meio contendo água destilada e 10% de fécula de mandioca à temperatura ambiente por 21 dias (LACERDA, 2006; PENIDO, 2013). As contagens do inóculo inicial nos biorreatores de 5 L foram cerca de $7 \log_{10}$ UFC/mL para os isolados de BAL e de 5 a $6 \log_{10}$ UFC/mL para as leveduras. Foram empregadas como biorreatores bacias de plástico com características que se assemelham às condições de fermentação empregadas na indústria (polvilharia), como formato e dimensões. Assim, a fermentação foi realizada em bacias retangulares com 39,4 cm de comprimento, 31,9 cm de largura, 15,4 cm de profundidade e com um volume total de 11,7 L. As bacias foram cobertas com um tecido reticulado de algodão em formato retangular para evitar a entrada de insetos (Figura 2C). Todos os ensaios foram realizados sem aeração (agitação) (PENIDO, 2013).

Foram coletadas amostras de 10 mL de vários pontos do biorreator com 0 (tempo inicial), 7, 14 e 21 dias de fermentação. Estas amostras foram analisadas quanto ao valor de pH, por leitura direta do líquido sobrenadante em pHmetro, e acidez total titulável (ATT), por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M utilizando solução de fenolftaleína como indicador (AOAC, 2016). Além disso, verificou-se a viabilidade das culturas iniciadoras. Após o final da fermentação, o material foi seco ao sol por aproximadamente 8 horas. Em seguida, foi acondicionado em frascos esterilizados e armazenado sob temperatura de refrigeração até a realização dos testes (Figura 2D).

Figura 2 – Produção de polvilho azedo em escala piloto: Inóculos das culturas iniciadoras em erlenmeyers de 100 mL (A); Inóculos das culturas iniciadoras em erlenmeyers de 500 mL (B); Biorreatores (bacias de plástico) no qual foram realizadas as fermentações (C); Polvilho armazenado em frascos esterilizados (D)



4.6 MONITORAMENTO DAS CULTURAS INICIADORAS DURANTE A FERMENTAÇÃO EM ESCALA PILOTO

O monitoramento das culturas iniciadoras durante a fermentação da fécula de mandioca para a produção de polvilho azedo, em escala piloto, isto é, a verificação da permanência da(s) linhagem(ns) iniciadora(s), foi realizado por técnicas moleculares, sendo as amostras coletadas semanalmente.

4.6.1 Monitoramento molecular das bactérias do ácido láctico

4.6.1.1 Isolamento das bactérias do ácido láctico

As bactérias do ácido láctico (BAL) foram isoladas a partir do plaqueamento em superfície das amostras retiradas da fermentação em ágar MRS acrescido de 0,01% de ciclohexamida (MIDURA; BRYANT, 2001). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose de 2,5 L a 37 °C por 48 horas. Decorrido este período, foram realizadas as contagens das BAL viáveis expressas em UFC/g. Foi selecionada uma colônia de cada

cultura iniciadora por semana e por bloco para ser purificada e crescida em caldo MRS a 37 °C por 48 horas em anaerobiose e, então, congelada em criotubo esterilizado em freezer a - 86 °C, após a adição de 10% de glicerol esterilizado, para posterior identificação. A partir das culturas puras foram realizados os testes preliminares de coloração de Gram e a reação de catalase (NORRIS *et al.*, 1981).

4.6.1.2 Extração de DNA das bactérias do ácido láctico

O DNA total das BAL foi extraído a partir de uma adaptação do método descrito por Hoffman e Winston (1987). As colônias previamente crescidas em ágar MRS foram ressuspensas em 100 µL de TE. A seguir, foram adicionados 100 µL da mistura de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e 0,3 g de pérolas de vidro à suspensão. Os tubos contendo essa mistura foram então levados ao Vortex por 3 a 4 min e centrifugados a 13.000 rpm por 5 min (MiniSpin® Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Decorrido o tempo, retirou-se o sobrenadante, que foi transferido para outro tubo. Então, adicionou-se ao tubo um volume de etanol a 96% correspondente ao volume de sobrenadante recuperado. Os tubos foram então homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por 2 min (MiniSpin® Eppendorf). A fase líquida foi descartada, os tubos foram secos *overnight* e o DNA ressuspensado em 50 µL de TE. A dosagem de DNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) no comprimento de onda de 230 nm.

4.6.1.3 Amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA

O DNA das BAL foi submetido à amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA, utilizando-se os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') conforme Lane (1991). Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas, Newington, NH, EUA), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 3 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas, Newington, NH, EUA), 1 µL do iniciador 27F 10 u/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1 µL do iniciador 1492R 10 u/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,25 µL de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas, Newington, NH, EUA) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 µL. A reação foi realizada em

um termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por um 90 s, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 min.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Madri, Espanha) a 1% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5%. O material foi submetido a eletroforese a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem.

4.6.1.4 Análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP

O monitoramento da presença das BAL utilizadas como culturas iniciadoras no processo de produção de polvilho em escala piloto foi realizado pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP por meio da digestão com as três enzimas de restrição, *MspI*, *HaeIII* e *HinfI* (Promega Corporation, Madison, WI, EUA), capazes de diferenciar as espécies de BAL, seguindo a metodologia de Brightwell *et al.* (2006) modificada. Para a reação de digestão, foram adicionados a cada tubo 2 µL de tampão 10X, 2 µL de Albumina Sérica Bovina (BSA) apenas para a enzima *MspI*, 1 µL de enzima, DNA ≤ 1500 ng/µL e água q.s.p. 20 µL. Os tubos foram incubados a 37 °C por 3 h.

Os fragmentos de restrição obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2% em tampão TBE 0,5% a 100 V. Os géis foram corados com solução de GelRed™ e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem. Foi feita a comparação dos perfis moleculares obtidos com os perfis moleculares da BAL identificada em estudo anterior (PENIDO, 2013) e entre as BAL isoladas nos diferentes tempos 0 (cultura iniciadora pura), 7, 14 e 21 dias.

Além disso, foi feito o monitoramento das linhagens de BAL utilizadas como culturas iniciadoras nos tempos inicial (0) e final (21 dias), conforme metodologia descrita no item 4.3.

4.6.2 Monitoramento molecular das leveduras

4.6.2.1 Isolamento das leveduras

As leveduras foram isoladas em ágar YM, contendo 0,02% de cloranfenicol. As placas foram incubadas aerobicamente por 48 h a 25 °C (MIDURA; BRYANT, 2001). As leveduras foram quantificadas, sendo a contagem dos isolados expressa em UFC/g. Uma colônia de cada cultura iniciadora de cada bloco e de cada semana foi purificada e cultivada em caldo GYMP a 25 °C por 48 h e então congelada em criotubos esterilizados em freezer a - 86 °C, após a adição de 20% de glicerol esterilizado.

4.6.2.2 Extração de DNA das leveduras

O DNA total de cada isolado das leveduras foi extraído utilizando a metodologia de Silva-Filho *et al.* (2005) adaptada. As leveduras, depois de serem crescidas em ágar YM, foram ressuspensas em 100 µL de tampão de lise (Tris-HCL – trishidroximetilaminometano – 0,05 M, EDTA 0,05 M, NaCl 0,1 M e SDS – sódio dodecil sulfato – 1%). Os tubos, contendo essa suspensão, foram incubados em banho-maria a 65 °C por 35 min. Decorrido esse tempo foram adicionados 100 µL da mistura de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) aos tubos e esses levados ao Vortex por 3 min e centrifugados por 15 min (MiniSpin® Eppendorf). O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo, onde foram adicionados 100 µL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por 3 min (MiniSpin® Eppendorf). O etanol foi removido e os tubos foram secos *overnight*. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 100 µL de TE, e armazenado em freezer a - 20 °C. A dosagem de DNA foi realizada por método espectrofotométrico conforme descrito no item 4.6.1.2.

4.6.2.3 Análise dos perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting*

O monitoramento da presença das leveduras utilizadas como culturas iniciadoras foi realizado por análise dos perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador microsatélite (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3'), seguindo a metodologia

de Lieckfeldt *et al.* (1993). Para a reação, foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas, Newington, NH, EUA), 1 µL de dNTP 0,1 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador (GTG)₅ 10 u/µL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas, Newington, NH, EUA) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 25 µL. A PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 s, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min, seguidos de extensão final a 72 °C por 6 min.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Madri, Espanha) a 1% em tampão TBE 0,5% (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) e submetidos a eletroforese a 80 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França). Foi feita a comparação dos perfis moleculares obtidos com os perfis moleculares da levedura previamente isolada (PENIDO, 2013) e entre as leveduras isoladas nos diferentes tempos 0 (cultura iniciadora pura), 7, 14 e 21 dias.

4.6.3 Monitoramento molecular do fermento comercial

4.6.3.1 Isolamento de *Saccharomyces cerevisiae*

As leveduras com morfologia característica de *Saccharomyces cerevisiae* foram isoladas, quantificadas e congeladas conforme descrito no item 4.6.2.1.

4.6.3.2 Extração do DNA mitocondrial

A extração do DNA mitocondrial (mtDNA) das leveduras isoladas do fermento comercial foi realizada conforme metodologia descrita por Querol e Barrio (1990) e Querol *et al.* (1992) com algumas modificações. As células foram crescidas em 1,2 mL de meio YPD (*Yeast extract - Peptone - Dextrose* – extrato de levedura 1%; peptona 2% e glicose 1%) em temperatura entre 26 e 28 °C com incubação *overnight* sob agitação e, então, centrifugadas a 12.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*

foi lavado em água destilada esterilizada e, em seguida, centrifugado sob as mesmas condições citadas acima. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 500 µL de Solução I (Sorbitol 0,9 M e EDTA 0,1 M) e 30 µL da enzima *Ítica Zimoliase 20 T* (1 µg/µL dissolvida na Solução I) foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados no Vortex e incubados a 37 °C por 30 min para a liberação dos protoplastos.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 min a temperatura ambiente e, em seguida, o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspensionado, suavemente com a ajuda de uma ponteira, em 500 µL da Solução II (Tris-HCl 50 mM e EDTA 20 mM com pH 7,4) e 13 µL de SDS 10% foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados por inversão e incubado a 65 °C por 5 min. Em seguida, adicionou-se às amostras 200 µL de acetato de potássio 3 M e estas foram colocadas no freezer a - 20 °C por 1 h. Após esse procedimento, as células foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 min a 4 °C.

As amostras foram colocadas no gelo e o sobrenadante transferido, cuidadosamente, para outro tubo esterilizado, 700 µL de isopropanol foram adicionados. Os tubos foram homogeneizados suavemente por inversão e mantidos por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min e o sobrenadante descartado cuidadosamente. Adicionaram-se 500 µL de etanol 70%, para a lavagem do DNA, aos tubos, os quais foram centrifugados por 5 min a 12.000 rpm. Após a lavagem, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o DNA foram deixados na posição invertida por 10 min para a evaporação do etanol. A eliminação completa do etanol foi realizada pela colocação dos tubos em estufa a 37 °C por 30 min. O DNA foi, então, hidratado com 20 µL de água tratada com pirocarbonato de dietila (DEPC), livre de RNases, DNases e resíduos de proteínas e armazenado à temperatura de - 20 °C.

4.6.3.3 Análise dos perfis moleculares obtidos por digestão

A digestão do DNA foi realizada utilizando-se 20 µL do DNA total acrescido de 10 µL de uma mistura contendo 4,0 µL de água tratada com DEPC, livre de RNases, DNases e resíduos de proteínas, 3 µL de tampão 10X da enzima *Hinfl* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 µL de RNase (20 mg/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 1,5 µL da enzima de restrição *Hinfl* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Os tubos foram incubados à

temperatura de 37 °C *overnight*. Os produtos da digestão (acrescidos de GelRed™ e tampão de corrida 6X) foram separados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% (80 V por 150 min) em TBE 0,5X. Os perfis de restrição do mtDNA gerados foram visualizados sob luz UV e fotografados utilizando um sistema de captação de imagem. Foi feita a comparação dos perfis moleculares obtidos entre os isolados nos diferentes tempos 0 (cultura iniciadora pura), 7, 14 e 21 dias.

4.7 TESTES FÍSICO-QUÍMICOS DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO

As características físico-químicas dos diferentes polvilhos produzidos em escala piloto, ATT e a análise de expansão da massa, foram utilizadas como critérios para avaliar as culturas iniciadoras testadas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A ATT foi determinada por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína e foi expressa em mililitros de NaOH por 100 g de matéria seca (AOAC, 2016).

A análise de expansão da massa foi realizada conforme procedimento proposto pelo Centro de Raízes Tropicais – CERAT (MAEDA; CEREDA, 2001). Foram pesados 50 g do polvilho, aos quais se adicionaram cerca de 40 mL de água destilada fervente. Cada massa foi modelada para a confecção de biscoitos redondos de aproximadamente 10 g cada. Os diâmetros dos biscoitos foram medidos com um paquímetro universal antes e depois de levá-los ao forno por um período de 20 min a 220 °C. O índice de expansão foi calculado pela relação entre diâmetro médio final (após assado) e o diâmetro médio inicial (antes de assado).

4.8 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A fécula de mandioca, utilizada como matéria-prima nas fermentações em escala piloto, e os diferentes polvilhos produzidos foram avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos para amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados, contidos na Resolução RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). Foram realizadas análises microbiológicas de *Bacillus cereus*, pelo método de contagem em placa de ágar MYP (*Mannitol - Egg Yolk - Polymyxin* – Manitol - Gema de Ovo - Polimixina; Acumedia, Lansing, MI, EUA) para *B. cereus* em alimentos; Coliformes a 45 °C, pelo método do

Número Mais Provável para coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* em alimentos; e *Salmonella* spp., pelo método de presença/ausência de *Salmonella* em 25 g dos alimentos (BENNETT; BELAY, 2001; DA SILVA *et al.*, 2012).

4.9 CROMATOGRAFIA GASOSA

As amostras dos polvilhos obtidos com as duas melhores culturas iniciadoras em escala piloto, selecionadas anteriormente, foram então submetidas a análises posteriores de cromatografia gasosa. Além disso, também foram analisadas amostras de fécula de mandioca, polvilho doce comercial e polvilho azedo comercial.

4.9.1 Análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa

4.9.1.1 Extração dos lipídeos

Em erlenmeyer de 1 L, foram pesadas alíquotas de aproximadamente 200 g de cada amostra:

- Fécula de mandioca comercial;
- Polvilho doce comercial;
- Polvilho azedo comercial;
- Polvilho obtido com a primeira cultura iniciadora selecionada;
- Polvilho obtido com a segunda cultura iniciadora selecionada.

As amostras foram cobertas com quantidade suficiente (cerca de 200 mL) de hexano (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil). Em seguida, as amostras foram agitadas em *shaker* a 25 °C, 150 rpm por 1 h. Após a decantação das amostras, o sobrenadante foi transferido para um béquer de 500 mL para evaporação do solvente na capela de exaustão. A etapa de adição de solvente, agitação em *shaker* e retirada do sobrenadante foi repetida, totalizando um volume de cerca de 400 mL de hexano. Todo o solvente foi evaporado na capela de exaustão. A fração lipídica foi, então, ressuspensa em 500 µL de hexano e transferida para criotubos de 2 mL com tampa de rosca. O hexano foi totalmente evaporado com o auxílio de um banho-maria a 60 °C. Os criotubos foram embrulhados em folha de alumínio e armazenados em temperatura de geladeira até a execução das análises.

4.9.1.2 Perfil de ácidos graxos

Os perfis de ácidos graxos das amostras de fécula de mandioca e polvilho azedo foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Sande *et al.* (2018) com algumas modificações. Primeiramente, foi feita a hidrólise de cerca de 1 mg dos lipídeos com 100 µL de uma solução de hidróxido de sódio 1 mol/L em etanol 95% no forno de micro-ondas doméstico (Electrolux MTO30) com 30% de potência durante 4 min. Após resfriamento, foram adicionados 4 µg de NaCl, 400 µL de ácido clorídrico 20% e 600 µL de acetato de etila. Na sequência, o material foi submetido a agitação seguida por repouso de 5 min. Retirou-se 300 µL da camada orgânica que foi seca por evaporação para obtenção dos ácidos graxos livres, os quais foram metilados com BF₃ em metanol (14%) e aquecidos por 10 min em banho-maria a 60 °C. Por fim, as amostras foram diluídas com 500 µL de hexano para posterior análise por cromatografia gasosa utilizando o Cromatógrafo a Gás HP5890 equipado com detector por ionização de chamas. Foi utilizada uma coluna Supelcowax-10 (30 m x 0,2 mm x 0,2 µm) (Supelco) com o seguinte gradiente de temperatura: 150 °C, 0 min; aumentando 10 °C /min até 240 °C. O injetor *split* operou a 1/50 na temperatura de 250 °C, que também foi a temperatura usada no detector. O gás hidrogênio foi utilizado como gás de arraste com taxa de fluxo de 4 mL/min e volume de injeção de 1 µL. A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados (*Fatty Acid Methyl Ester – FAME*) C14 - C22 (Supelco-18917).

4.9.2 Análise de compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

4.9.2.1 Extração dos compostos voláteis

Em erlenmeyer de 125 mL, foram pesadas alíquotas de aproximadamente 25 g de cada amostra:

- Fécula de mandioca comercial;
- Polvilho doce comercial;
- Polvilho azedo comercial;
- Polvilho obtido com a primeira cultura iniciadora selecionada;
- Polvilho obtido com a segunda cultura iniciadora selecionada.

As amostras foram cobertas com quantidade suficiente (cerca de 30 mL) de hexano (grau HPLC) (Merck®, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, as amostras foram agitadas em *shaker* a 25 °C, 150 rpm por 1 h. O sobrenadante contendo os compostos voláteis foi transferido para um béquer de 250 mL para evaporação do solvente na capela de exaustão. A etapa de adição de solvente, agitação em *shaker* e retirada do sobrenadante foi repetida mais duas vezes, totalizando um volume de cerca de 90 mL de hexano por amostra. Quando o volume do solvente de cada uma das amostras estava próximo a 1 mL, o solvente foi transferido com o auxílio de um pipetador automático para frascos de 2 mL com tampa identificados. Os frascos foram armazenados em temperatura de geladeira até a execução das análises.

4.9.2.2 Identificação de compostos voláteis

A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) foi utilizada com o objetivo de detectar e identificar os compostos voláteis presentes nas amostras de fécula de mandioca, polvilho doce e polvilho azedo. O ensaio foi realizado em Cromatógrafo a Gás (Agilent 7890B) equipado com sistema de detecção por espectrometria de massas (Agilent 5977A-MSD), com analisador de massas do tipo quadrupolo. A coluna utilizada foi do tipo capilar CP – WAX 52 CB (Polietilenoglicol, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de diâmetro interno).

A programação de temperatura do forno iniciou-se com 60 °C por 5 min e, a seguir, foram acrescentados 20 °C por minuto até que fosse atingida temperatura de 160 °C, permanecendo por mais 5 min. Na sequência, foram acrescentados 5 °C por minuto até que fosse atingida temperatura final de 240 °C e totalizando uma corrida analítica de 37 min. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1 mL/min. O modo de injeção utilizado foi sem divisão de fluxo (*splitless*) e o volume de injeção de 1 µL.

A aquisição dos dados ocorreu no modo SCAN, utilizando razão massa carga (*m/z*) de 14 a 500. A interface do cromatógrafo com o detector foi mantida a 240 °C e foi utilizada a ionização por impacto de elétrons operada a 240 °C. O analisador de massa foi do tipo quadrupolo simples operado a 150 °C. A massa e o perfil de fragmentação dos picos encontrados foram comparados com o banco dos espectros da biblioteca *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA). As diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste de comparação de médias de Duncan ao nível de significância de 5%. Foram utilizados o programa Excel do pacote Office e o programa Minitab® 18 (Minitab Incorporated, State College, PA, EUA) para o tratamento estatístico dos dados (MONTGOMERY, 2016; RIBEIRO JÚNIOR, 2004).

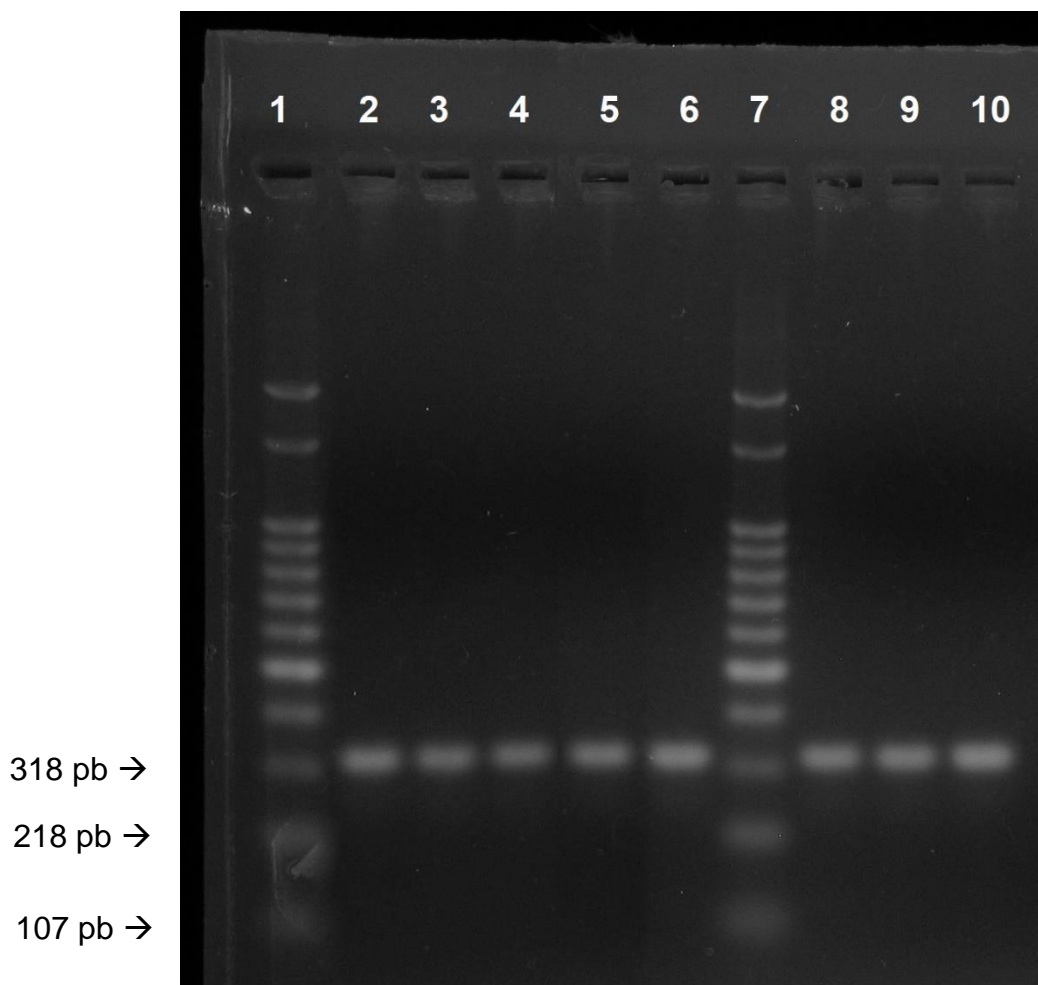
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DIFERENCIAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GRUPO *Lactobacillus plantarum*

Todos os onze isolados presumivelmente identificados por sequenciamento da região 16S do gene do rRNA como pertencentes ao grupo de *L. plantarum* foram submetidos à análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene *recA* e confirmados como pertencentes à espécie *L. plantarum*, já que o tamanho de seus amplicons foi de 318 pb (Figura 3). A análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene *recA* permite uma clara distinção entre as espécies estreitamente relacionadas *L. plantarum*, *L. paraplantarum* e *L. pentosus*, se caracterizando por ser uma análise confiável e de alta especificidade (TORRIANI *et al.*, 2001). Essa análise complementa o sequenciamento da região 16S do gene do rRNA, que não é a metodologia mais adequada nesse caso devido à alta similaridade entre as sequências das espécies homólogas (COLLINS *et al.*, 1991). Assim, confirmou-se que os isolados a serem testados e posteriormente utilizados como culturas iniciadoras pertenciam à espécie *L. plantarum*.

De acordo com Galanis *et al.* (2015), a análise de PCR Multiplex, comumente empregada para a detecção eficiente de BAL, é uma metodologia fácil de implementar, de rápida execução, econômica e que requer apenas uma pequena quantidade de DNA padrão. Vários autores já utilizaram de maneira bem-sucedida a análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene *recA* para diferenciar espécies estritamente relacionadas pertencentes ao grupo *Lactobacillus plantarum* isoladas durante o processo fermentativo e utilizadas como culturas iniciadoras para a obtenção de diversos produtos fermentados, tais como o pão de massa azeda (SETTANNI *et al.*, 2005; VENTIMIGLIA *et al.*, 2015) e a azeitona fermentada de mesa (DOULGERAKI *et al.*, 2013; RANDAZZO *et al.*, 2014).

Figura 3 – Produtos de amplificação obtidos pela análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene *recA*. Canaletas: 1 e 7: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-6 e 8-10: *Lactobacillus plantarum*

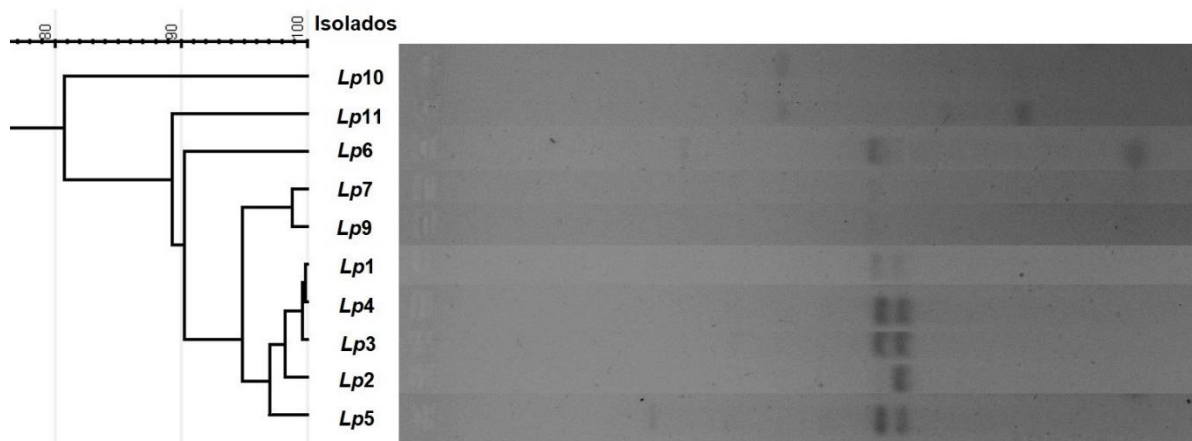


5.2 DIFERENCIAÇÃO DAS LINHAGENS DE *Lactobacillus plantarum*

Os onze isolados de *L. plantarum* foram submetidos a técnica de amplificação por *rep*-PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador (GTG)₅ para distinguir as relações genéticas entre esses isolados (Figura 4). Contudo, não foi possível amplificar um isolado (*Lp8*). No geral, o dendrograma revelou uma baixa heterogeneidade genética entre os isolados. Todos os isolados apresentaram similaridade superior a 70%, valor a partir do qual pode-se considerar que sejam da mesma espécie (DE VUYST *et al.*, 2008), confirmando o que já era esperado após a análise de PCR Multiplex com primers derivados do gene *recA*. De acordo com Gevers *et al.* (2001), o índice de similaridade entre padrões de bandas da mesma linhagem pode variar de 91 a 97%. A maioria dos isolados de *L. plantarum* mostrou similaridade superior a 91% e os isolados foram, então, considerados como

pertencentes à mesma linhagem, com algumas exceções: os isolados *Lp10*, *Lp11* e *Lp6*. Além disso, alguns isolados parecem indistinguíveis, tais como *Lp1*, *Lp3* e *Lp4* e também *Lp7* e *Lp9* (Figura 4).

Figura 4 – Dendrograma obtido após análise de agrupamento pela técnica de rep-PCR *fingerprinting* de linhagens de *Lactobacillus plantarum* isoladas do processo fermentativo de polvilho azedo



A similaridade (%) foi calculada usando o coeficiente de correlação Pearson.

A técnica utilizada no presente trabalho (GEVERS *et al.*, 2001) já foi utilizada para verificar a ocorrência de BAL e leveduras, em nível de linhagem, durante a fermentação de *mawè*, uma massa produzida a partir da fermentação espontânea de cereais na África Ocidental. As espécies predominantes foram *L. fermentum* (em 10 grupos representando diferentes linhagens ou grupos de linhagens intimamente relacionadas) e *P. kudriavzevii* (também 10 grupos de diferentes linhagens) (HOUNGBÉDJI *et al.*, 2018).

5.3 SELEÇÃO DE CULTURAS INICIADORAS PARA A PRODUÇÃO DE POLVILHO

5.3.1 Atividade antagonista

As linhagens de *B. cereus*, *E. coli* e *S. Typhimurium* testadas foram inibidas pela maioria dos isolados de *L. plantarum*. O maior halo de inibição foi apresentado contra *S. Typhimurium* ($31,97 \pm 6,03$ a $52,27 \pm 1,54$), seguido por *E. coli* ($19,65 \pm 3,88$ a $31,93 \pm 6,03$) e *B. cereus* ($2,77 \pm 4,79$ a $10,40 \pm 3,29$), nesta ordem (Figura 5). Os isolados de *L. plantarum* apresentaram um alto grau de inibição, porém variado contra os diferentes

patógenos. Dentre os onze isolados de *L. plantarum*, oito apresentaram atividade antagonista contra *B. cereus*. Todos os isolados apresentaram halos de inibição contra *E. coli* e *S. Typhimurium* (Figura 6 e Apêndice A).

Figura 5 – Halos de inibição de *Lactobacillus plantarum* contra *Bacillus cereus* (A), *Escherichia coli* (B) e *Salmonella Typhimurium* (C) pelo método *spot-on-lawn*

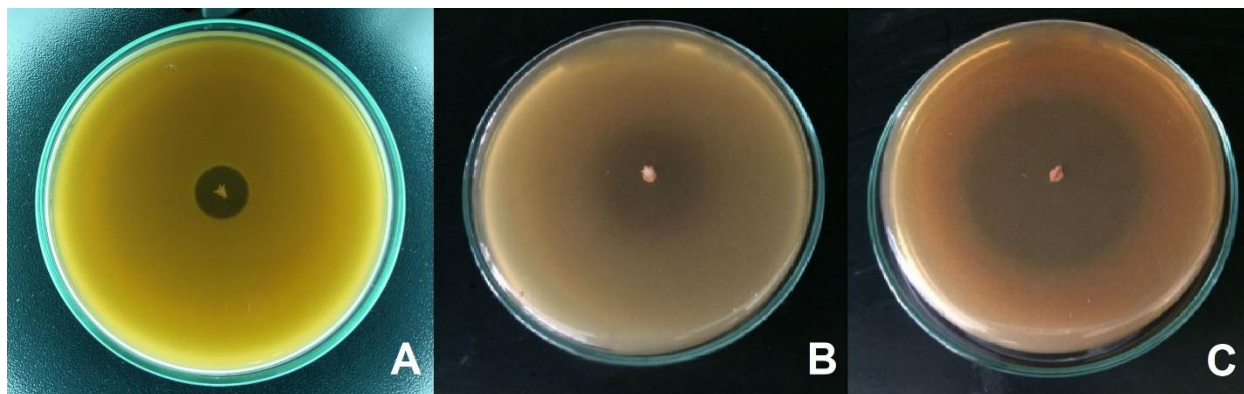
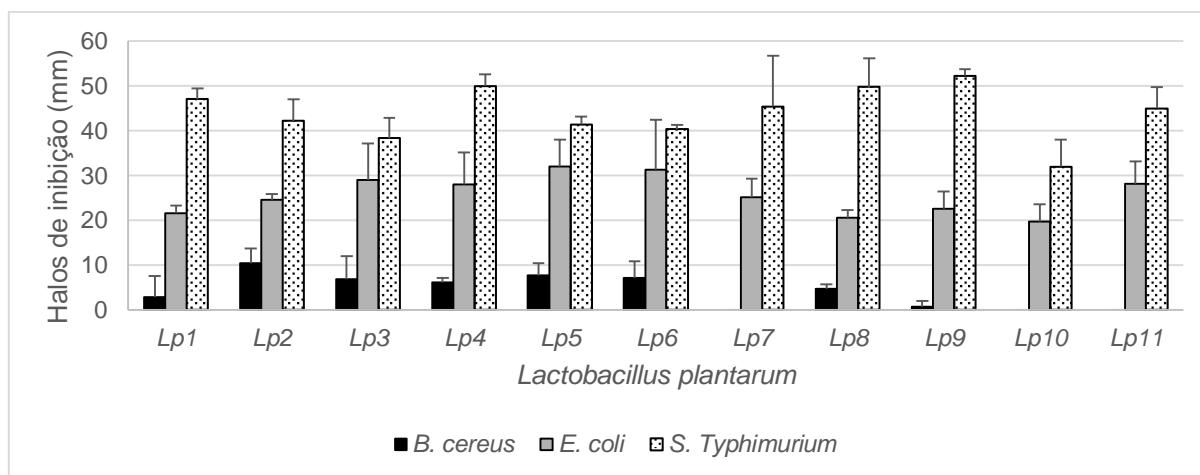


Figura 6 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos isolados de *Lactobacillus plantarum* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* pelo método *spot-on-lawn*



A partir do teste de *spot-on-lawn*, observou-se que oito dos onze isolados de *L. plantarum* apresentaram efeitos antagônicos contra os três micro-organismos testados. Assim, pode-se concluir que a maioria dos isolados de *L. plantarum* avaliados no presente trabalho são capazes de inibir os principais agentes patogênicos encontrados no polvilho azedo.

Houve variação grau de inibição quando os isolados de *L. brevis* foram testados contra os diferentes patógenos (Figura 7). Apenas um isolado dentre os doze isolados de *L. brevis* apresentou atividade antagonista contra *B. cereus*. Todos os isolados apresentaram halos de inibição contra *E. coli* e *S. Typhimurium* (Figura 8 e Apêndice B). Para a maioria dos isolados, os halos de inibição contra *S. Typhimurium* ($20,18 \pm 9,85$ a $38,80 \pm 3,77$) foram maiores do que o halo de inibição contra *B. cereus* ($14,02 \pm 2,57$), e, a inibição gerada contra aquele patógeno foi maior também que a inibição de *E. coli* ($6,45 \pm 5,59$ a $41,82 \pm 10,71$) (Figura 7).

O isolado de *L. brevis* identificado como *Lb4*, que demonstrou atividade antagonista contra *B. cereus*, estava entre os isolados que tiveram os maiores halos de inibição contra *E. coli* e *S. Typhimurium*. Além disso, os halos de inibição de todos os isolados de *L. brevis* contra o patógeno *S. Typhimurium* foram maiores que o halo de inibição contra *B. cereus*, e, para alguns isolados (*Lb2*, *Lb3*, *Lb8*, *Lb9*, *Lb11* e *Lb12*), a inibição de *E. coli* é ainda maior que a inibição de *B. cereus*.

A partir do teste de *spot-on-lawn*, observou-se que apenas um dos isolados de *L. brevis* apresentou efeitos antagônicos contra os três micro-organismos testados. Assim, pode-se sugerir que o isolado *Lb4* é um inibidor em potencial dos principais agentes patogênicos encontrados no polvilho azedo.

Figura 7 – Halos de inibição de *Lactobacillus brevis* contra *Bacillus cereus* (A), *Escherichia coli* (B) e *Salmonella Typhimurium* (C) pelo método *spot-on-lawn*

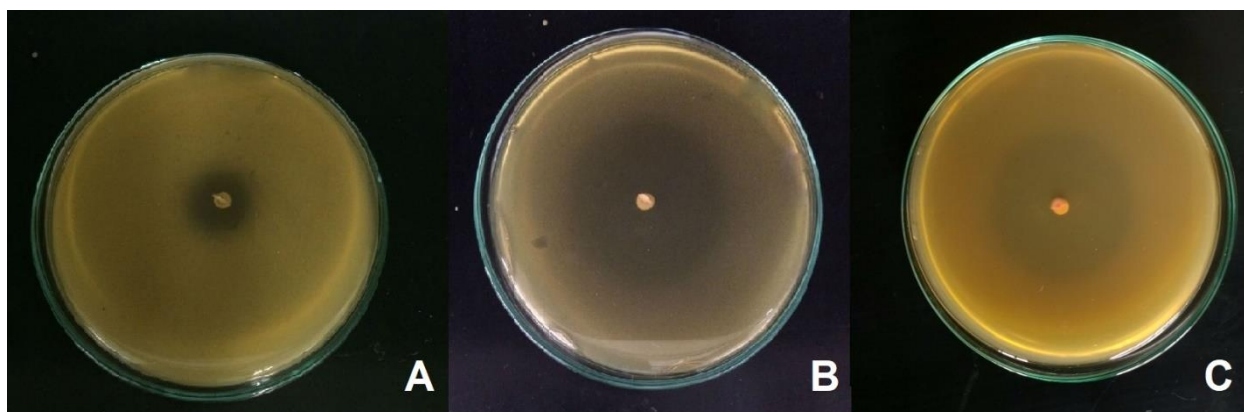
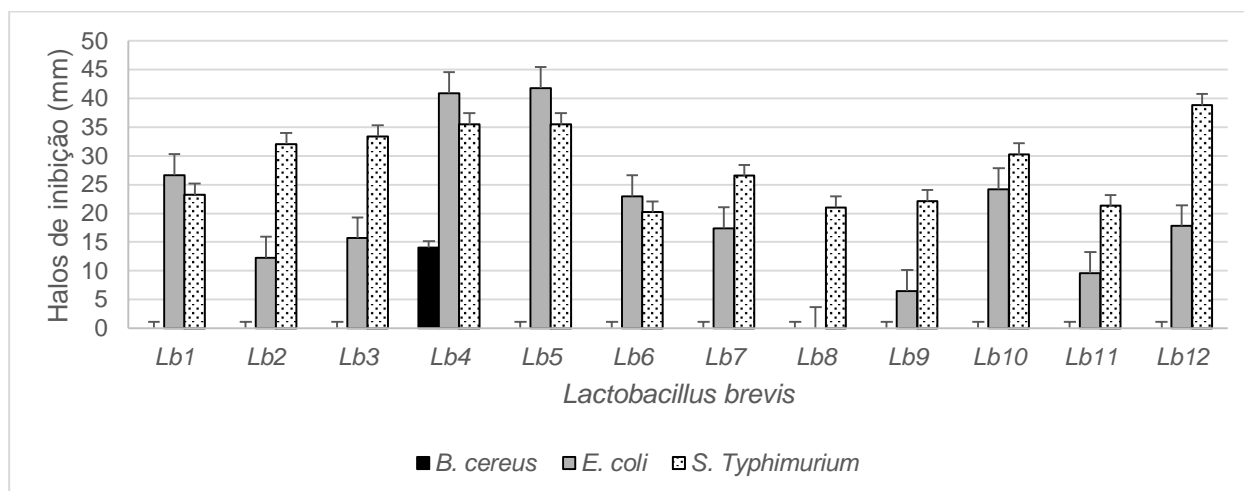


Figura 8 – Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos isolados de *Lactobacillus brevis* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* pelo método *spot-on-lawn*



Um total de 17 linhagens de *L. plantarum* (Lp1 a Lp17), isoladas de carne salgada tradicional tunisiana, foram caracterizadas de acordo com suas propriedades tecnológicas incluindo a atividade antimicrobiana, pelo método de difusão em ágar, com o objetivo de selecionar a linhagem mais adequada para uso como cultura iniciadora para a produção de salsichas fermentadas. A maioria das linhagens apresentou atividade antimicrobiana contra *Salmonella arizonae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli*, no entanto, a caracterização das substâncias antimicrobianas mostrou que nenhuma das linhagens foi capaz de produzir bacteriocinas. A maioria das linhagens inibiu as bactérias indesejáveis devido a inibição alternativa ou simultânea de ácido e peróxido de hidrogênio. Entre as linhagens que podem ser utilizadas como iniciadores para a produção de salsicha fermentada, os autores indicaram a Lp2, que teve a melhor atividade antagonista (ESSID *et al.*, 2009).

No presente estudo, os onze isolados de *L. plantarum*, apresentaram melhor desempenho quanto à atividade antagonista do que os doze isolados de *L. brevis*. Já é conhecido que as BAL predominantes na fermentação de mandioca, como os isolados de *L. plantarum* e *L. brevis*, são capazes de inibir o crescimento dos micro-organismos patogênicos frequentemente encontrados em produtos amiláceos, não permitindo sua proliferação durante o processo fermentativo (ADEBAYO *et al.*, 2013; ANYOGU *et al.*, 2014; MANTE *et al.*, 2003; OBADINA *et al.*, 2006). Sugere-se que a atividade antagonista se deve principalmente ao poder de acidificação das BAL, que conseguem levar o pH do meio a valores muito baixos, suficientes para inibir o crescimento de micro-organismos

patogênicos. No entanto, alguns autores relatam que certas linhagens de *L. plantarum* podem ser bacteriocinogênicas (BOTTHOULATH *et al.*, 2018).

5.3.2 Capacidade amilolítica

Nenhuma BAL amilolítica foi identificada no presente estudo. Entretanto, há relatos na literatura de cepas amilolíticas de *L. plantarum*, *L. manihotivorans* e *L. fermentum* isoladas de diferentes alimentos amiláceos tropicais preparados principalmente a partir de mandioca e cereais, como milho e sorgo (REDDY *et al.*, 2008). Kostinek *et al.* (2007) avaliaram a produção de α -amilase de 375 isolados de BAL e a maioria apresentou resultado negativo, com exceção de alguns cocos obrigatoriamente homofermentativos. Os autores consideraram encontrar poucas BAL produtoras de α -amilase, um fato inesperado, já que a mandioca contém 84% dos seus carboidratos na forma de amido.

Não detectar atividade amilolítica entre os isolados de BAL testados pode não representar o comportamento desses mesmos isolados nas condições adversas da fermentação em escala piloto. Isso porque, para a realização dos testes de seleção, as BAL foram inoculadas em um meio de cultura rico em nutrientes, o MRS modificado. Condições de estresse são capazes de induzir uma rota metabólica diferente e fazer com que as BAL se tornem amilolíticas. Os oligossacarídeos, como o amido, são importantes fontes de carboidratos em habitats comuns para lactobacilos. A fermentação desses carboidratos é altamente variável dentro de linhagens da mesma espécie, devido à perda de características codificadas pelo plasmídeo e também à aquisição de genes por transferência lateral. A atividade extracelular da amilase já foi caracterizada em vários lactobacilos, incluindo *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. manihotivorans*, *L. amylovorus* e *L. gasseri*, sendo que a atividade da amilase em lactobacilos é linhagem específica. (GÄNZLE; FOLLADOR, 2012).

Os 12 isolados de *P. scutulata* também foram testados quanto à habilidade de produzir amilase. Todos os isolados, assim como os controles positivos *Cryptococcus magnus* e *Cryptococcus adaliensis*, apresentaram um halo de degradação do amido em ágar Batata Dextrose. Apenas nove dos doze isolados apresentaram halos de degradação do amido quando inoculados em ágar YM acrescido de 2% de amido. Sugere-se que as leveduras têm um papel importante no início da fermentação de

mandioca, degradando o amido presente e disponibilizando açúcares para o crescimento das BAL.

Rahmawati *et al.* (2013), com o objetivo de desenvolvimento de uma cultura iniciadora, avaliaram a atividade amilolítica de micro-organismos isolados a partir da fermentação espontânea de milho. Quatro fungos filamentosos e uma levedura, *Candida famata*, apresentaram capacidade amilolítica. Entretanto, nenhuma BAL foi capaz de realizar a hidrólise do amido. A curva de crescimento sugeriu que as BAL não amilolíticas se beneficiaram dos produtos hidrolisados e dominaram os estágios finais da fermentação. Os autores também concluíram que a atividade amilolítica foi maior nos estágios iniciais e diminuiu com o decorrer do processo fermentativo. A capacidade amilolítica das leveduras sugere a importância do papel que desempenham na fermentação de mandioca, pois hidrolisam o amido das raízes em açúcares simples para que outros micro-organismos os utilizem. As BAL, por exemplo, convertem esses açúcares simples em ácidos orgânicos (OYEWOLE, 2001).

5.3.3 Capacidade de acidificação

Na avaliação da capacidade de acidificação das BAL, os valores de ATT diferiram entre si nos diferentes tempos ($p < 0,05$), sendo maiores após 48 h para todos os isolados de *L. plantarum* e *L. brevis* (tabelas 1 e 2). No tempo inicial, os valores de ATT não diferiram entre os diferentes isolados de ambas espécies, o que se alterou ao longo do tempo. Para *L. plantarum*, após 24 horas, o isolado *Lp8* apresentou o maior valor de ATT ($3,72 \pm 0,05$), seguido pelos isolados *Lp1* ($3,21 \pm 0,09$) e *Lp6* ($3,05 \pm 0,43$), e, após 48 h, o isolado *Lp1* ($5,62 \pm 0,65$), seguido pelos isolados *Lp3*, *Lp4*, *Lp6* e *Lp8*. Para *L. brevis*, tanto com 24 horas quanto com 48 horas de fermentação, o isolado *Lb12* apresentou o maior valor de acidez ($3,50 \pm 0,03$; $4,95 \pm 0,24$), seguido pelos isolados *Lb4* e *Lb5*.

No caso das leveduras, os valores de ATT diferiram entre os isolados e entre os tempos 0, 24 h e 48 h para a maioria dos isolados ($p < 0,05$), exceto para o isolado *Ps1*. Os valores foram maiores com 48 h do que com 24 h e 0 h, para os isolados *Ps7*, *Ps8*, *Ps9* e *Ps11* (Tabela 3). O isolado de *P. scutulata* *Ps9* apresentou os maiores valores de acidez em todos os tempos, ainda assim, estes valores são menos expressivos do que os apresentados pelas BAL.

Tabela 1 – Acidez total titulável nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação produzida pelos isolados de *Lactobacillus plantarum*

Isolados de <i>L. plantarum</i>	ATT (%)											
	0 h			24 h			48 h					
<i>Lp1</i>	0,95	±	0,14	a,z	3,21	±	0,09	b,y	5,62	±	0,65	a,x
<i>Lp2</i>	1,01	±	0,24	a,z	1,98	±	0,11	e,y	4,46	±	0,14	cd,x
<i>Lp3</i>	1,04	±	0,05	a,z	2,69	±	0,05	cd,y	5,01	±	0,05	b,x
<i>Lp4</i>	1,10	±	0,00	a,z	2,23	±	0,19	de,y	4,67	±	0,16	bc,x
<i>Lp5</i>	0,95	±	0,19	a,z	2,23	±	0,05	de,y	4,24	±	0,11	cde,x
<i>Lp6</i>	0,98	±	0,14	a,z	3,05	±	0,43	bc,y	4,52	±	0,50	bcd,x
<i>Lp7</i>	0,95	±	0,05	a,z	2,63	±	0,05	cd,y	4,24	±	0,11	cde,x
<i>Lp8</i>	1,10	±	0,09	a,z	3,72	±	0,05	a,y	4,95	±	0,24	b,x
<i>Lp9</i>	1,19	±	0,18	a,z	2,23	±	0,78	de,y	4,12	±	0,33	def,x
<i>Lp10</i>	1,10	±	0,16	a,z	2,44	±	0,23	de,y	3,69	±	0,11	f,x
<i>Lp11</i>	1,22	±	0,19	a,z	2,60	±	0,37	cd,y	3,82	±	0,47	ef,x

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c, d, e, f em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Tabela 2 – Acidez total titulável nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação produzida pelos isolados de *Lactobacillus brevis*

Isolados de <i>L. brevis</i>	ATT (%)											
	0 h			24 h			48 h					
<i>Lb1</i>	0,63	±	0,07	a,z	1,08	±	0,07	f,y	2,48	±	0,14	e,x
<i>Lb2</i>	0,66	±	0,07	a,z	1,34	±	0,20	e,y	2,63	±	0,12	d,x
<i>Lb3</i>	0,54	±	0,03	a,z	1,99	±	0,08	d,y	3,26	±	0,11	c,x
<i>Lb4</i>	0,71	±	0,03	a,z	3,19	±	0,05	b,y	4,94	±	0,05	b,x
<i>Lb5</i>	0,71	±	0,03	a,z	2,85	±	0,12	c,y	5,02	±	0,19	b,x
<i>Lb6</i>	0,59	±	0,03	a,z	2,05	±	0,07	d,y	3,14	±	0,05	c,x
<i>Lb7</i>	0,62	±	0,11	a,z	1,12	±	0,07	f,y	2,63	±	0,12	d,x
<i>Lb8</i>	0,68	±	0,03	a,z	0,83	±	0,05	g,y	1,71	±	0,17	f,x
<i>Lb9</i>	0,62	±	0,03	a,z	1,42	±	0,05	e,y	2,71	±	0,10	d,x
<i>Lb10</i>	0,65	±	0,05	a,z	1,14	±	0,07	f,y	2,62	±	0,07	de,x
<i>Lb11</i>	0,63	±	0,05	a,z	0,89	±	0,05	g,y	1,26	±	0,15	g,x
<i>Lb12</i>	0,62	±	0,03	a,z	3,50	±	0,03	a,y	5,34	±	0,03	a,x

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c, d, e, f, g em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Tabela 3 – Acidez total titulável nos tempos 0, 24 e 48 horas de fermentação produzida pelos isolados de *Pichia scutulata*

Isolados de <i>P. scutulata</i>	ATT (%)		
	0 h	24 h	48 h
Ps1	0,78 ± 0,09 ab,x	0,89 ± 0,10 b,x	0,87 ± 0,08 e,x
Ps2	0,64 ± 0,08 b,y	0,85 ± 0,03 b,x	0,90 ± 0,03 de,x
Ps3	0,73 ± 0,05 ab,y	0,89 ± 0,05 b,x	0,99 ± 0,03 cde,x
Ps4	0,76 ± 0,07 ab,y	0,87 ± 0,09 b,xy	0,98 ± 0,07 cde,x
Ps5	0,82 ± 0,05 a,y	0,89 ± 0,07 b,xy	0,99 ± 0,07 cde,x
Ps6	0,78 ± 0,08 ab,y	0,89 ± 0,11 b,xy	0,99 ± 0,13 cde,x
Ps7	0,82 ± 0,08 a,z	0,98 ± 0,10 ab,y	1,16 ± 0,07 ab,x
Ps8	0,85 ± 0,15 a,z	0,92 ± 0,05 ab,y	1,14 ± 0,00 ab,x
Ps9	0,79 ± 0,05 a,z	1,04 ± 0,10 a,y	1,22 ± 0,07 a,x
Ps10	0,81 ± 0,12 a,y	0,93 ± 0,05 ab,xy	1,04 ± 0,10 bcd,x
Ps11	0,73 ± 0,05 ab,z	0,98 ± 0,07 ab,y	1,11 ± 0,07 abc,x

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c, d, e em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

Uma das características mais relevantes para culturas iniciadoras em potencial é sua capacidade de acidificação, uma vez que a produção de ácidos possibilita o surgimento de aroma específicos e prolongam a fase *lag* dos organismos sensíveis, incluindo os micro-organismos patogênicos frequentemente encontrados em alimentos (KOSTINEK *et al.*, 2007). Desta forma, muitos alimentos fermentados têm menor probabilidade de atuar como veículos de toxinfecções alimentares quando comparados à alimentos frescos (NOUT, 1994). Isso se deve à produção desses ácidos e também de metabólitos pelos micro-organismos utilizados como culturas iniciadoras, que, preferencialmente, devem ser selecionados por sua capacidade de antagonizar micro-organismos patogênicos e, portanto, contribuir para a inocuidade do produto final.

Mugula *et al.* (2003), ao estudar BAL e leveduras como culturas iniciadoras para a produção de *togwa*, avaliaram a capacidade de acidificação das leveduras. A redução significativa do pH e a produção significativa de ácido láctico ocorreram nas amostras fermentadas por *L. plantarum* e *L. plantarum* em cocultura com *I. orientalis*. Como culturas puras, as leveduras abaixaram levemente o pH do meio em 24 horas. Contudo, seu uso em cocultura com as BAL resultou em uma maior produção de compostos voláteis responsáveis pelo sabor do produto.

Essid *et al.* (2009), ao caracterizar linhagens de *L. plantarum* isoladas de um produto à base de carne salgada e selecionar a mais adequada para uso como cultura iniciadora, avaliaram também sua capacidade de acidificação. Todas as linhagens estudadas apresentaram boa atividade acidificante e foram capazes de reduzir o pH para valores menores que 4,3 em 72, 48 e 24 horas a 15, 25 e 37 °C respectivamente. Edward *et al.* (2011) investigaram o uso de linhagens liofilizadas de *L. plantarum*, *L. fermentum*, *W. paramesenteroides* e *L. mesenteroides* como culturas iniciadoras para a produção de *gari*. Nos testes, as linhagens tiveram um bom desempenho e rapidamente aumentaram a acidez titulável de 1,1 a 1,3 % em 24 horas para 1,3 a 1,6 % em 48 horas.

Os valores de ATT encontrados para os isolados de *L. plantarum* foram bastante superiores aos obtidos pelos isolados de *P. scutulata*. Esse resultado já era esperado, uma vez que as bactérias são as principais responsáveis pela acidificação do meio durante a fermentação de mandioca (OGUNTOYINBO; DODD, 2010; REDDY, 2008). Esses resultados apontaram o potencial desses micro-organismos para serem testados como culturas iniciadoras para a fermentação do polvilho azedo no que se refere à capacidade de contribuir para a inocuidade e as características sensoriais desejáveis do produto final, que deve ter acidez entre 1,0 e 5,0% para ser considerado polvilho azedo de acordo com a legislação (BRASIL, 1978b).

Para a produção de polvilho azedo em escala piloto foram selecionados um isolado de BAL e um isolado de levedura. Em relação às BAL, os isolados de *L. plantarum* considerados em conjunto apresentaram melhores médias no teste de antagonismo (aproximadamente 4 mm contra *B. cereus*; 26 mm contra *E. coli*; 44 mm contra *S. Typhimurium*) e capacidade de acidificação (cerca de 4,5% em 48 h) quando comparados aos isolados de *L. brevis* (apenas 1 isolado positivo contra *B. cereus*; 20 mm contra *E. coli*; 28 mm contra *S. Typhimurium*; além de acidez média de 3,2% com 48 h). Dentre os 11 isolados de *L. plantarum*, o selecionado foi Lp3. Isso porque esse isolado apresentou: atividade antagonista contra os três patógenos testados, estando no grupo com os maiores halos contra *B. cereus* e *E. coli*; boa capacidade de acidificação tanto com 24 ($2,69 \pm 0,05\%$) quanto com 48 horas ($5,01 \pm 0,05\%$). Em relação à *P. scutulata*, o isolado selecionado foi Ps9. Isso porque esse isolado apresentou: atividade amilolítica tanto em ágar Batata Dextrose quanto em ágar YM acrescido de 2% de amido; além de apresentar o maior valor de ATT com 48 horas ($1,22 \pm 0,07\%$) entre os isolados de *P. scutulata* testados.

5.4 PRODUÇÃO DE POLVILHO AZEDO EM ESCALA PILOTO

5.4.1 Monitoramento físico-químico da fermentação em escala piloto

Os resultados das análises semanais de ATT e pH das amostras referentes à fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo em escala piloto estão no Apêndice C. Para ATT, no tempo 0, as diferentes culturas iniciadoras não diferiram entre si e estavam abaixo de 1%. Entretanto, no decorrer da fermentação, os valores de acidez diferiram ($p < 0,05$), sendo maiores para as culturas A e B (2,37% e 2,30%, respectivamente). A variação dos valores de acidez para a fermentação com a cultura C, que era composta por *L. plantarum* Lp3 em associação com o fermento comercial, de 0,29% a 0,95%, e para a cultura D, fermento comercial em cultura pura, de 0,33% a 1,42%, foi menor. Isso mostra que a presença de *S. cerevisiae* além de não contribuir para a acidificação, é capaz de prejudicar o desempenho de *L. plantarum*. Os valores de ATT podem ser melhor visualizados na figura 9. No gráfico, é possível observar que a acidez aumenta gradativamente até o 21º dia de fermentação para todas as culturas iniciadoras testadas.

Vogelmann *et al.* (2009), ao estudarem uma massa de mandioca fermentada por uma associação de BAL e leveduras utilizadas como culturas iniciadoras, encontraram valores de acidez que variaram de 10,3 a 11,5 °SH (Soxhlet-Henkel Degrees), os quais correspondem a 0,23 % a 0,26 % de ATT, durante os 12 dias de fermentação.

Ao comparar os valores de ATT obtidos no monitoramento físico-químico da escala piloto com os valores de ATT obtidos nos testes de seleção com o isolado de *L. plantarum* Lp3, é possível perceber que os valores obtidos nos testes com 24 h ($2,69 \pm 0,05\%$) e 48 h ($5,01 \pm 0,05\%$) de fermentação são superiores aos valores obtidos para *L. plantarum* utilizado como cultura iniciadora pura com 7 ($1,58 \pm 0,29\%$), 14 ($1,80 \pm 0,21$) e 21 dias ($2,37 \pm 0,44$). Isso ocorre porque, no teste de seleção, o meio havia sido suplementado com 10% de glicose, uma fonte de energia pronta para ser fermentada pela bactéria para a produção de ácidos. Enquanto que, na fermentação em escala piloto, havia apenas 10% de fécula de mandioca, rica em amido que precisa ser quebrado em glicose, para então ser aproveitado.

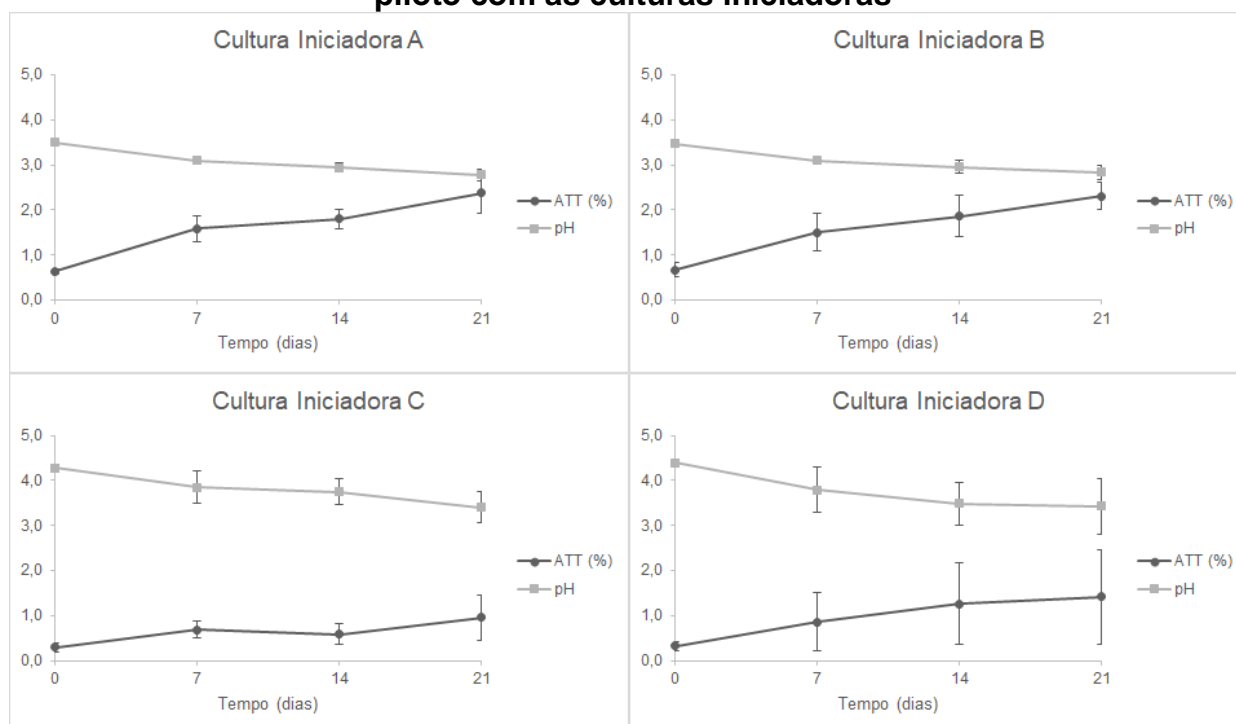
No presente estudo, em relação ao pH, durante os 21 dias de fermentação, os tratamentos com as diferentes culturas iniciadoras diferiram entre si ($p < 0,05$), inclusive no tempo 0, em que houve a adição do pré-inóculo (Apêndice D). Em todos os tempos,

os tratamentos com as culturas A e B apresentaram menores valores de pH do que os tratamentos com as culturas C e D. É possível visualizar que os menores valores de pH ocorrem no último dia de fermentação (Figura 9). Vogelmann *et al.* (2009), ao avaliar a massa de mandioca fermentada por uma associação de BAL e leveduras utilizadas como culturas iniciadoras, encontraram valores de pH que atingiram 4,1 a 4,2 com 12 dias de fermentação.

Em fermentações, incluindo a de produtos cárneos, a principal função das BAL é ocasionar uma rápida queda no pH do meio, o que por sua vez irá favorecer: a segurança do produto através da inibição de micro-organismos patogênicos; a estabilidade do produto final e sua vida útil, pois dificulta a ocorrência de mudanças indesejáveis causadas por micro-organismos deteriorantes; e ainda a criação de condições bioquímicas necessárias para atingir as propriedades sensoriais desejadas (AMMOR; MAYO, 2007; ESSID *et al.*, 2009; LÜCKE, 2000).

O monitoramento do pH e da ATT revelou que, para todas as culturas iniciadoras testadas, o maior valor de acidez e, conseqüentemente, o menor valor de pH ocorreram no 21º dia de fermentação. Isso confirma o que foi sugerido em estudo anterior (PENIDO, 2013), a fermentação da fécula de mandioca para a obtenção do polvilho azedo em escala piloto pode ser realizada em menos tempo (redução de 28 para 21 dias), levando a obtenção de um produto final com acidez satisfatória. Essa redução no tempo de fermentação, além de otimizar o processo fermentativo, se justifica pelo fato de que quanto maior o tempo de fermentação, menor a força e a estabilidade da massa de polvilho azedo (ADEGUNWA *et al.*, 2011).

Figura 9 – Variação da Acidez Total Titulável (%) e do pH ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto com as culturas iniciadoras



A = *L. plantarum*; B= *L. plantarum* + *P. scutulata*; C = *L. plantarum* + fermento comercial; D = fermento comercial.

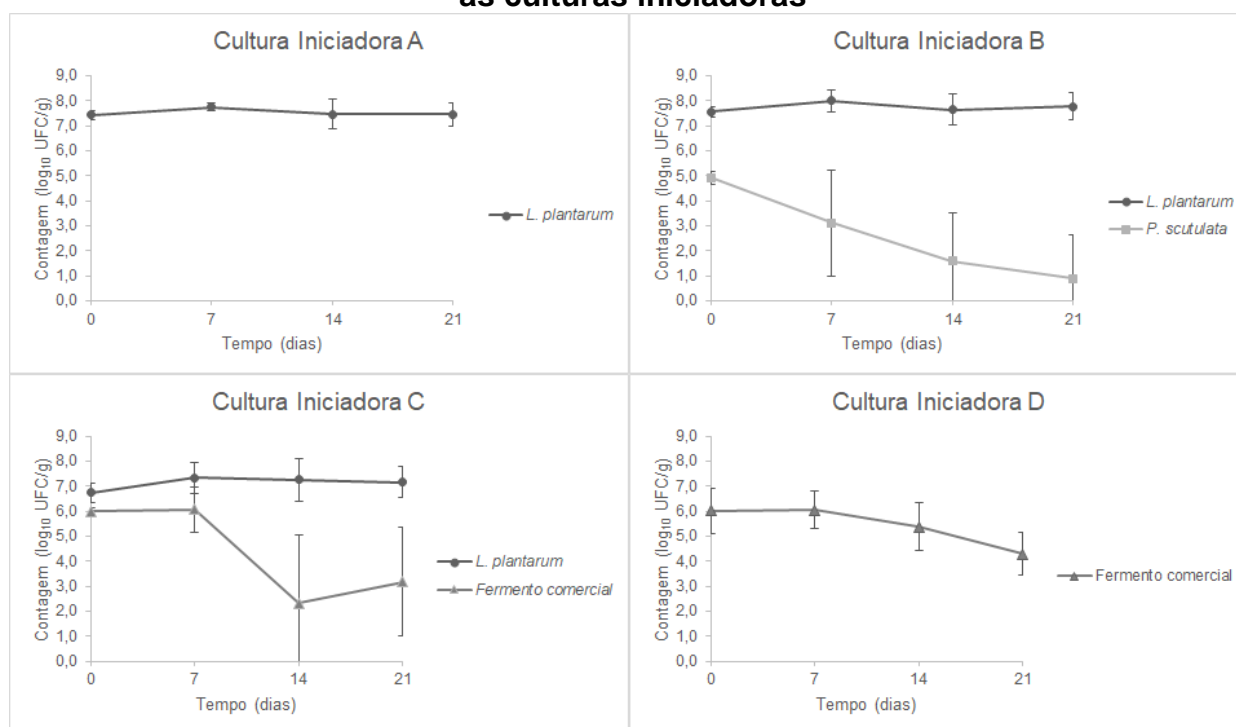
5.4.2 Monitoramento molecular das culturas iniciadoras

As contagens de *L. plantarum* tanto em cultura pura quanto em associação com as leveduras não diferiram durante todo o tempo de fermentação, se mantendo próximas a contagem do inóculo inicial de cerca de $7 \log_{10}$ UFC/g. As contagens de *P. scutulata*, que inicialmente eram de cerca de $5 \log_{10}$ UFC/g, diminuíram gradativamente ao longo dos 21 dias. Após isolar e identificar os micro-organismos presentes na fermentação para obtenção do polvilho azedo, Penido (2013) selecionou e testou quatro culturas iniciadoras para a fermentação em escala piloto. Ao contrário do observado por Penido *et al.* (2018), no presente trabalho, as contagens de *L. plantarum* em cultura mista com *P. scutulata* não sofreram redução e *P. scutulata* foi encontrada até o 21º dia de fermentação, e não apenas até o 14º dia. As contagens de *S. cerevisiae*, que nas culturas dos tratamentos C e D no tempo 0 eram de cerca de $6 \log_{10}$ UFC/g, em cultura mista tiveram uma queda brusca com 14 dias de fermentação, o que não aconteceu com esta levedura quando em cultura pura, porém ela ainda foi isolada no 21º dia de fermentação com contagens próximas a $3 \log_{10}$ UFC/g (Figura 10) (Apêndice E). O fato de que as

contagens da BAL se mantiveram superiores às contagens das leveduras durante todo o processo fermentativo é um indício da importância desse grupo de micro-organismos para a obtenção do polvilho azedo, assim como observado em estudos anteriores (LACERDA *et al.*, 2005; LACERDA *et al.*, 2011; PENIDO *et al.*, 2018).

Entre os metabólitos microbianos, o ácido láctico é um componente importante, capaz de afetar as contagens de leveduras. Seu efeito inibitório depende estritamente de sua concentração. À medida que a concentração de ácidos no meio aumenta, a taxa de crescimento específico das leveduras diminui exponencialmente enquanto a fase *lag* aumenta exponencialmente. Assim, a queda nas contagens de leveduras no meio da fermentação pode ter ocorrido devido ao aumento da concentração de ácidos no meio. Quando leveduras e BAL são inoculadas juntas, a inibição pode ocorrer devido à ação de um ou mais componentes celulares bacterianos solúveis em água. Há relatos de que a levedura *S. cerevisiae* foi inibida pelos ácidos láctico e acético, sendo que essa inibição se dá por mecanismos distintos. Enquanto que o crescimento bacteriano pode ser estimulado à medida que o tamanho do inóculo da levedura aumenta (KAWAHATA *et al.*, 2006; NARENDRANATH *et al.*, 2001; NGANG *et al.*, 1989, 1990, 1992; THOMAS *et al.*, 2002).

Figura 10 – Variação da contagem (\log_{10} UFC/g) ao longo do tempo em dias para o acompanhamento da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto com as culturas iniciadoras



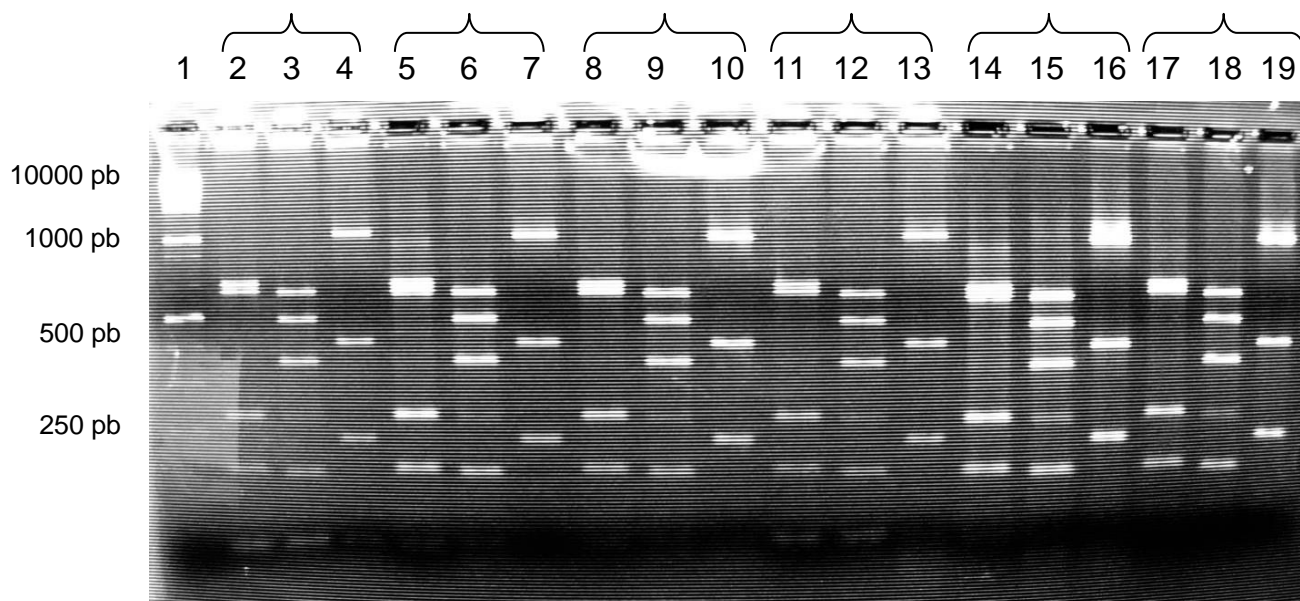
A = *L. plantarum* (●); B = *L. plantarum* (●) + *P. scutulata* (■); C = *L. plantarum* (●) + fermento comercial (▲); D = fermento comercial (▲)

Omemu *et al.* (2007) estudaram as leveduras envolvidas na fermentação do milho para a produção de *ogi* e seu possível papel nesta fermentação, além de investigar as possíveis interações entre essas leveduras e as BAL. Das 77 linhagens de *S. cerevisiae* examinadas, 2.60% (n = 2) deram resultado positivo para atividades de amilase. A atividade amilolítica de *S. cerevisiae* é importante para que haja a hidrólise do amido com consequente produção de monossacarídeos, os quais são convertidos em ácidos orgânicos por BAL. Os autores observaram um aumento significativo nas contagens de *L. plantarum* quando inoculada em associação com *S. cerevisiae* em comparação ao inóculo da cultura pura da mesma bactéria. O significativo aumento observado no crescimento de *L. plantarum* quando em cultura mista está de acordo com o relato de Nout (1991) que sugeriu que o crescimento de bactérias é estimulado pela presença de leveduras, que podem fornecer fatores de crescimento, como, vitaminas e compostos nitrogenados solúveis.

Huch (*née* Kostinek) *et al.* (2008) testaram BAL como culturas iniciadoras para a fermentação de mandioca, entre elas *L. plantarum*, em um estudo piloto no Quênia para determinar seu potencial para predominar durante a produção de *gari*. A utilização das culturas em números elevados resultou claramente em uma contagem um a dois logaritmos mais elevada de BAL, durante toda fermentação, quando comparada ao controle não inoculado. Edward *et al.* (2011) investigaram o uso de linhagens liofilizadas, entre elas *L. plantarum*, também como culturas iniciadoras para a produção de *gari*. As contagens das BAL após 48 horas de fermentação foram maiores que as do presente estudo e variaram entre 9,1 e 10,6 log₁₀ UFC/g para as fermentações inoculadas com as culturas iniciadoras. Freire *et al.* (2017), ao avaliar o crescimento dos micro-organismos durante a produção de uma bebida não láctea baseada na bebida indígena brasileira denominada *cauim*, obtida a partir de fermentação de mandioca e arroz, observaram que *L. plantarum*, em cultura pura, atingiu uma contagem de cerca de 8 log₁₀ UFC/mL após 48 horas do início do processo fermentativo.

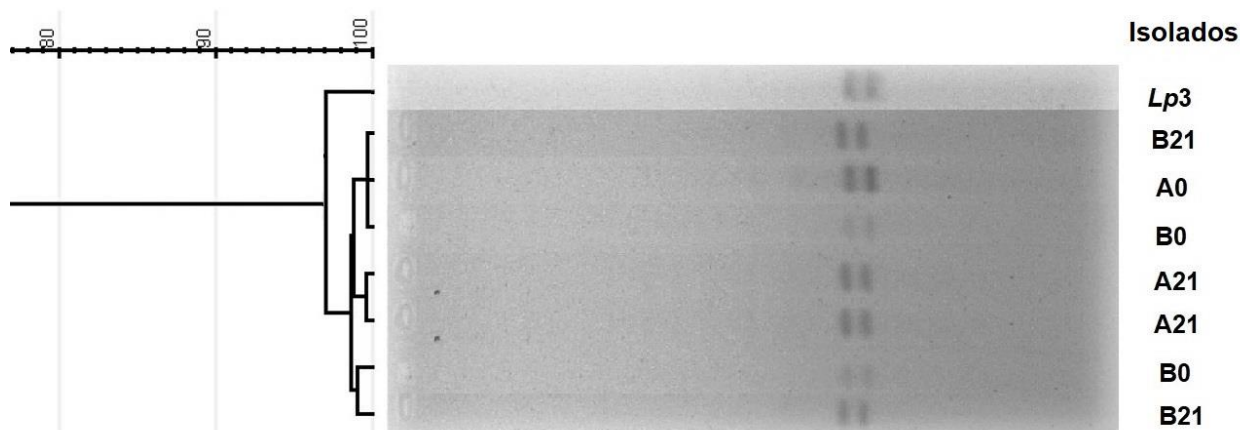
Após a contagem das colônias em placas com os respectivos meios de cultura, foram isolados representantes de cada micro-organismo utilizado como cultura iniciadora da fermentação da fécula de mandioca em escala piloto para o monitoramento por meio de técnicas moleculares. Todas as BAL isoladas eram bastonetes Gram-positivos e catalase negativas. Das 52 BAL isoladas dos biorreatores contendo as culturas iniciadoras A, B e C, todas apresentaram o mesmo perfil molecular (Figura 11), que é semelhante ao perfil de *L. plantarum* sequenciado e identificado em estudo anterior (Anexo A).

Figura 11 – Perfis de digestão de BAL isoladas da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4; 5-7; 8-10; 11-13; 14-16; 17-19: *Lactobacillus plantarum* (enzimas *MspI*, *HaeIII*, *HinfI*, respectivamente)



Os isolados de *L. plantarum* obtidos durante a produção de polvilho azedo em escala piloto, nos tempos inicial (0) e final (21 dias) de fermentação, apresentaram similaridade de 97% com o isolado inoculado (*L. plantarum* Lp3) e de aproximadamente 98% entre si pela técnica de rep-PCR *fingerprinting* utilizando o iniciador (GTG)₅ (Figura 12). Isso indica que todos pertencem à mesma linhagem e que a linhagem inoculada como cultura iniciadora consegue permanecer viável até o fim da fermentação.

Figura 12 – Dendrograma obtido após análise de agrupamento pela técnica de rep-PCR *fingerprinting* de isolados da fermentação da fécula de mandioca em escala piloto para obtenção de polvilho azedo



A0 = isolado proveniente do tratamento A tempo inicial (0); A21 = isolado proveniente do tratamento A tempo final (21 dias); B0 = isolado proveniente do tratamento B tempo inicial (0); B21 = isolado proveniente do tratamento B tempo final (21 dias). A similaridade (%) foi calculada usando o coeficiente de correlação Pearson.

Das oito leveduras isoladas dos biorreatores contendo a cultura iniciadora B (quatro isoladas no tempo 0 e quatro isoladas no tempo 7 dias), sete apresentaram o mesmo perfil molecular (Figura 13), que é semelhante ao perfil de *P. scutulata* sequenciado e identificado em estudo anterior (Anexo B). Apenas uma levedura apresentou perfil desconhecido (canaleta 7 da Figura 13) e não foi identificada.

Das 26 leveduras isoladas nos biorreatores contendo as culturas C e D (11 isoladas nos biorreatores com a cultura C e 15 isoladas nos biorreatores com a cultura D), todas apresentaram o mesmo perfil, que correspondia ao perfil encontrado para a levedura *S. cerevisiae* no inóculo do fermento comercial em cultura pura (Figura 14).

Figura 13 – Perfis de PCR *fingerprinting* de leveduras isoladas da fermentação de fécula mandioca em escala piloto. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-6 e 8-9: *Pichia scutulata*; 10: controle negativo

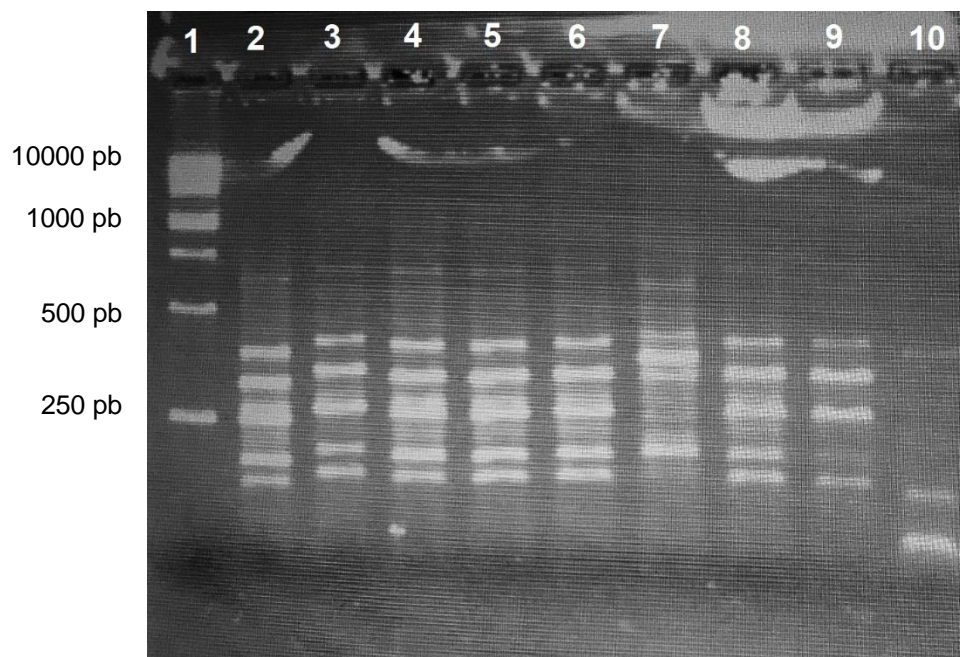
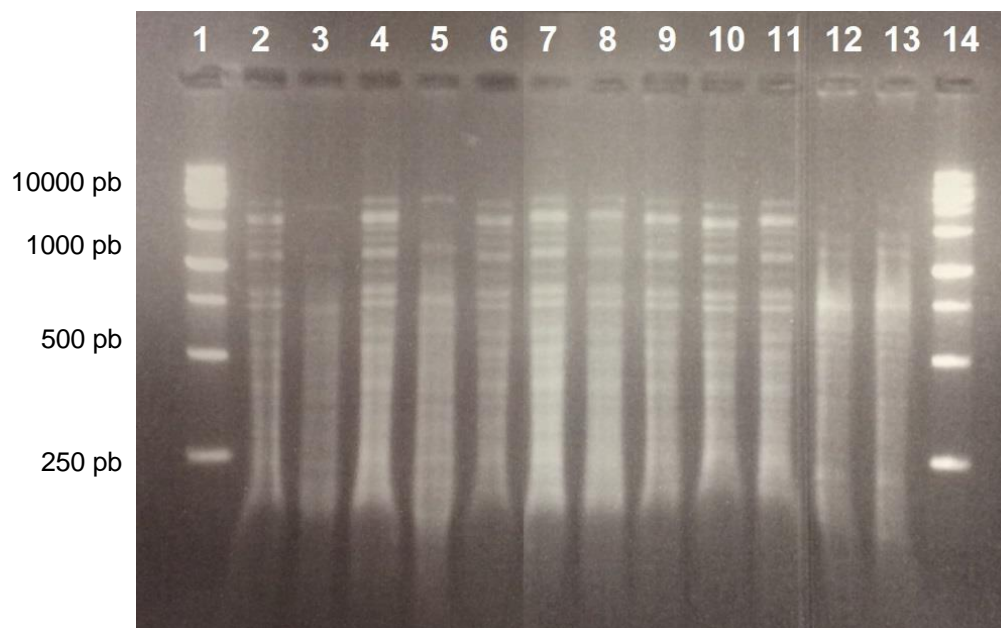


Figura 14 – Perfis de DNA mitocondrial de leveduras isoladas da fermentação de fécula de mandioca em escala piloto. Canaletas: 1 e 14: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-13: leveduras isoladas do fermento comercial



Huch (*née* Kostinek) *et al.* (2008) testaram *L. plantarum* e *L. fermentum* como culturas iniciadoras para a produção de *gari*. O monitoramento molecular por RAPD-PCR e técnicas de tipagem por PFGE indicou que *L. plantarum* foi bem-sucedido em afirmar-se como uma bactéria predominante, o que não aconteceu com *L. fermentum*. Vogelmann *et al.* (2009) investigaram a adaptação e competitividade de BAL e leveduras como culturas iniciadoras em fermentações tradicionais de mandioca. Foram inoculados neste tipo de fermentação, 1% de *S. cerevisiae* e 10% de uma mistura de culturas iniciadoras consistindo de 6,30 log₁₀ UFC/g de BAL (*L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. casei* em menor proporção) e 5,72 log₁₀ UFC/g de leveduras (*I. orientalis*, *Torulaspota* sp. e outras leveduras desconhecidas). Durante os 12 dias de fermentação, encontraram contagens de BAL que variaram entre 8,41 e 9,15 log₁₀ UFC/g e contagens de leveduras entre 6,30 e 7,15 log₁₀ UFC/g. No final da fermentação, a maioria das linhagens das culturas iniciadoras fazia parte da microbiota dominante, sendo que *L. plantarum* foi a espécie predominante na massa fermentada de mandioca.

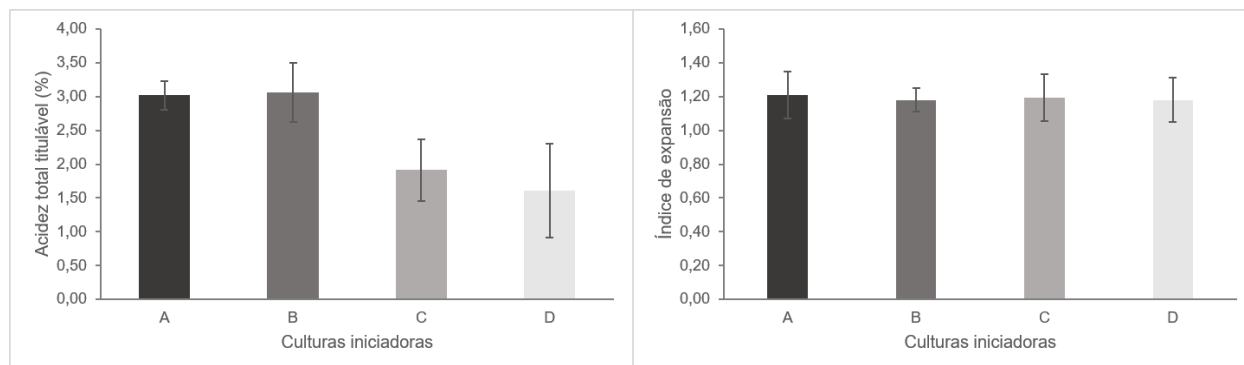
Para todas as culturas iniciadoras testadas para a produção de polvilho azedo em escala piloto, observou-se que os perfis moleculares encontrados na cultura pura foram os mesmos encontrados ao longo de todo o processo fermentativo, permitindo atestar a permanência dos micro-organismos inoculados durante os 21 dias de fermentação em escala piloto. Além disso, reforça seu potencial de uso com esta finalidade e a eficiência do monitoramento por técnicas moleculares para seu controle.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DO POLVILHO OBTIDO EM ESCALA PILOTO

As características físico-químicas dos diferentes polvilhos produzidos em escala piloto, como a ATT e o índice de expansão foram utilizados como critérios para avaliar as culturas iniciadoras testadas (Figura 15) (Apêndice F). Em relação à ATT, os polvilhos obtidos com as culturas iniciadoras A e B, *L. plantarum* em cultura pura e em associação com *P. scutulata* respectivamente, apresentaram valores maiores de acidez ($3,02 \pm 0,02$ e $3,06 \pm 0,44$, respectivamente) do que os polvilhos obtidos com a presença da levedura do fermento comercial *S. cerevisiae* ($1,91 \pm 0,45$, para o polvilho obtido com a cultura iniciadora C, e $1,61 \pm 0,69$, para o polvilho obtido com a cultura D). Entretanto, com todas as culturas iniciadoras testadas foi possível obter polvilho azedo, já que os valores de acidez foram superiores a 1% e, de acordo com os valores estabelecidos pela legislação,

acidez máxima de 1,0% caracteriza polvilho doce enquanto acidez máxima de 5,0% caracteriza o polvilho azedo (BRASIL, 1978b).

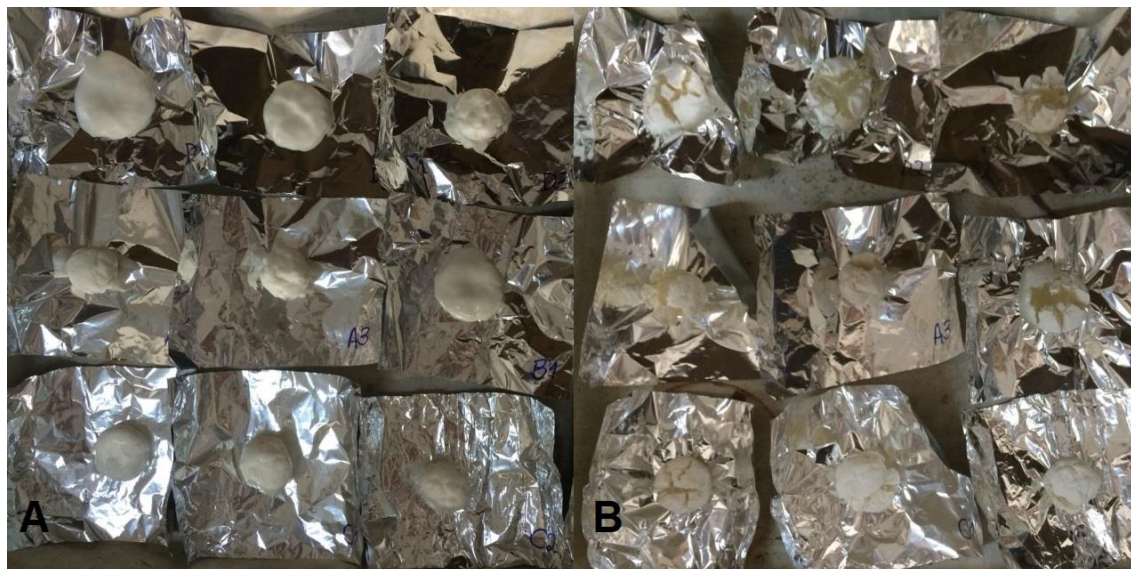
Figura 15 – Variação da Acidez Total Titulável (%) e do Índice de expansão para os polvilhos obtidos em escala piloto com as diferentes culturas



A = *L. plantarum*; B = *L. plantarum* + *P. scutulata*; C = *L. plantarum* + fermento comercial; D = fermento comercial

Os valores de índices de expansão para os polvilhos obtidos com as diferentes culturas iniciadoras não diferiram entre si ($p > 0,05$), porém, como todos são maiores que 1, foi possível perceber que independente da cultura testada a fécula de mandioca fermentada se tornou uma massa expansível, característica fundamental que permite a utilização do polvilho azedo em produtos de panificação (Figura 16). Uma das explicações para a ausência de diferença no índice de expansão dos polvilhos produzidos em escala piloto é que, apesar das culturas iniciadoras serem diferentes, o processo de obtenção foi o mesmo, fermentação seguida por secagem ao sol, e é a combinação dessas etapas que diminui a força de resistência da massa à expansão (ALVARADO *et al.*, 2013; ZHU *et al.*, 2015).

Figura 16 – Aspecto dos biscoitos de polvilho antes (A) e depois (B) de assados a 220 °C por 20 minutos na análise de expansão da massa



Penido (2013) também não observou diferença significativa entre os índices de expansão dos polvilhos obtidos com o uso de diferentes culturas iniciadoras, nem em relação ao teste realizado com o polvilho comercial. Aquino *et al.* (2013) também avaliaram o índice de expansão da massa, como um parâmetro para verificar a qualidade do processo fermentativo para a obtenção de polvilho azedo. Todos os biscoitos produzidos com as amostras de polvilho azedo apresentaram índices de expansão superiores aos do polvilho azedo comercial; resultado que já era esperado devido ao aprimoramento na propriedade de expansão promovida pela modificação no processo de fermentação, que consistiu em adição de 0,5% de xarope de glicose aos tanques de fermentação no início do processo.

Aquino *et al.* (2016), ao avaliar o processo produtivo de polvilho azedo em indústrias de Santa Catarina, descreveram que o índice de expansão de biscoitos de polvilho após o forneamento variou entre 1,81 (de uma amostra de polvilho obtido sem inóculo) e 2,54 (de uma amostra de polvilho obtido com inóculo de polvilho azedo ou amido e água). A capacidade de expansão do polvilho azedo sem a necessidade da adição de fermentos químicos ou biológicos, e ainda ausência de glúten, é uma das propriedades que o diferenciam de outros amidos (MARCON *et al.*, 2009).

A fécula de mandioca e os diferentes polvilhos produzidos em escala piloto foram avaliados quanto aos parâmetros microbiológicos contidos na Resolução RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001). A análise microbiológica da fécula de mandioca revelou

apenas a presença de colônias sugestivas de *B. cereus* ($1,50 \times 10^3$ UFC/g). No segundo bloco da fermentação em escala piloto, a contagem de colônias sugestivas de *B. cereus* encontrada nas amostras retiradas dos biorreatores inoculados com: cultura pura de *L. plantarum* (A) foi de $9,00 \times 10^2$ UFC/g; cultura mista de *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* (B) foi de $4,67 \times 10^2$ UFC/g, menor contagem entre as amostras testadas; cultura mista *L. plantarum* em associação com fermento comercial (C) foi de $1,43 \times 10^3$ UFC/g e na cultura pura de fermento comercial (D) foi de $9,00 \times 10^2$ UFC/g.

Esses valores não diferem entre si e são todos inferiores a tolerância permitida pela legislação que é de $3,00 \times 10^3$ UFC/g do alimento e foram encontrados em apenas um bloco. Nas amostras dos outros blocos não foi verificado o crescimento de colônias sugestivas de *B. cereus*. A verificação da presença de *B. cereus* no polvilho azedo é importante porque esta bactéria tem preferência por alimentos ricos em amido e produz toxinas, podendo causar intoxicação alimentar. Para ambas as síndromes transmitidas por *B. cereus*, emética e diarreica, um número relativamente alto de células foi geralmente encontrado em alimentos implicados na doença. Em relação a síndrome diarreica, a dose infecciosa varia de 10^5 a 10^8 UFC/g de alimento. Enquanto que para a síndrome emética, o número de células de *B. cereus* necessárias para produzir toxina emética suficiente para causar doença infecciosa pode variar de 10^3 a 10^{10} UFC/g de alimento (ARNESEN *et al.*, 2008).

Para a análise de coliformes fecais ou termotolerantes, todas as amostras provenientes de todos os blocos apresentaram o resultado < 3 NMP (Número Mais Provável) / g. Os outros resultados encontrados foram ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de todas as amostras. Desta forma, todos os polvilhos produzidos em escala piloto estariam apropriados ao consumo humano. As baixas contagens de colônias sugestivas de *B. cereus*, encontradas nos polvilhos obtidos com todas as culturas iniciadoras no segundo bloco, podem ser justificadas pelo fato de que *B. cereus* é endofítico da mandioca e um patógeno de origem alimentar mais resistente, formando esporos em condições adversas (DEMARIGNY, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2007).

A cultura pura de *L. plantarum* e a cultura mista de *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* apresentaram o melhor desempenho na fermentação em escala piloto. *L. plantarum*, além de sobreviver e predominar em contagens de cerca de $7 \log_{10}$ UFC/g, contribuiu para a acidificação do meio e, conseqüente, redução do pH. As contagens de *P. scutulata* decresceram ao longo do tempo de fermentação, mas a levedura permaneceu até o 21º dia. A queda na contagem das leveduras pode ser explicada pelo aumento acidez do meio. Isso porque o ácido láctico, metabólitos microbianos produzido

pelas BAL, é um inibidor da fermentação capaz de afetar a taxa de crescimento específico das leveduras, sendo que sua toxicidade depende estritamente da sua concentração (NGANG *et al.*, 1989; 1990).

Dentre as culturas iniciadoras testadas no presente estudo para a fermentação de fécula de mandioca em escala piloto, foi possível sugerir as duas melhores: *L. plantarum* cultura pura (tratamento A) e *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* (tratamento B). Desta forma, as amostras de polvilho azedo referentes a estes tratamentos foram, então, submetidas a análises por cromatografia gasosa.

5.6 CROMATOGRAFIA GASOSA

5.6.1 Perfil de ácidos graxos

O perfil dos ácidos graxos presentes na fécula de mandioca, polvilho doce comercial, polvilho azedo comercial e nos polvilhos obtidos pela fermentação da fécula de mandioca em escala piloto utilizando as culturas iniciadoras *L. plantarum* e *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* foram obtidos por cromatografia gasosa (Tabela 4) (figuras 17 a 21).

Tabela 4 – Perfil de ácidos graxos em amostras de fécula de mandioca e polvilho após análise por cromatografia gasosa

Ácidos graxos	Área (%)					
	T _R (min)	Fécula de mandioca	Polvilho			
			Doce comercial	Azedo comercial	<i>L.</i> <i>plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> + <i>P.</i> <i>scutulata</i>
C _{14:0} (Ácido mirístico)	3,976	4,2	5,3	4,7	1,7	1,6
C _{16:0} (Ácido palmítico)	5,500	33,9	26,5	32,3	40,2	35,8
C _{16:1} (Ácido palmitoleico)	5,724	3,1	5,0	0,7	4,3	4,7
C _{18:0} (Ácido esteárico)	7,090	18,6	20,5	22,9	10,7	11,0
C _{18:1} (Ácido oleico)	7,276	7,1	10,4	5,0	16,7	18,7
C _{18:2} (Ácido linoleico)	7,658	0,4	3,5	1,5	3,6	3,1
C _{18:3} (Ácido linolênico)	8,188	1,4	1,1	2,9	3,0	1,3
C _{20:0} (Ácido araquídico)	8,835	0,6	0,6	0,5	1,2	0,9
Outros		30,7	27,1	29,5	18,8	23,1
Ácidos graxos saturados		57,3	52,9	60,5	53,7	49,2
Ácidos graxo insaturados		12,0	20,0	10,0	27,5	27,7

T_R = tempo de retenção.

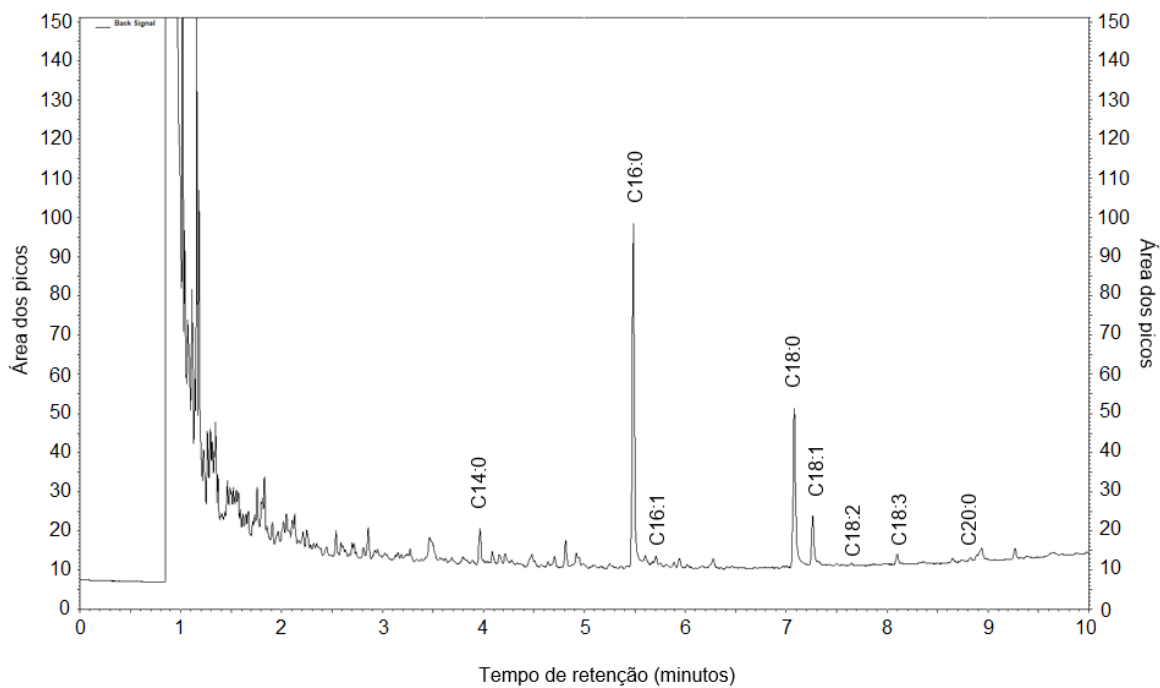
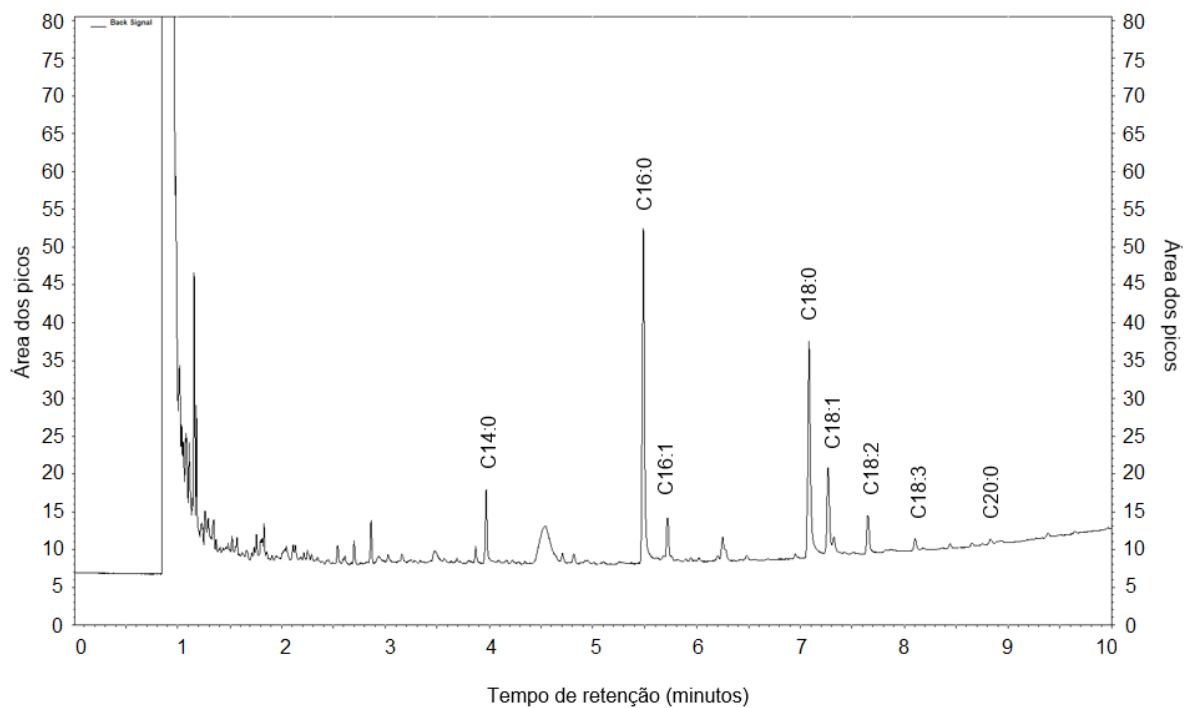
Figura 17 – Perfil de ácidos graxos da fécula de mandioca**Figura 18 – Perfil de ácidos graxos do polvilho doce comercial**

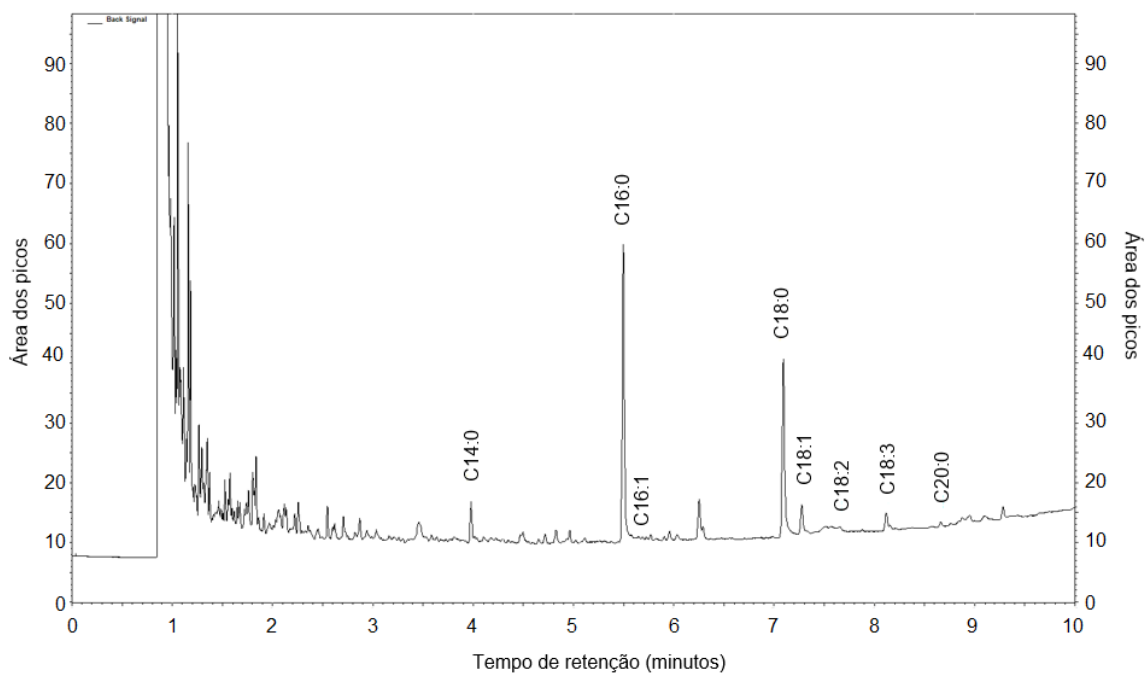
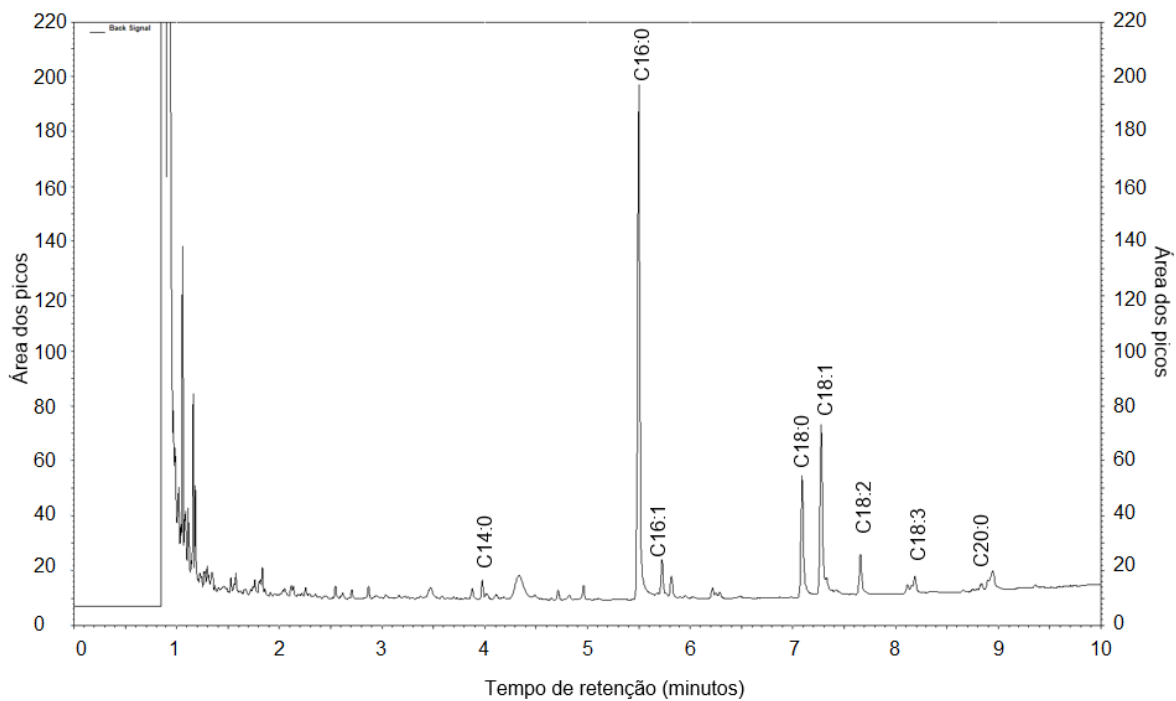
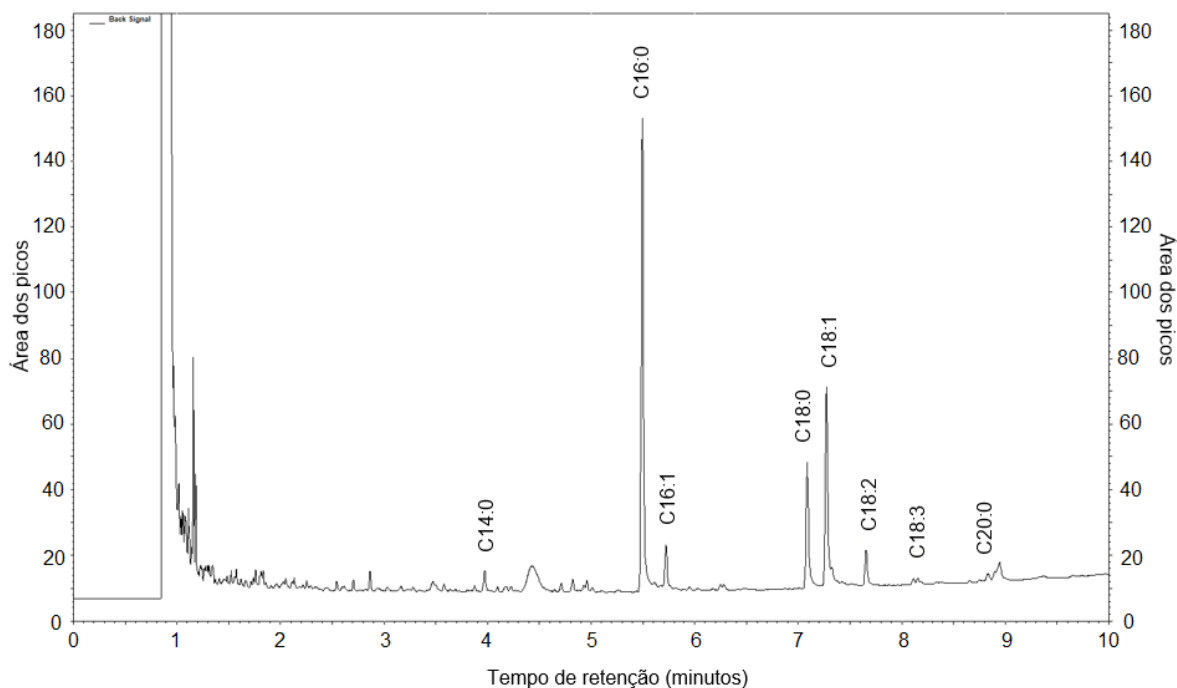
Figura 19 – Perfil de ácidos graxos do polvilho azedo comercial**Figura 20 – Perfil de ácidos graxos do polvilho obtido com *Lactobacillus plantarum***

Figura 21 – Perfil de ácidos graxos do polvilho obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Pichia scutulata*



Considerando os ácidos graxos identificados, em relação à fécula de mandioca, não fermentada, os polvilhos obtidos com *L. plantarum* e *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* resultaram numa redução da gordura saturada de 3,6% e 8,1%, respectivamente, e num aumento da gordura insaturada de aproximadamente 2,3 vezes. Nos polvilhos comerciais, o polvilho doce apresentou menor teor de gorduras saturadas que o polvilho azedo e ainda maior teor de gorduras insaturadas que o polvilho azedo comercial (10,0%). Em relação aos polvilhos comerciais, tanto o doce quanto o azedo, os polvilhos obtidos com as culturas iniciadoras levaram a um maior teor de ácidos graxos insaturados. Um maior teor de gorduras mono e poli-insaturadas agrega maior valor nutricional ao alimento (Barreto *et al.*, 2016).

O ácido oleico regula a síntese de ácidos graxos em *L. plantarum*, reprimindo a formação e a atividade de enzimas, como a acetil-CoA carboxilase. Esse ácido pode ser formado tanto aerobicamente, pela ação da dessaturase a partir do ácido esteárico ou um derivado, quanto anaerobicamente. Acredita-se que a ocorrência de ácido oleico esteja relacionada às condições de crescimento aeróbico. Assim, a indução da síntese desse ácido pode estar relacionada à proteção das células bacterianas contra os efeitos deletérios do oxigênio. A importância do oxigênio na formação do ácido oleico sustenta

a presença de uma dessaturase, como as encontradas em leveduras e algumas bactérias (SUUTARI; LAAKSO, 1992).

O ácido oleico (também conhecido como ômega-9), o ácido linoleico (ômega-6) e o ácido linolênico (ômega-3) são ácidos graxos que desempenham papéis fundamentais para o bom funcionamento do metabolismo humano. A fermentação da fécula de mandioca utilizando *L. plantarum* e também *L. plantarum* com *P. scutulata* foi capaz de aumentar consideravelmente a proporção desses três ácidos no produto final (Tabela 4). Esse incremento na qualidade nutricional reforça a importância do uso de culturas iniciadoras para a produção do polvilho azedo.

O aumento dos lipídeos, tais como os ácidos graxos, altera positivamente as propriedades físico-químicas dos alimentos amiláceos, como o polvilho azedo. Isso porque a formação de complexos entre a fração amilose do amido e os lipídeos afetam a formação da estrutura e a textura desses produtos (DE PILLI *et al.*, 2011). Desta forma, a adição de cultura iniciadora, seja ela pura com BAL ou mista com leveduras, traz um benefício para o produto final, aumentando o teor de ácidos graxos insaturados.

5.6.2 Compostos voláteis

A presença de compostos voláteis na fécula de mandioca, polvilho doce comercial, polvilho azedo comercial e nos polvilhos obtidos na fermentação em escala piloto com *L. plantarum* e *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* foram avaliadas por GC-MS. Foram identificados 46 compostos voláteis nas amostras em estudo (Tabela 5) (figuras 22 a 26). Esses compostos incluíam ácidos carboxílicos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, um éter, um fenol e alguns hidrocarbonetos.

Tabela 5 – Identificação e área do pico (%) de compostos voláteis em amostras de fécula de mandioca e polvilho após análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Compostos	Fórmula molecular	T _R (min)	Área do pico (%)				
			Fécula de mandioca	Polvilho			
				Doce comercial	Azedo comercial	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum + P. scutulata</i>
Ácidos carboxílicos:							
Ácido caproico	C ₆ H ₁₂ O ₂	12,821	-	-	1,16	-	-
Ácido oleico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	24,897	-	-	0,17	-	-
Ácido linoleico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	26,140	-	-	-	-	0,89
Ácido nonahexacontanoico	C ₆₉ H ₁₃₈ O ₂	29,500	-	-	0,56	-	-
Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	31,612	0,26	1,38	0,97	0,34	7,72
Ácido 9-hexadecenoico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	32,203	-	-	-	0,03	0,69
Ácido esteárico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	35,669	-	0,94	-	-	0,65
Ácido 4-hexil-2,5-di-hidro-2,5-dioxo-3-furanacético	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	17,692	-	-	-	-	2,84
Álcoois:							
Octildodecanol	C ₂₀ H ₄₂ O	12,972	0,03	-	-	-	-
2-Hexil-decan-1-ol	C ₁₆ H ₃₄ O	16,705	-	0,23	-	-	0,29
<i>trans</i> -Hexadec-9-en-1-ol	C ₁₆ H ₃₂ O	23,069	0,02	0,69	-	-	-
Álcool cetílico	C ₁₆ H ₃₄ O	23,080	-	1,44	0,77	-	-
Álcool estearílico	C ₁₈ H ₃₈ O	26,664	-	-	0,70	-	-
2-Metil-hexadecan-1-ol	C ₁₇ H ₃₆ O	26,664	0,02	-	-	-	0,14
Esclareol	C ₂₀ H ₃₆ O ₂	32,621	-	-	-	0,25	-
Aldeídos:							
E-15-Heptadecenal	C ₁₇ H ₃₂ O	12,977	-	0,38	-	-	-
Z-7-Hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O	24,903	-	0,11	-	-	-
Cetonas:							
2-Isopropil-5,5-dimetilciclohex-2-enona	C ₁₁ H ₁₈ O	19,174	-	-	-	-	0,29
4a-Metil-4,4a, 5,6,7,8-hexahidro-2 (3H)-naftalenona	C ₁₁ H ₁₆ O	22,384	-	-	-	0,07	-
13β-Metil-13-vinil-podocarp-7-en-3-ona	C ₂₀ H ₃₀ O	32,515	-	-	-	0,27	-
Ésteres:							
6-Pentil-2H-piran-2-ona	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	19,163	-	-	-	1,00	-
Isoestearato de metila	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	23,955	-	0,12	-	-	-
Ácido 1,2-benzenedicarboxílico, bis (2-metilpropil) éster	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	25,805	-	0,59	0,88	-	-
Ácido ftálico, butil tetradecil éster	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	25,828	-	-	-	-	0,28
Ácido ftálico, 3-hexil isobutil éster	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	25,833	0,06	-	-	-	-
Benzoato de benzila	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	27,204	-	0,58	1,63	-	-
Ácido ftálico, butil octil éster	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	28,335	0,02	-	-	-	-
Dibutilftalato	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	28,358	-	0,41	-	-	-
Tributil (Z)-prop-1-eno-1,2,3-tricarboxilato	C ₁₈ H ₃₀ O ₆	29,489	-	0,42	-	-	-
Isovalerato de geranila	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	30,258	-	-	-	-	0,81
Adipato de dioctila	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	30,436	-	-	0,19	-	-
Acetil tributil citrato	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	31,679	-	16,34	19,45	-	-

(continua)

(conclusão)

Compostos	Fórmula molecular	TR (min)	Área do pico (%)				
			Fécula de mandioca	Doce comercial	Azedo comercial	<i>L. plantarum</i>	<i>L. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>
Éter:							
14-Oxatriciclo [9..2.1.0 (1,10)] tetradecano, 2,6,6,10,11-pentametil-	C ₁₈ H ₃₀ O	31,038	-	-	-	0,11	-
Fenol:							
2,4-Di- <i>tert</i> -butilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	21,810	0,06	1,80	8,07	0,04	-
Hidrocarbonetos:							
2,6,10-trimetil-tetradecano	C ₁₇ H ₃₆	10,698	0,06	-	-	-	-
E-7-Octadeceno	C ₁₈ H ₃₆	12,977	-	0,14	0,37	-	-
Docosano	C ₂₂ H ₄₆	19,826	-	-	0,48	-	-
Heptacosano	C ₂₇ H ₅₆	21,765	0,02	0,69	4,78	-	0,69
Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	23,660	0,04	-	2,55	-	0,33
Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	25,404	0,07	-	3,99	-	0,59
Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	27,087	0,09	0,70	5,17	-	-
Octacosano	C ₂₈ H ₅₈	30,264	-	-	4,10	-	-
Nonacosano	C ₂₉ H ₆₀	31,707	0,07	-	-	-	-
Triacotano	C ₃₀ H ₆₂	33,445	-	2,14	0,09	-	-
Tetratriacontano	C ₃₄ H ₇₀	33,569	-	-	2,41	-	-
Hentriacontano	C ₃₁ H ₆₄	35,546	-	1,84	-	-	-

T_R = tempo de retenção

Figura 22 – Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para a fécula de mandioca

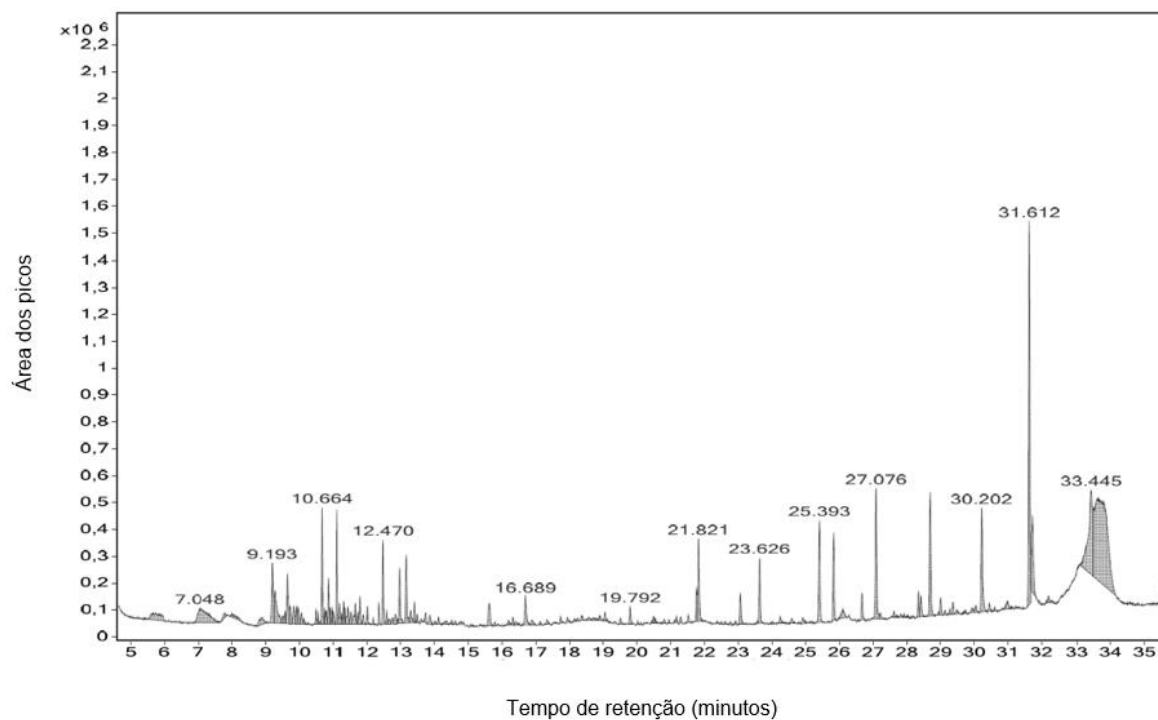


Figura 23 – Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho doce comercial

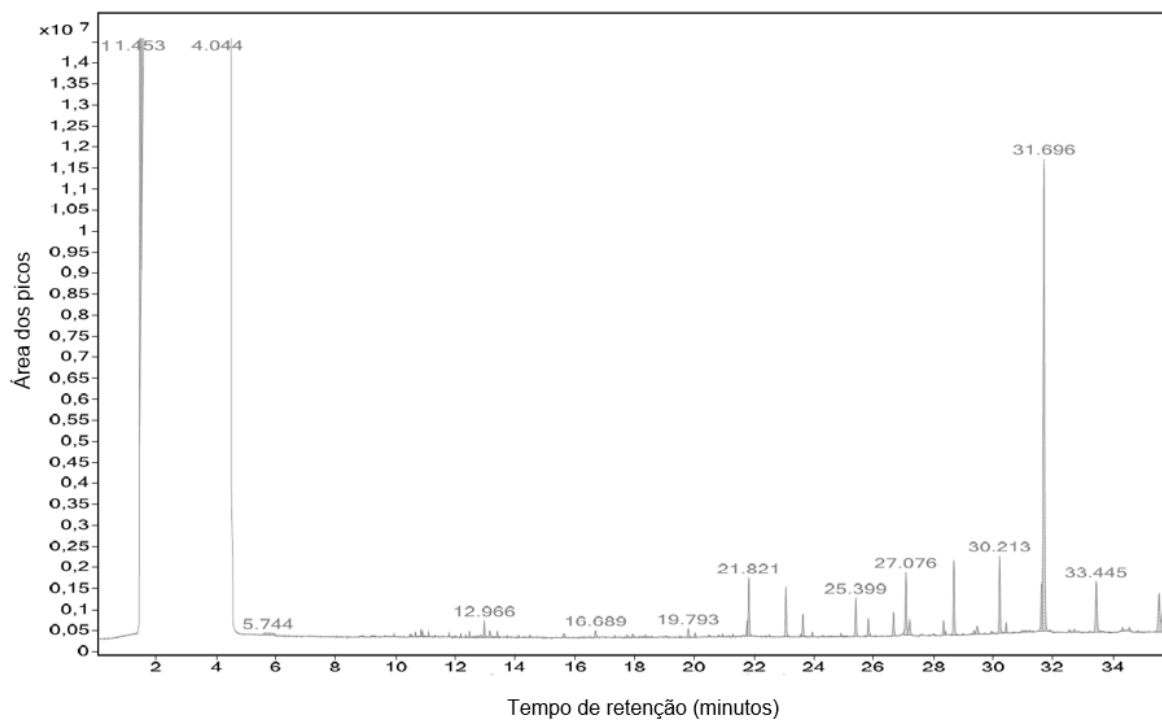


Figura 24 – Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho azedo comercial

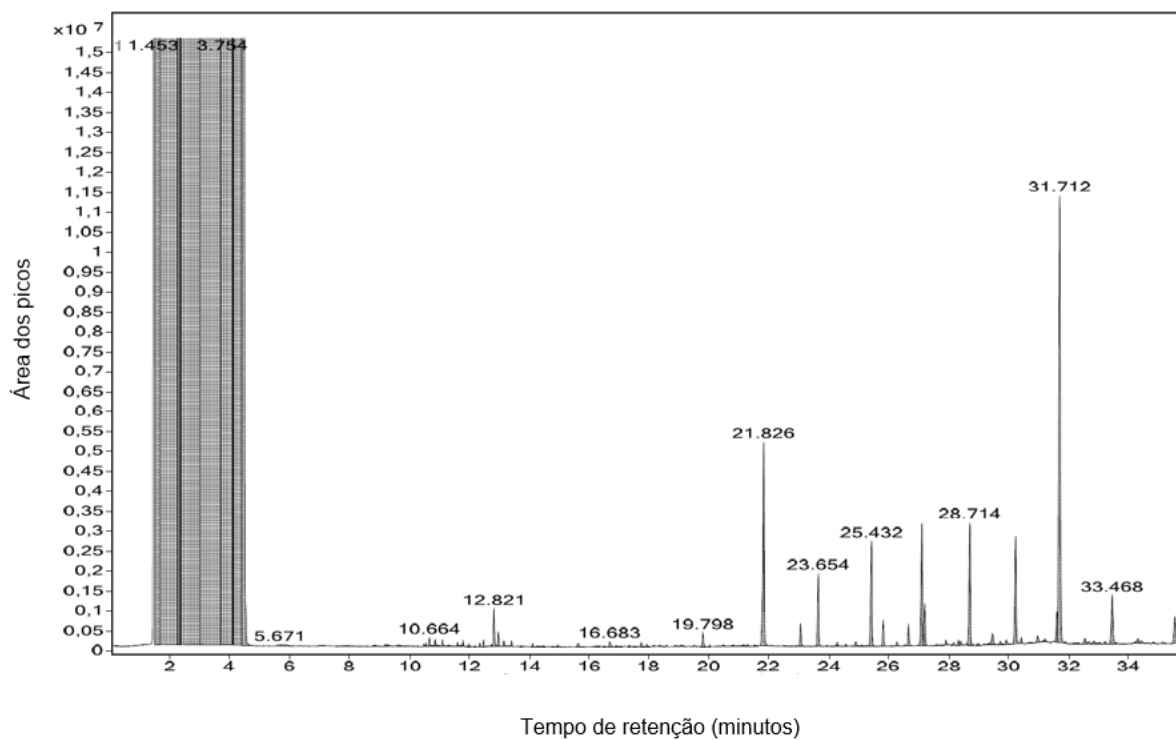


Figura 25 – Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho obtido com *Lactobacillus plantarum*

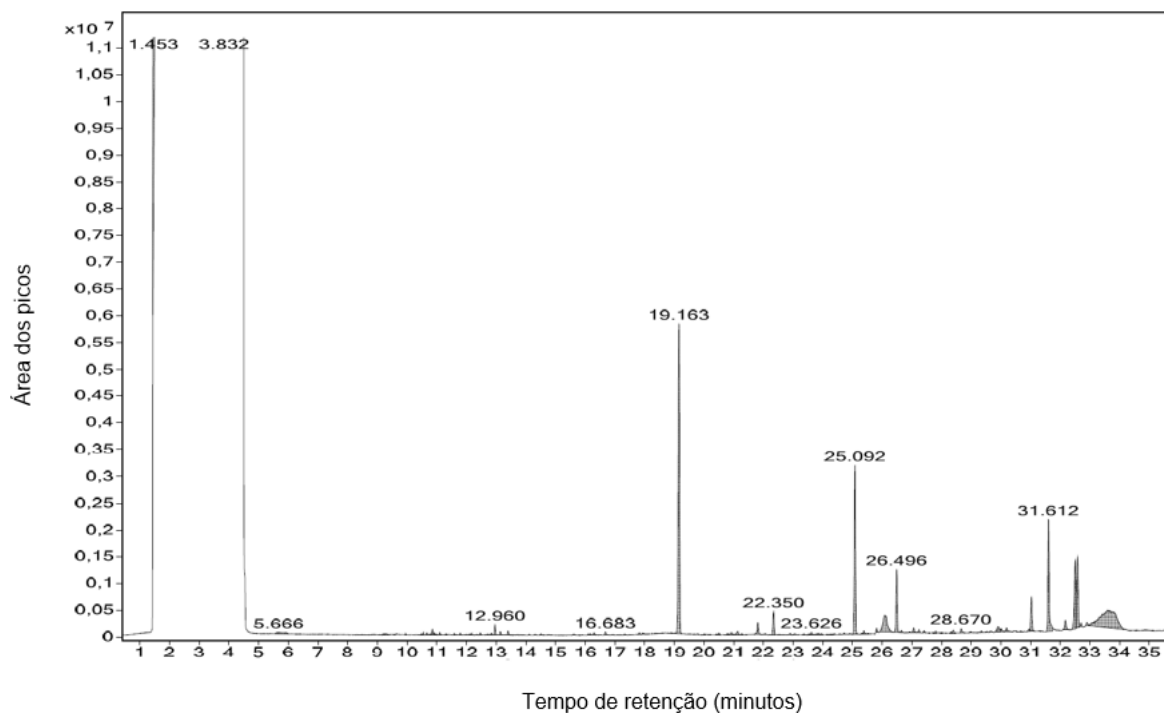
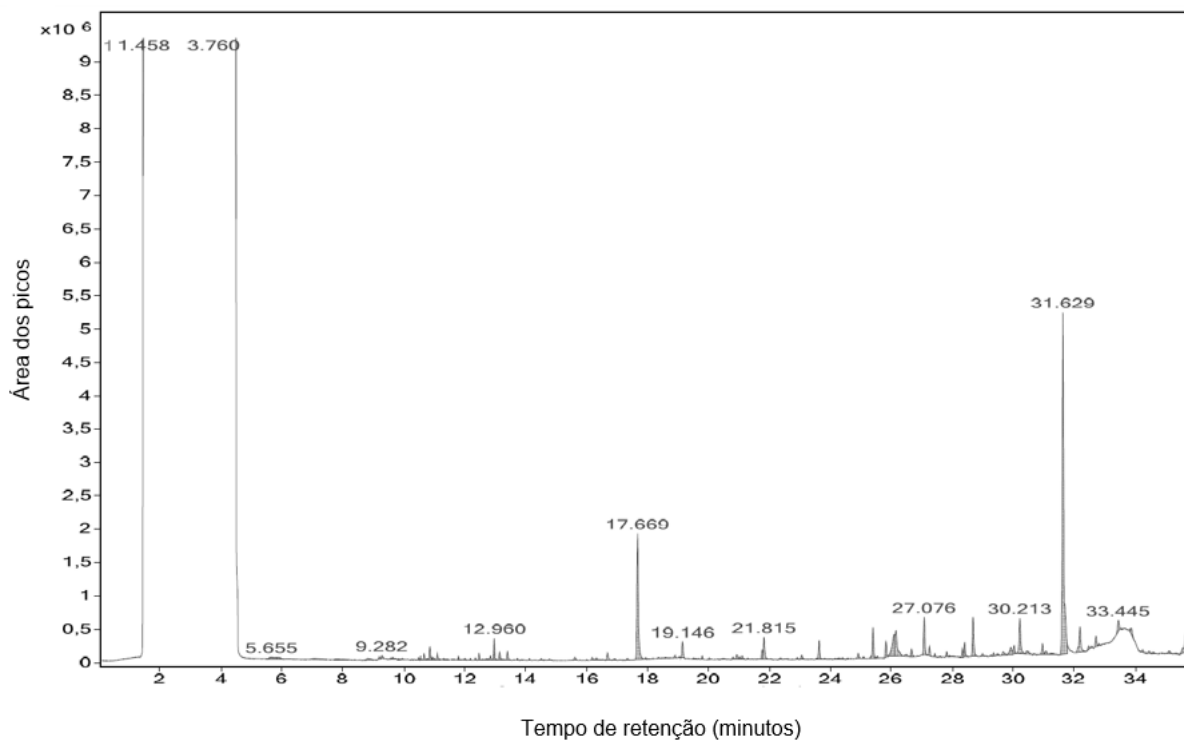


Figura 26 – Perfil cromatográfico obtido por GC-MS para o polvilho obtido com *Lactobacillus plantarum* e *Pichia scutulata*



Dentre os oito diferentes ácidos carboxílicos encontrados, a maior diversidade (cinco) foi detectada na amostra de polvilho obtido em escala piloto com *L. plantarum* e *P. scutulata*. O ácido 4-hexil-2,5-di-hidro-2,5-dioxo-3-furanacético, por exemplo, estava presente apenas no polvilho obtido com cultura mista, trata-se de um composto naturalmente encontrado em pequenas quantidades em uma grande variedade de alimentos, incluindo vinhos (GARCÍA-CARPINTEIRO *et al.*, 2011), sendo provavelmente produzido com um resíduo do metabolismo das leveduras. Esse ácido foi encontrado previamente entre os constituintes voláteis de amêndoas tropicais da Malásia torradas a 200 °C, se caracterizando pelo odor amadeirado (LASEKAN; ABBAS, 2010)

O ácido palmítico estava presente em todas as amostras testadas, conforme esperado, já que esse é um ácido muito comum no reino vegetal, animal e microbiano. Entretanto, o ácido 9-hexadecenoico, que é insaturado, foi encontrado apenas nos polvilhos obtidos em escala piloto, tanto em cultura pura quanto cultura mista. Outros ácidos saturados foram encontrados no polvilho azedo comercial, como os ácidos caproico e nonahexacontanoico. O ácido caproico é um ácido graxo de odor característico de caprinos, composto volátil que já foi encontrado em soro de queijo fermentado na concentração de $107,92 \pm 0.93 \mu\text{g/L}$ (ANDRADE *et al.*, 2017).

Foram encontrados sete álcoois nas amostras avaliadas, dos quais dois estavam presentes no polvilho fermentado com *L. plantarum* e *P. scutulata* e apenas um, no polvilho fermentado com *L. plantarum*. O 2-metil-hexadecan-1-ol, presente na fécula de mandioca e no polvilho obtido com cultura mista, também foi isolado da folha da noz Manchurian (SUN *et al.*, 2011). O esclareol, presente apenas no polvilho obtido com a cultura pura, é um álcool diterpênico bicíclico perfumado, que já foi encontrado em óleos essenciais (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014). Dentre os demais álcoois, o álcool *trans*-hexadec-9-en-1-ol, cetílico e estearílico foram encontrados em alimentos e bebidas. O álcool *trans*-hexadec-9-en-1-ol foi encontrado entre os compostos orgânicos voláteis em rum australiano (CARDEAL; MARRIOT, 2009). O álcool cetílico e o álcool estearílico são álcoois graxos encontrados em vegetais, tais como a semente da planta asiática nim (SONALE *et al.*, 2018) e a pimenta Habanero (PINO *et al.*, 2006), respectivamente.

Os dois aldeídos que foram encontrados estavam presentes apenas no polvilho doce comercial, dentre os quais, o aldeído E-15-heptadecenal também foi encontrado na semente de nim (SONALE *et al.*, 2018).

As três cetonas encontradas estavam apenas nos polvilhos obtidos na fermentação em escala piloto. As cetonas 4a-Metil-4,4a, 5,6,7,8-hexa-hidro-2 (3H)-

naftalenona e 13 β -Metil-13-vinil-podocarp-7-en-3-ona foram detectadas no polvilho fermentando com a cultura pura, sendo que esta última também já foi detectada a partir do extrato aquoso da casca da fruta-do-conde (*Annona squamosa*), numa concentração de 5,98%. Esse extrato exibiu atividade adulticida contra carrapato e mosca hematófaga, além de atividade larvicida contra carrapato e mosquitos (MADHUMITHA *et al.*, 2012). A cetona 2-Isopropil-5,5-dimetilciclo-hex-2-enona foi encontrada apenas no polvilho obtido com a cultura mista.

Os ésteres foram os compostos com maior variedade (doze), juntamente com os hidrocarbonetos. O único éster encontrado na fécula de mandioca foi o éster do ácido ftálico, butil octil éster, um metabólito antimicrobiano produzido por *Acinetobacter* sp (PANDEY *et al.*, 2011). O éster 6-Pentil-2H-piran-2-ona foi encontrado apenas no polvilho com *L. plantarum*. No polvilho obtido com *L. plantarum* e *P. scutulata*, foram detectados o ácido ftálico, butil tetradecil éster e o isovalerato de geranila, este último está associado com aroma frutado (AI-NONG; BAO-GUO, 2005). Na avaliação sensorial de amostras de *kivunde* fermentadas usando *L. plantarum* como cultura iniciadora, também foi observado um aroma frutado "agradável", evidenciando a habilidade dos micro-organismos em produzir compostos aromáticos em populações dominadas por BAL (KIMARYO *et al.*, 2010). O éster do ácido ftálico, ácido 1,2-benzenedicarboxílico, bis (2-metilpropil) éster, é um composto de origem vegetal que não pode ser metabolizado pelos micro-organismos (FREIRE *et al.*, 2015). Foi encontrado nas amostras de polvilho doce e azedo e também em todas as fermentações com culturas puras e mistas para a produção da *yakupa* testadas por Freire *et al.* (2015).

Outros ésteres importantes detectados no presente estudo, já foram previamente descritos na literatura. O isoestearato de metila, éster derivado do ácido margárico, foi o composto predominantemente encontrado no óleo da semente de tamarindo, na concentração de 54,57% (CHOPPA *et al.*, 2015). Vários ésteres do ácido ftálico foram identificados como compostos voláteis por GC-MS na semente de nim, tais como o ácido ftálico, 3-hexil isobutil éster (SONALE *et al.*, 2018). O dibutilftalato é um componente bioativo com propriedade antifúngica, que estava entre os principais componentes presentes no extrato de *Streptomyces* KX852460 (AHSAN *et al.*, 2017). O tributil (Z)-prop-1-eno-1,2,3-tricarboxilato foi encontrado entre os compostos aromáticos voláteis da cidra obtida a partir da fermentação do suco de maçã (WILLIAMS; TUCKNOTT, 1978). Acetil tributil citrato foi identificado por GC-MS na casca de canela, cujo extrato metanólico mostrou atividade antifúngica notável contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus* (HAMEED *et al.*, 2016).

Foi detectado apenas um éter, o 14-Oxatriciclo [9.2.1.0 (1,10)] tetradecano, 2,6,6,10,11-pentametil-, no polvilho obtido com *L. plantarum*. Também foi detectado apenas um fenol, o 2,4 di-*terc*-butilfenol, que estava presente na fécula de mandioca, polvilhos doce e azedo comercial e no polvilho obtido com *L. plantarum*. Esse composto orgânico volátil, que já foi purificado a partir do sobrenadante de células livres de um isolado *Lactococcus* sp., apresentou atividade fungicida, no teste de difusão em disco, contra *A. niger*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium chrysogenum*. Além da propriedade antifúngica, esse composto apresentou atividade antioxidante e demonstrou potencial para o desenvolvimento de um aditivo alimentar (VARSHA *et al.*, 2015).

Os componentes pertencentes à função orgânica dos hidrocarbonetos, como alcanos e alcenos, são comumente identificados em fontes vegetais. Se caracterizam por serem os compostos menos polares da fração insaponificável. Foram detectados em maior variedade nas amostras de fécula de mandioca e polvilhos comerciais. O E-7-octadeceno foi encontrado em três variedades de amendoim da Tunísia (CHERIF *et al.*, 2013). Docosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano, octacosano e nonacosano foram encontrados entre os compostos voláteis responsáveis pelo aroma na casca de laranjas cultivadas na Líbia, em baixas concentrações (MACLEOD *et al.*, 1988) e também entre os compostos voláteis das folhas, flores, partes aéreas e caules de *Tamarix boveana*, nas quais também foi detectado triacontano (SAÏDANA *et al.*, 2008).

Dessa forma, é possível perceber que os compostos detectados nas amostras de fécula e polvilho são componentes voláteis que já foram identificados por cromatografia gasosa em plantas, alimentos fermentados e ainda como produtos do metabolismo de bactérias e leveduras, podendo apresentar aroma desejável, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana. Os compostos detectados apenas no polvilho obtido com a cultura mista são capazes de conferir aroma aos alimentos. O ácido 4-hexil-2,5-di-hidro-2,5-dioxo-3-furanacético (2,84%) está associado ao odor amadeirado (LASEKAN; ABBAS, 2010), enquanto o isovalerato de geranila (0,81%) está associado com aroma frutado (AI-NONG; BAO-GUO, 2005). Deste modo, apesar da presença da levedura em associação com a BAL não ocasionar uma alteração significativa na ATT e no índice de expansão do produto final, auxiliou na produção de compostos aromáticos desejáveis contribuindo para o sabor e o aroma característicos do produto final.

6 CONCLUSÃO

Todos os onze isolados presumivelmente identificados como pertencentes ao grupo de *L. plantarum* foram confirmados como pertencentes à essa espécie, sendo que eram de quatro linhagens distintas. O isolado selecionado entre as BAL foi *L. plantarum* Lp3, que apresentou atividade antagonista e capacidade de acidificação, e o isolado selecionado da levedura foi *P. scutulata* Ps9 que apresentou atividade amilolítica. Com todas as culturas iniciadoras testadas, foi possível fermentar a fécula de mandioca e produzir polvilho azedo em escala piloto. Além disso, o tempo de fermentação foi reduzido para 21 dias.

A cultura pura de *L. plantarum* e a cultura mista de *L. plantarum* com *P. scutulata* apresentaram melhor desempenho em relação às culturas iniciadoras contendo o fermento comercial na fermentação em escala piloto, não se diferenciando entre si quanto aos parâmetros físico-químicos testados. Os polvilhos obtidos em escala piloto tinham padrão microbiológico que atendia aos requisitos da legislação brasileira. O isolado de *L. plantarum* Lp3, além de sobreviver e predominar na fermentação em altas contagens, como observado por meio do monitoramento molecular, contribuiu para a acidificação do meio e forneceu uma garantia razoável do controle dos micro-organismos patogênicos.

Quando comparados à fécula de mandioca, matéria-prima não fermentada, os polvilhos obtidos com *L. plantarum* e *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* resultaram na redução da gordura saturada e aumento da gordura insaturada, que incluiu os ácidos graxos oleico, linoleico e linolênico, capazes de agregar maior valor nutricional ao produto final.

A fécula de mandioca, não fermentada, apresentou menor quantidade e menor proporção dos compostos voláteis de interesse. Isso porque esses compostos identificados por cromatografia gasosa são oriundos do metabolismo microbiano, sendo sintetizados pelas BAL e leveduras. No polvilho obtido com a cultura mista, ou seja, com a presença da levedura, foi detectada uma maior variedade de compostos voláteis do que no polvilho obtido com a cultura pura e do que a fécula de mandioca. Além disso, os compostos em comum entre os polvilhos obtidos com as culturas iniciadoras, estavam em maior proporção no polvilho obtido com *L. plantarum* e *P. scutulata*.

Desta forma, a adição de uma cultura iniciadora, seja ela de BAL pura ou em associação com leveduras, traz benefícios tecnológicos, tais como redução do custo e

do tempo de fermentação, bem como benefício nutricional para o produto final, pelo aumento do teor de ácidos graxos insaturados. No entanto, entre as culturas iniciadoras testadas, a cultura de *L. plantarum* em associação com *P. scutulata* foi a que apresentou melhores resultados em escala piloto, levando à obtenção de um polvilho azedo seguro para o consumo humano, com ATT satisfatória, capacidade de expansão, maior teor de gorduras insaturadas e ainda com a presença de maior variedade de compostos voláteis desejáveis. Conseqüentemente, essa cultura iniciadora é a mais adequada para ser testada na fermentação em escala industrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAM (Associação Brasileira dos Produtores de Amido de Mandioca). **Produção brasileira de amido de mandioca 1990 a 2009**. 2009. Disponível em: <<http://www.abam.com.br>> Acesso em: 22 set. 2011.

ABEDFAR, A.; HOSSEININEZHAD, M.; SADEGHI, A.; RAEISI, M.; FEIZY, J. Investigation on “spontaneous fermentation” and the productivity of microbial exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 686-693, 2018.

ADEBAYO, C. O.; ADERIYE, B. I., AKPOR, O. B. Occurrence and antimicrobial properties of lactic acid bacteria during the fermentation of cassava mash, maize and sorghum grains. **Microbiology Research International**, v. 1, p. 27-32, 2013.

ADEGUNWA, M. O.; SANNI, L. O.; MAZIYA-DIXON, B. Effects of fermentation length and varieties on the pasting properties of sour cassava starch. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 42, p. 8428-8433, 2011.

ADESULU-DAHUNSI, A. T.; SANNI, A. I.; JEYARAM, K. Rapid differentiation among *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Weissella* species from some Nigerian indigenous fermented foods. **LWT- Food Science and Technology**, v. 77, p. 39-44, 2017a.

ADESULU-DAHUNSI, A. T.; SANNI, A. I.; JEYARAM, K.; BANWO, K. Genetic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains from some indigenous fermented foods in Nigeria. **LWT- Food Science and Technology**, v. 82, p. 199-206, 2017b.

AHSAN, T.; CHEN, J.; ZHAO, X.; IRFAN, M.; WU, Y. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. **AMB Express**, v. 7, p. 54-62, 2017.

AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, v. 6, p. 30-39, 2006.

AI-NONG, Y.; BAO-GUO, S. Flavour substances of Chinese traditional smoke-cured bacon. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 227-233, 2005.

ALAMU, E. O.; MAZIYA-DIXON, B.; DIXON, A. G. Evaluation of proximate composition and pasting properties of high quality cassava flour (HQCF) from cassava genotypes

(*Manihot esculenta* Crantz) of β -carotene-enriched roots. **LWT – Food Science and Technology**, v.86, p.501-506, 2017.

ALMEIDA, E. G.; RAHCID, C. C. T. C.; SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 146-151, 2007.

ALONSO-GOMEZ, L.; NIÑO-LÓPEZ, A. M.; ROMERO-GARZÓN, A. M.; PINEDA-GOMEZ, P.; DEL REAL-LOPEZ, A.; RODRIGUEZ-GARCIA, M. E. Physicochemical transformation of cassava starch during fermentation for production of sour starch in Colombia. **Starch/Stärke**, v. 68, p. 1139–1147, 2016.

ALVARADO, P. M.; GROSMARE, L.; DUFOUR, D.; TORO, A. G.; SÁNCHEZ, T.; CALLE, F.; SANTANDER, M. A. M.; CEBALLOS, H.; DELARBRE, J. L.; TRAN, T. Combined effect of fermentation, sun-drying and genotype on breadmaking ability of sour cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1137-1146, 2013.

ALVES, A. A. C.; MANTHEY, L.; ISBELL, T.; ELLIS, D.; JENDEREK, M. M. Diversity in oil content and fatty acid profile in seeds of wild cassava germplasm. **Industrial Crops and Products**, v. 60, p. 310-315, 2014.

AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, 138-146, 2007.

AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 45-54, 2001.

ANDRADE, R. P.; MELO, C. N.; GENISHEVA, Z.; SCHWAN, R. F.; DUARTE, W. F. Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. **Food Research International**, v. 91, p. 72-79, 2017.

ANYOGU, A.; AWAMARIA, B.; SUTHERLAND, J. P.; OUOBA, L. I. I. Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. **Food Control**, v.39, p. 119-127, 2014.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**. International. 20. ed. Gaithersburg, MD, EUA: AOAC, 2016. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 09 nov. 2016.

AQUINO, A. C. M. S.; GERVIN, V. M.; AMANTE, E. R. Avaliação do processo produtivo de polvilho azedo em indústrias de Santa Catarina. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.19, p. 1-8, 2016.

AQUINO, A. C. M.; PEREIRA, J. M.; WATANABLE, L. B.; AMANTE, E. R. Standardisation of the sour cassava starch reduces the processing time by fermentation water monitoring. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 1892-1898, 2013.

ARAÚJO, H. M. C.; ARAÚJO, W. M. C.; BOTELHO, R. B. A.; ZANDONADI, R. P. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 3, p. 467-474, 2010.

ARNESEN, L. P. S.; FAGERLUND, A.; GRANUM, P. E. From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 579–606, 2008.

AVIARA, N. A.; IGBEKA, J. C.; NWOKOCHA, L. M. Effect of drying temperature on physicochemical properties of cassava starch. **International Agrophysics**, v. 24, p. 219-225, 2010.

AYOADE, F.; ADENIJI, P. O.; AMOLE, K. S.; AMAREMO, Y. A.; APATA, T. O.; FAYEMI, S. O.; OYEJIDE, N. O.; ABAZUH, U. D.; KAYODE, T. A.; DARAMOLA, G. G.; FOLARIN, O. The predominant lactic acid microorganisms and proximate composition of spontaneously fermented *gari* and *fufu*, cassava food products. **Annual Research & Review in Biology**, v. 26, n. 2, p. 1-12, 2018.

BALAGOPALAN, C. Cassava Utilization in Food, Feed and Industry. In: HILLOCS, R. J.; THRESH, J. M.; BELLOTTI, A. C. (Eds.). **Cassava: Biology, Production and Utilization**. 1. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 301-318.

BANWO, K.; SANNI, A.; TAN, H.; TIAN, Y. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from some Nigerian traditional fermented foods. **Food Biotechnology**, v. 26, p. 124-142, 2012.

BARRETO, A. D.; GUTIERREZ, E. M. R.; SILVA, M. R.; SILVA, F. O.; SILVA, N. O.C.; LACERDA, I. C. A.; LABANCA, R. A.; ARAÚJO, R. L. B. Characterization and Bioaccessibility of Minerals in Seeds of *Salvia hispanica* L. **American Journal of Plant Science**, v. 7, p. 2323-2337, 2016.

BENNETT, R. W.; BELAY, N. *Bacillus cereus*. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: Apha, 2001. p. 311-316.

BERTOLINI, A. C.; MESTRES, C.; LOURDIN, D.; VALLE, G. D.; COLONNA, P. Relationship between thermomechanical properties and baking expansion of sour

cassava starch (*Polvilho azedo*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p.429-435, 2001.

BOONNOP, K.; WANAPAT, M.; NONTASO, N.; WANAPAT, S. Enriching nutritive value of cassava root by yeast fermentation. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 5, p. 629-633, 2009.

BORGES, M. F.; FUKUDA, W. M. G. Teor de cianeto em raízes frescas e processadas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) de mesa. **Revista Brasileira de Mandioca**, v. 8, p. 71-76, 1989.

BOTTHOULATH, V.; UPAICHIT, A.; THUMARAT, U. Identification and in vitro assessment of potential probiotic characteristics and antibacterial effects of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* SK119, a bacteriocinogenic strain isolated from Thai fermented pork sausage. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 7, p. 2774-2785, 2018.

BRASIL. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Resolução de 12 de março de 1978**. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial, Brasília, 24 jul. 1978a, p. 11499-11528.

BRASIL. **Decreto n. 12.486, de 20 de outubro de 1978**. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo, 21 out. 1978b.

BRASIL. **Resolução RDC ANVISA/MS nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, 10 jan. 2001. Seção I.

BRIGHTWELL, G.; BOEREMA, J.; MILLS, J. E.; PULFORD, D. Identifying the bacterial community on the surface of Intralox™ belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, p. 47-53, 2006.

BURNS, A. E.; GLEADOW, R. M.; ZACARIAS, A. M.; CUAMBE, C. E.; MILLER, R. E.; CAVAGNARO, T. R. Variations in the chemical composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves and roots as affected by genotypic and environmental variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4946-4956, 2012.

CAETANO, Renata Gomes. **Isolamento e identificação molecular de bactérias lácticas e leveduras envolvidas no processo fermentativo da mandioca para produção de tucupi e avaliação higiênico sanitária**. 2018. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F.; Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 1999.

CARDEAL, Z. L.; MARRIOTT, P. J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry analysis and comparison of volatile organic compounds in Brazilian *cachaça* and selected spirits. **Food Chemistry**, v. 112, p. 747-755, 2009.

CÁRDENAS, O. S.; BUCKLE, T. S. Source of cassava starch production: A preliminary study. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 1509-1512, 1980.

CEPEA/ESALQ-USP (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo). **Produção de fécula diminui em 2007, mas receita aumenta**. 2007. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 31 maio 2013.

CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; GRANDE-TOVAR, C. D.; CUERVO-MULET, R.; DELGADO-OSPINA, J.; PAPARELLA, A. Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: the Colombian heritage. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1031-1048, 2014.

CHERIF, A. O.; MESSAOUDA, M. B.; PELLERIN, I.; BOUKCHINA, S.; KALLEL, H. PEPE, C. Screening and Profiling of Hydrocarbon Components and Squalene in Developing Tunisian Cultivars and Wild *Arachis hypogaea* L. Species. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 675-686, 2013.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Determinação de cianeto durante as etapas de processamento da farinha de mandioca do grupo seca. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRA, III, E SEMINÁRIO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, IX, 2005, Belém.

CHOPPA, T.; SELVARAJ, C. I.; ZACHARIAH, A. Evaluation and Characterization of Malabar Tamarind [*Garcinia cambogia* (Gaertn.) Desr.] Seed Oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5906-5913, 2015.

COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S.; CHISTÉ, R. C. **Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental - Documentos, 2007. 23 p.

COLLINS, M. D.; RODRIGUES, U.; ASH, C.; AGUIRRE, M.; FARROW, J. A. E.; MARTINEZ-MURCIA, A.; PHILLIPS, B. A.; WILLIAMS, A. M.; WALLBANKS, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as

determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 5-12, 1991.

COULIBALY, I.; AMENAN, A. Y.; LOGNAY, G.; FAUCONNIER, M. L.; THONART, P. Survival of Freeze-dried *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum* Related to Their Cellular Fatty Acids Composition during Storage. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p. 70-84, 2009.

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 131-136, 2006.

CRISPIM, S. M.; NASCIMENTO, A. M. A.; COSTA, P. S.; MOREIRA, J. L. S.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; LIMA, F. L.; MOTA, V. T.; NARDI, R. M. D. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with *puba*, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 15-21, 2013.

DA SILVA, N.; TANIWAKI, M. H.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; NASCIMENTO, M. S.; GOMES, R. A. R. **Microbiological examination methods of food and water**: a laboratory manual. Boca Raton: CRC Press, 2012. 484 p.

DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. **Microbiology**, 152, p. 85-93, 2006.

DE PILLI, T.; DEROSI, A.; TALJA, R. A.; JOUPPILA, K.; SEVERINI, C. Study of starch-lipid complexes in model system and real food produced using extrusion-cooking technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 610-616, 2011.

DE VUYST, L.; CAMU, N.; DE WINTER, T.; VANDEMEULEBROECKE, K.; DE PERRE, V. V.; VANCANNEYT, M.; DE VOS, P.; CLEENWERCK, I. Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, p. 79-90, 2008.

DEMARIGNY, Y. Fermented food products made with vegetable materials from tropical and warm countries: microbial and technological considerations. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, p. 2469-2476, 2012.

DEMIATE, I. M.; KOTOVICZ, V. Cassava starch in the Brazilian food industry. **Ciência e Tecnologia de Alimentos (Campinas)**, v. 31, n. 2, p. 388-397, 2011.

DEVI, S. M.; SUBRAMANIAN, A.; HALAMI, P.M. Discrimination and divergence among *Lactobacillus plantarum*-group (LPG) isolates with reference to their probiotic functionalities from vegetable origin. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 39, p. 562-570, 2016.

DÍAZ, A.; DINI, C. A.; VIÑA, S. Z.; GARCÍA, M. A. Technological properties of sour cassava starches: Effect of fermentation and drying processes. **LWT - Food Science and Technology**, v. 93, p. 116-123, 2018a.

DÍAZ, A.; DINI, C.; VIÑA, S. Z.; GARCÍA, M. A. Fermentation and drying effects on bread-making potential of sour cassava and ahipa starches. **Food Research International**, (no prelo) 2018b.

DOLCI, P.; COCOLIN, L. Direct application of rep-PCR on type I sourdough matrix to monitor the dominance and persistence of a *Lactobacillus plantarum* starter throughout back-slopping. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 8, p. 1898-1901, 2017.

DOLLY, P.; ANISHAPARVIN, A.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, D. C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 568-574, 2011.

DOULGERAKI, A. I.; PRAMATEFTAKI, P.; ARGYRI, A. A.; NYCHAS, G. J. E.; TASSOU, C. C.; PANAGOUE, E. Z. Molecular characterization of lactic acid bacteria isolated from industrially fermented Greek table olives. **LWT – Food Science and Technology**, v. 50, p. 353-356, 2013.

EDWARD, V. A.; HUCH, M.; DORTU, C.; THONART, P.; EGOUNLETY, M.; VAN ZYL, P. J.; SINGH, S.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Biomass production and small-scale testing of freeze-dried lactic acid bacteria starter strains for cassava fermentations. **Food Control**, v. 22, p. 389-395, 2011.

EGOUNLETY, M.; ADJAKIDJE, A.; SEGBEDJI, C. M.; YAO, A. A.; DORTU, C.; KOSTINEK, M.; FRANZ, C. M. A. P.; THONART, P.; HOLZAPFEL, W. H.; MENGU, M. Towards the industrialization of traditional African fermented foods: a case study of fortified gari in Benin. **Actes de l'Atelier "Potentialités à la transformation du manioc en Afrique de l'Ouest"**, Abidjan, 2007.

EMBRAPA (Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária). **Mandioca e Fruticultura**. 2016. 5 p. Disponível em: < http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil /mandioca/b1_mandioca.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2018.

ESSID, I.; MEDINI, M.; HASSOUNA, M. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. **Meat Science**, v. 81, p. 203-208, 2009.

FANI, M. (Ed.) O polvilho azedo. **Aditivos & Ingredientes**, v. 72, p. 44-50, 2010.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **Food Outlook**: Biannual Report on Global Food Markets. Out. 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i6198e.pdf>>. Acesso em 16 ago. 2018.

FAOSTAT. **Statistic Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2016. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

FELIPE, F. I. Os desafios na cadeia produtiva da mandioca no Brasil. **CEPEA/ESALQ-USP (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada/Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo)**, Piracicaba, 12 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; MATHARA, J.M.; ABRIQUEL, H.; BENOMAR, N.; REID, G.; GALVEZ, A.; HOLZAPFEL, W.H. African fermented foods and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 84-96, 2014.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; ALMEIDA, E. G.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of *yakupa*, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30. p. 567-577, 2014.

FREIRE, A. I.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 76, p. 787-795, 2015.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SOUZA, P. N. C.; CARDOSO, M. G.; SCHWAN, R. F. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 248, p. 39-46, 2017.

GALANIS, A.; KOURKOUTAS, Y.; TASSOU, C. C.; CHORIANOPOULOS, N. Detection and Identification of Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains by Multiplex PCR Using RAPD-Derived Primers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 25141-25153, 2015.

GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 51-70, 2007.

GÄNZLE, M. G.; FOLLADOR, R. Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 340, p. 1-15, 2012.

GARCIA, M. C.; FRANCO, C. M. L.; SOARES JÚNIOR, M. S.; CALIARI, M. Structural characteristics and gelatinization properties of sour cassava starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, p. 919-926, 2016.

GARCÍA-CARPINTEIRO, E. G.; SÁNCHEZ-PALOMO, E.; GONZÁLEZ-VIÑAS, M. A. Aroma characterization of red wines from cv. Bobal grape variety grown in La Mancha region. **Food Research International**, v. 44, p. 61-70, 2011.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 205, p.31-36, 2001.

GUYOT, J. P.; BRIZUELA, M. A.; SANOJA, R. R.; MORLON-GUYOT, J. Characterization and differentiation of *Lactobacillus manihotivorans* strains isolated from cassava sour starch. **Journal of Food Microbiology**, v. 87, p. 187-192, 2003.

HAMEED, I. H.; ATAMEME, H. J.; MOHAMMED, G. J. Evaluation of Antifungal and Antibacterial Activity and Analysis of Bioactive Phytochemical Compounds of *Cinnamomum zeylanicum* (Cinnamon bark) using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 1769-1788, 2016.

HATTINGH, M.; ALEXANDER, A.; MEIJERING, I.; VAN REENAN, C. A.; DICKS, L. M. T. Amylolytic strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from barley. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 4, p. 310-318, 2015.

HOFFMAN, C. S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. **Gene**, v. 57, p. 267-272, 1987.

HOLZAPFEL, W. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, p. 197-212, 2002.

HOUNGBÉDJI, M.; JOHANSEN, P.; PADONOU, S. W.; AKISSOÉ, N.; ARNEBORG, N.; NIELSEN, D. S.; HOUNHOUIGAN, D. J.; JESPERSEN, L. Occurrence of lactic acid bacteria and yeasts at species and strain level during spontaneous fermentation of mawè, a cereal dough produced in West Africa. **Food Microbiology**, v. 76, p. 267-278, 2018.

HUCH (*née* KOSTINEK), M.; HANAK, A.; SPECHT, I.; DORTU, C. M.; THONART, P.; MBUGA, S.; HOLZAPFEL, W. H.; HERTEL, C.; FRANZ, C. M. A. P. Use of *Lactobacillus* strains to start cassava fermentations for Gari production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, p. 258-267, 2008.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Indicadores IBGE**: Pesquisa mensal da previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil: Estatística da Produção

agrícola. p. 1-77, 2018. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201801.pdf>. Acesso em: 14 set. 2018.

KAWAHATA, M.; MASAKI, K.; FUJII, T.; IEFUJI, H. Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 6, p. 924-936, 2006.

KIMARYO, V. M.; MASSAWE, G. A.; OLASUPO, N. A.; HOLZAPFEL, W. H. The use of starter culture in the fermentation of cassava for the production of “Kivunde”, a traditional Tanzanian food product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 179-190, 2000.

KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V. A.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, p. 342–351, 2007.

KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V. A.; SCHILLINGER, U.; HERTEL, C.; HOLZAPFEL, W. H.; FRANZ, C. M. A. P. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 28, p. 527-540, 2005.

LACERDA, I. C. A.; GOMES, F. C. O.; BORELLI, B. M.; FARIA JR., C. L. L.; FRANCO, G. R.; MOURÃO, M. M.; MORAIS, P. B.; ROSA, C. A. Identification of the bacterial community responsible for traditional fermentation during sour cassava starch, cachaça and minas cheese production using culture-independent 16S rRNA gene sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 650-657, 2011.

LACERDA, I. C. A.; MIRANDA, R. L.; BORELLI, B. M.; NUNES, A. C.; NARDI, R. M. D.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 213-219, 2005.

LACERDA, Inayara Cristina Alves **Caracterização fisiológica e molecular das bactérias lácticas e leveduras na produção de polvilho azedo e utilização de culturas iniciadoras para processo fermentativo**. 2006. 150 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

LACERDA, Inayara Cristina Alves. **Microbiota envolvida na fermentação da mandioca para a produção de polvilho azedo, na região de Conceição dos Ouros - MG**. 2002.

65 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.) **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LASEKAN, O.; ABBAS, K. Analysis of volatile flavour compounds and acrylamide in roasted Malaysian tropical almond (*Terminalia catappa*) nuts using supercritical fluid extraction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2212-2216, 2010.

LEI, V.; AMOA-AWUA, W. K. A.; BRIMER, L. Degradation of cyanogenic glycosides by *Lactobacillus plantarum* strains from spontaneous cassava fermentation and other microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 169-184, 1999.

LIECKFELDT, E.; MEYER, W.; BÖNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. **Journal of Basic Microbiology**, v. 33, p. 413-426, 1993.

LIU, S. Q.; HOLLAND, R.; CROW, V. L. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: A review. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 11, p. 923-945, 2004.

LÜCKE, F. K. Utilization of microbes to process and preserve meat. **Meat Science**, v. 56, p. 105-115, 2000.

LV, X.; MIAO, L.; MA, H.; BAI, F.; LIN, Y.; SUN, M.; LI, J. Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 695-703, 2018.

MACLEOD, A. J.; MACLEOD, G.; SUBRAMANIAN, G. Volatile aroma constituents of orange. **Phytochemistry**, v. 27, n. 7, p. 2185-2188, 1988.

MADHUMITHA, G.; RAJAKUMAR, G.; ROOPAN, S. M.; RAHUMAN, A. A.; PRYIA, K. M.; SARAL, A. M.; KHAN, F. R. N.; KHANNA, V. G.; VELAYUTHAM, K.; JAYASEELAN, C.; KAMARAJ, C.; ELANGO, G. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, v. 111, p. 2189-2199, 2012.

MAEDA, K. C.; CEREDA, M. P. Avaliação de duas metodologias de expansão ao forno do polvilho azedo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 139-143, 2001.

MANTE, E. S.; SAKYI-DAWSONA, E.; AMOA-AWUA, W. K. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with

particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 41-50, 2003.

MARCON, M. J. A.; KURTZ, D. J.; RAGUZZONI, J. C.; DELGADILLO, I.; MARASCHIN, M.; SOLDI, V.; REGINATTO, V.; AMANTE, E. R. Expansion Properties of Sour Cassava Starch (Polvilho Azedo): Variables Related to its Practical Application in Bakery. **Starch**, v. 61, n. 12, p. 716-726, 2009.

MENEZES, A. G. T.; RAMOS, C. L.; DIAS, D. R.; SCWAN, R. F. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. **Food Research International**, v. 111, p. 187-197, 2018.

MEROTH, C. B.; WALTER, J.; HERTEL, C.; BRANDT, M. J.; HAMMES, W. P. Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 475-482, 2003.

MIDURA, T. F.; BRYANT, R. G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparations for analysis. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association (APHA), p. 13-23, 2001.

MOHAMMED, M., ABD EL-AZIZ, H., OMRAN, N., ANWAR, S., AWAD, S., EL-SODA, M. Rep-PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, v.128, p.417-423, 2009.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Processing techniques to reduce toxicity and antinutrients of cassava for use as a staple food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 17-27, 2009.

MONTGOMERY, D. C. **Introdução ao controle estatístico da qualidade**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2016. 528 p.

MOORTHY, S. N.; MATHEW, G. Cassava fermentation and associated changes in physicochemical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 2, p. 73-121, 1998.

MORAIS, M. F. **Inibição de *Listeria monocytogenes* em salsicha por *Leuconostoc mesenteroides* isolada de grãos de kefir**. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

MUGULA, J. K.; NARVHUS, J. A.; SØRHAUG, T. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of *togwa*, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 307-318, 2003.

NARDI, R. M. D.; SANTORO, M. M.; OLIVEIRA, J. S.; PIMENTA, A. M.; FERRAZ, V. P., BENCHETRIT, L. C.; NICOLI, J. R. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 649-656, 2005.

NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 171-177, 2001.

NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Alcoholic fermentation of beet molasses: effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 125-128, 1989.

NGANG, J. J. E.; LETOURNEAU, F.; WOLNIEWICZ, E.; VILLA, P. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 490-493, 1990.

NGANG, J. J. E.; WOLNIEWICZ, E.; LETOURNEAU, F.; VILLA, P. Stimulation of lactobacilli during alcoholic fermentation: action of sucrose hydrolysis by yeast. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 8, p. 741-746, 1992.

NORRIS, J. R. , BERKELEY, R. C. W., LOGAN, N. A., O'DONNELL, A. G. The genus *Bacillus* and *Sporolactobacillus*. In: STARR, M. P., STOLP, H., TRUPER, H. G., BALOWS, A., SCHLEGEL, H. G. (Ed.). **The prokaryotes**: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. New York: Springer, 1981. v. 2, p. 1711-1742.

NOUT, M. J. R. Fermented foods and food safety. **Food Research International**, v. 27, p. 291-298, 1994.

NOUT, M. J. R., Ecology of accelerated natural lactic fermentation of infant food on some pathogenic organisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 217-224, 1991.

NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO (NEPA). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO). 4. ed. rev. e ampl. Campinas: NEPA-UNICAMP; 2011.

OBADINA, A. O.; OYEWOLE, O. B., SANNI, L. O.; TOMLINS, K. I. Bio-preservative activities of *Lactobacillus plantarum* strains in fermenting Cassava 'fufu'. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 8, p. 620-623, 2006.

OBILIE, E. M.; TANO-DEBRAH, K.; AMOA-AWUAB, W. K. Microbial modification of the texture of grated cassava during fermentation into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 275-280, 2003.

OBILIE, E.; TANO-DEBRAHA, K.; AMOA-AWUA, W. K. Souring and breakdown of cyanogenic glucosides during the processing of cassava into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 115-121, 2004.

OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale *gari* production in Nigeria. **Food Control**, v. 19, p. 465-469, 2008.

OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in *gari* production. **Food Control**, v. 21, p. 306-312, 2010.

OGUNTOYINBO, F.A. Culture-independent analysis for determination of yeast diversity during solid substrate fermentation of grated cassava for *gari* production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2461-2465, 2011.

OMAR, N. B.; AMPE, F.; RAIMBAULT, M.; GUYOT, J.-P.; TAILLIEZ, P. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 285-291, 2000.

OMEMU, A. M; OYEWOLE, O. B.; BANKOLE, M. O. Significance of yeasts in the fermentation of maize for *ogi* production. **Food Microbiology**, v. 24, p. 571-576, 2007.

OYEWOLE, O. B. Characteristics and significance of yeasts' involvement in cassava fermentation for "fufu" production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 213-218, 2001.

PADONOU, S. W.; NIELSEN, D. S.; AKISSOE, N. H.; HOUNHOUIGAN, J. D.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. Development of starter culture for improved processing of Lafun, an African fermented cassava food product. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 1402-1410, 2010.

PADONOU, S. W.; NIELSEN, D. S.; HOUNHOUIGAN, J. D.; THORSEN, L.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 22-30, 2009.

PANDEY, A.; NAIK, M. M.; DUBEY, S. K. Metabólito antibacteriano produzido por *Acinetobacter* sp. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 70, p. 135-141, 2011.

PENIDO, F. C. L.; PILÓ, F. B.; SANDES, S. H. C.; NUNES, A. C.; COLEN, G.; OLIVEIRA, E. S.; ROSA, C. A.; LACERDA, I. C. A. Selection of starter cultures for the production of

sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 823-831, 2018.

PENIDO, Fernanda Corrêa Leal. **Isolamento e identificação molecular da microbiota predominante na fermentação natural de mandioca: seleção de culturas iniciadoras para produção de polvilho azedo em escala piloto**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PINO, J.; SAURI-DUCH, E.; MARBOT, R. Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages. **Food Chemistry**, v. 94, p. 394-398, 2006.

QUEROL, A.; BARRIO, E. A rapid and simple method for the preparation of yeast mitochondrial DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 1657, 1990.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMON, D. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, p. 439-446, 1992.

RAHMAWATI, F.; DEWANTI-HARIYADI, R.; HARIYADI, P.; FARDIAZ, D.; RICHANA, N. Isolation and identification of microorganisms during spontaneous fermentation of maize. **Jurnal Teknologi dan Industri Panga**, v. 24, n. 1, p. 33-39, 2013.

RAMOS, C. L.; SOUSA, E. S. O.; RIBEIRO, J.; ALMEIDA, T. M. M.; SANTOS, C. C. A. A.; ABEGG, M. A.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical characteristics of *tarubá*, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 182-188, 2015.

RANDAZZO, C. L.; TODARO, A.; PINO, A.; CORONA, A.; MAZZAGLIA, A. CAGGIA, C. Giarrappa and Grossa di Spagna naturally fermented table olives: Effect of starter and probiotic cultures on chemical, microbiological and sensory traits. **Food Research International**, v. 62, p. 1154-1164, 2014.

REDDY, G.; ALTAF, M.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, E. V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 22-34, 2008.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Análises Estatísticas no Excel: guia prático**. Viçosa: UFV, 2004. 251 p.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; CORTES-RODRIGUEZ, M.; MANJAREES-PINZON, K. Effect of hydrocolloids on the pasting profiles of tapioca starch mixtures and the baking properties of gluten-free cheese bread. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, p. 1672-1681, 2015.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E.; FRANCO, C. M. L.; MANJAREES-PINZON, K. Effect of fructooligosaccharides on the physicochemical properties of sour cassava starch and baking quality of gluten-free cheese bread. **Starch/Stärke**, v. 66, p. 678-684, 2014.

ROSALES-SOTO, M.U.; GRAY, P. M.; FELLMAN, J. K.; MATTINSON, D. S.; ÜNLÜ, G.; HUBER, K.; POWERS, J. R. Microbiological and physico-chemical analysis of fermented protein-fortified cassava (*Manihot esculenta* Crantz) flour. **LWT – Food Science and Technology**, v. 66, p. 355-360, 2016.

SAÏDANA, D.; MAHJOUB, M. A.; BOUSSAADA, O.; CHRIAA, J.; CHÉRAIF, I.; DAAMI, M.; MIGHRI, Z.; HELAL, A. N. Chemical composition and antimicrobial activity of volatile compounds of *Tamarix boveana* (Tamaricaceae). **Microbiological Research**, v. 163, p. 445-455, 2008.

SANDE, D.; COLEN, G.; DOS SANTOS, G. F.; FERRAZ, V. P.; TAKAHASHI, J. A. Production of omega 3, 6, and 9 fatty acids from hydrolysis of vegetable oils and animal fat with *Colletotrichum gloeosporioides* lipase. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n.2, p. 537-545, 2018.

SANNI, A. I.; MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J. P. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 53-62, 2002.

SANTOS, C. C. A. A.; ALMEIDA, E. G.; MELO, G. V. P.; SCHWAN, R. F. Microbiological and physicochemical characterisation of *caxiri*, an alcoholic beverage produced by the indigenous *Juruna* people of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 112-121, 2012.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 7, p. 966-972, 2007.

SETTANNI, L.; SINDEREN, D. V.; ROSSI, J.; CORSETTI, A. Rapid Differentiation and In Situ Detection of 16 Sourdough *Lactobacillus* Species by Multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.6, p. 3049-3059, 2005.

SILVA, H. A.; MURRIETA, R. S. S. Mandioca, a rainha do Brasil? Ascensão e queda da *Manihot esculenta* em São Paulo. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Humanas**, Belém, v. 9, n. 1, p. 37-60, jan.-abr. 2014.

SILVA-FILHO, E. A. da; SANTOS, S. K. B. dos; RESENDE, A. do M.; MORAIS, J. O. F. de; MORAIS JUNIOR, M. A.; SIMÕES, D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 88, p. 13-23, 2005.

SINGH, S.; GOSWAMI, P.; SINGH, R.; HELLER, K. J. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 448-457, 2009

SONALE, R. S.; RAMALAKSHMI, K.; SANKAR, K. U. Characterization of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed volatile compounds obtained by supercritical carbon dioxide process. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 4, p. 1444-1454, 2018.

SUN, J.; CHANG, R.; ZHANG, H. A new cerebrogalactoside from *Juglans mandshurica*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, n.2, p. 254-256, 2011.

SUUTARI, M.; LAAKSO, S. Temperature adaptation in *Lactobacillus fermentum*: interconversions of oleic, vaccenic and dihydrosterulic acids. **Journal of General Microbiology**, v. 138, p. 445-450, 1992.

SWIEGERS, J. H.; BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A.; PRETORIUS, I. S. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 11, p. 139-173, 2005.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S. de; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Microrganismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 43-49, 2007.

THOMAS, K. C.; HYNES, S. H.; INGLEDEW, W. M. Influence of m medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1616-1623, 2002.

TODOROV, S. D.; FRANCO, B. G. M. *Lactobacillus plantarum*: Characterization of the species and application in food production. **Food Review International**, v. 26, p. 205-229, 2010.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231-1249, 2014.

TORRIANI, G.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 3450-3454, 2001.

UYOH, E. A.; NTUI, V. O.; UDOMA, N. N. Effect of local cassava fermentation methods on some physiochemical and sensory properties of fufu. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 8, p. 1123-1125, 2009.

VANAJA, G.; GOTCHEVA, V.; ANGELOV, A.; AGRAWAL, R. Formation of volatiles and fattyacids of therapeutic importance in the probiotic *Lactobacillus plantarum* LPcfr adapted to resist GIT conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n.1, p. 110-113, 2011.

VARSHA, K. K.; DEVENDRA, L.; SHILPA, G.; PRIYA, S.; PANDEY, A.; NAMPOOTHIRI, K. M. 2,4-Di-*tert*-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. **International Journal of Food Microbiology**, v. 211, p. 44-50, 2015.

VATANASUCHART, N.; NAIVIKUL, O.; CHAROENREIN, S., SRIROTH, K. Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, p. 80-87, 2005.

VENTIMIGLIA, G; ALFONZO, A. GALUZZO, P.; CORONA, O.; FRANCESXA, N.; CARACAPPA, S.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Codominance of *Lactobacillus plantarum* and obligate heterofermentative lactic acid bacteria during sourdough fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 57-68, 2015.

VOGELMANN, S. A.; SEITTER, M.; SINGER, U.; BRANDT, M. J.; HERTEL, C. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 205-212, 2009.

WILLIAMS, A. A.; TUCKNOTT, O. G. The volatile aroma components of fermented ciders: minor neutral components form fermentation of Sweet Copin apple juice. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, p. 381-397, 1978.

YAO, A. A.; DORTU, C.; EGOUNLETY, M.; PINTO, C.; EDWARD, V. A.; HUCH, M.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W.; MBUGUA, S.; MENGU, M.; THONART, P. Production of freeze-dried lactic acid bacteria starter culture for cassava fermentation into *gari*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 4996-5004, 2009.

ZANIRATI, Débora Ferreira. **Caracterização de bactérias lácticas da microbiota de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo**. 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 456-480, 2015.

APÊNDICE A

Tabela A – Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos isolados de *Lactobacillus plantarum* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* pelo método *spot-on-lawn*

Isolados de <i>L. plantarum</i>	Halos de inibição (mm)		
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<i>Lp1</i>	2,77 ± 4,79 ^{ab,z}	21,53 ± 1,77 ^{cd,y}	47,08 ± 2,39 ^{abc,x}
<i>Lp2</i>	10,40 ± 3,29 ^{a,z}	24,53 ± 1,31 ^{abcd,y}	42,17 ± 4,79 ^{bc,x}
<i>Lp3</i>	6,80 ± 5,16 ^{ab,z}	28,97 ± 8,20 ^{abc,y}	38,32 ± 4,59 ^{c,x}
<i>Lp4</i>	6,10 ± 0,95 ^{ab,z}	28,00 ± 7,19 ^{abcd,y}	50,02 ± 2,54 ^{ab,x}
<i>Lp5</i>	7,70 ± 2,65 ^{ab,z}	31,93 ± 6,03 ^{a,y}	41,43 ± 1,69 ^{bc,x}
<i>Lp6</i>	7,08 ± 3,74 ^{ab,z}	31,30 ± 11,21 ^{ab,y}	40,33 ± 0,97 ^{c,x}
<i>Lp7</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	25,13 ± 4,20 ^{abcd,y}	45,38 ± 11,42 ^{abc,x}
<i>Lp8</i>	4,70 ± 0,95 ^{ab,z}	20,63 ± 1,67 ^{cd,y}	49,77 ± 6,38 ^{ab,x}
<i>Lp9</i>	0,72 ± 1,24 ^{b,z}	22,57 ± 3,91 ^{bcd,y}	52,27 ± 1,54 ^{a,x}
<i>Lp10</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	19,65 ± 3,88 ^{cd,y}	31,97 ± 6,03 ^{d,x}
<i>Lp11</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	28,20 ± 4,88 ^{abcd,y}	45,00 ± 4,81 ^{abc,x}

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c, d em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes (p < 0,05) pelo Teste de Duncan.

APÊNDICE B

Tabela B – Diâmetro dos halos de inibição (mm) dos isolados de *Lactobacillus brevis* contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium* pelo método *spot-on-lawn*

Isolados de <i>L. brevis</i>	Halos de inibição (mm)		
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
<i>Lb1</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	26,63 ± 5,83 ^{b,x}	23,22 ± 5,23 ^{cde,x}
<i>Lb2</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	12,28 ± 2,20 ^{de,y}	32,07 ± 1,31 ^{abcd,x}
<i>Lb3</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	15,68 ± 5,89 ^{cde,y}	33,40 ± 9,15 ^{abc,x}
<i>Lb4</i>	14,02 ± 2,57 ^{a,y}	40,92 ± 4,49 ^{a,x}	35,47 ± 2,24 ^{ab,x}
<i>Lb5</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	41,82 ± 10,71 ^{a,x}	35,45 ± 2,43 ^{ab,x}
<i>Lb6</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	22,93 ± 15,05 ^{bc,x}	20,18 ± 9,85 ^{e,x}
<i>Lb7</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	17,38 ± 9,45 ^{bcd,x}	26,53 ± 13,49 ^{bcde,x}
<i>Lb8</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	0,00 ± 0,00 ^{f,y}	21,03 ± 2,90 ^{e,x}
<i>Lb9</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	6,45 ± 5,59 ^{ef,y}	22,08 ± 3,16 ^{de,x}
<i>Lb10</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,y}	24,23 ± 4,84 ^{bc,x}	30,22 ± 2,63 ^{abcde,x}
<i>Lb11</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	9,60 ± 9,70 ^{def,y}	21,30 ± 7,69 ^{e,x}
<i>Lb12</i>	0,00 ± 0,00 ^{b,z}	17,78 ± 2,86 ^{bcd,y}	38,80 ± 3,77 ^{a,x}

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c, d, e, f em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

APÊNDICE C

Tabela C – Acompanhamento da acidez total titulável durante a fermentação em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas

Cultura iniciadora	ATT (%)			
	0	7 dias	14 dias	21 dias
A	0,63 ± 0,06 ^{a,z}	1,58 ± 0,29 ^{a,y}	1,80 ± 0,21 ^{ab,y}	2,37 ± 0,44 ^{a,x}
B	0,67 ± 0,17 ^{a,z}	1,50 ± 0,41 ^{a,y}	1,86 ± 0,46 ^{a,xy}	2,30 ± 0,30 ^{a,x}
C	0,29 ± 0,09 ^{a,x}	0,69 ± 0,20 ^{b,x}	0,59 ± 0,24 ^{c,x}	0,95 ± 0,51 ^{b,x}
D	0,33 ± 0,10 ^{a,y}	0,86 ± 0,65 ^{b,xy}	1,26 ± 0,90 ^{b,x}	1,42 ± 1,05 ^{b,x}

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b, c em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan. Tratamentos: A: *L. plantarum*; B: *L. plantarum* + *P. scutulata*; C: *L. plantarum* + Fermento comercial; D: Fermento comercial.

APÊNDICE D

Tabela D – Acompanhamento do potencial hidrogeniônico durante a fermentação em escala piloto com as culturas iniciadoras selecionadas

Cultura iniciadora	pH			
	0	7 dias	14 dias	21 dias
A	3,49 ± 0,03 ^{b,x}	3,10 ± 0,07 ^{b,xy}	2,93 ± 0,10 ^{b,y}	2,78 ± 0,13 ^{b,y}
B	3,47 ± 0,04 ^{b,x}	3,09 ± 0,05 ^{b,xy}	2,95 ± 0,14 ^{b,y}	2,83 ± 0,17 ^{b,y}
C	4,28 ± 0,08 ^{a,x}	3,85 ± 0,37 ^{a,y}	3,75 ± 0,29 ^{a,yz}	3,40 ± 0,35 ^{a,z}
D	4,39 ± 0,08 ^{a,x}	3,79 ± 0,50 ^{a,y}	3,48 ± 0,48 ^{a,y}	3,43 ± 0,62 ^{a,y}

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan. Tratamentos: A: *L. plantarum*; B: *L. plantarum* + *P. scutulata*; C: *L. plantarum* + Fermento comercial; D: Fermento comercial.

APÊNDICE E

Tabela E – Acompanhamento da contagem dos micro-organismos utilizados como culturas iniciadoras durante a fermentação em escala piloto

Código	Cultura iniciadora	Contagem (\log_{10} UFC/g)			
		0	7 dias	14 dias	21 dias
A	<i>L. plantarum</i>	7,42 ± 0,21 ^{a,x}	7,75 ± 0,15 ^{a,x}	7,47 ± 0,61 ^{a,x}	7,45 ± 0,45 ^{a,x}
B	<i>L. plantarum</i>	7,56 ± 0,21 ^{a,x}	8,00 ± 0,44 ^{a,x}	7,65 ± 0,61 ^{a,x}	7,77 ± 0,53 ^{a,x}
	<i>P. scutulata</i>	4,93 ± 0,26 ^{b,x}	3,10 ± 2,12 ^{b,y}	1,59 ± 1,91 ^{c,yz}	0,88 ± 1,76 ^{c,z}
C	<i>L. plantarum</i>	6,73 ± 0,37 ^{a,x}	7,34 ± 0,62 ^{a,x}	7,26 ± 0,85 ^{a,x}	7,16 ± 0,63 ^{a,x}
	Fermento comercial	6,00 ± 0,13 ^{ab,x}	6,07 ± 0,91 ^{a,x}	2,33 ± 2,70 ^{c,y}	3,17 ± 2,17 ^{b,y}
D	Fermento comercial	6,01 ± 0,93 ^{ab,x}	6,05 ± 0,75 ^{a,x}	5,37 ± 0,96 ^{b,xy}	4,29 ± 0,87 ^{b,y}

Valores médios ± desvio-padrão seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b em uma mesma coluna e x, y, z em uma mesma linha) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

APÊNDICE F

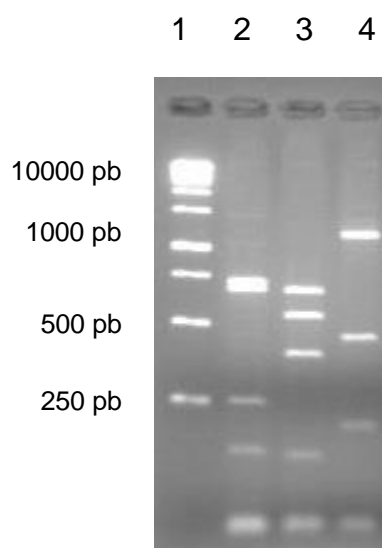
Tabela F – Acidez total titulável (ATT) e índice de expansão para os polvilhos obtidos em escala piloto

Cultura iniciadora	Código	ATT (%)	Índice de expansão
<i>L. plantarum</i>	A	3,02 ± 0,21 ^a	1,21 ± 0,14 ^a
<i>L. plantarum</i> + <i>P. scutulata</i>	B	3,06 ± 0,44 ^a	1,18 ± 0,07 ^a
<i>L. plantarum</i> + Fermento comercial	C	1,91 ± 0,45 ^b	1,19 ± 0,14 ^a
Fermento comercial	D	1,61 ± 0,69 ^b	1,18 ± 0,13 ^a

Valores médios ± desvio-padrão na mesma coluna seguidos por diferentes letras sobrescritas (a, b) são significativamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste de Duncan.

ANEXO A

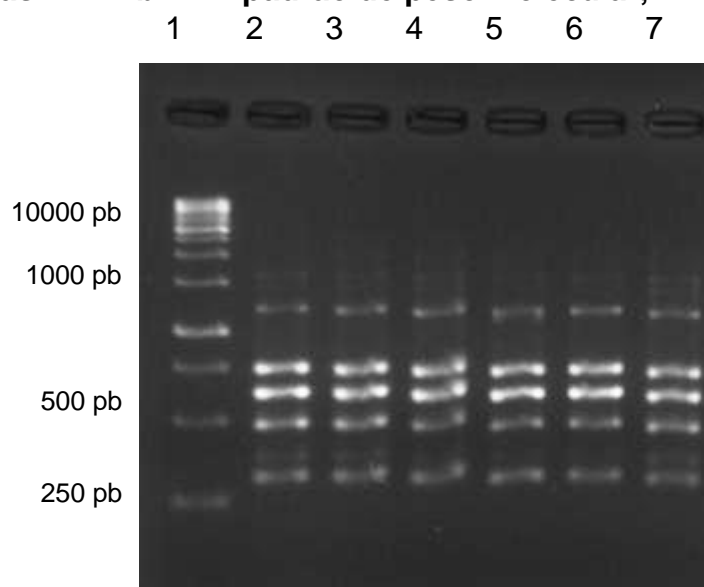
Figura A – Perfil de digestão de BAL isolada da fermentação. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: *Lactobacillus plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*)



Fonte: adaptado de PENIDO, 2013, p. 81.

ANEXO B

**Figura B – Perfis de PCR *fingerprinting* de leveduras isoladas da fermentação.
Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-7: *Pichia scutulata***



Fonte: PENIDO, 2013, p. 82.