

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

RENATA GOMES CAETANO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E  
LEVEDURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO FERMENTATIVO DA MANDIOCA  
PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI E AVALIAÇÃO HIGIÊNICO SANITÁRIA**

Belo Horizonte, 2018

RENATA GOMES CAETANO

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E LEVEDURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO FERMENTATIVO DA MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI E AVALIAÇÃO HIGIÊNICO SANITÁRIA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Orientadora: Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Co-orientadora: Dra. Regina Maria Nardi Drummond

Colaborador: Dr. Carlos Augusto Rosa

Belo Horizonte, 2018

C128i 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 / Renata Gomes Caetano. – 2018. 83 f. : il.

Orientadora: Inayara Cristina Alves Lacerda.  
Coorientadora: Regina Maria Nardi Drummond.  
Colaborador: Carlos Augusto Rosa.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Mandioca – Teses. 2. Fermentação – Teses. 3. Levedura – Teses. 4. Bactérias – Teses. 5. Microbiota – Teses. 6. Tecnologia de alimentos – Teses. I. Lacerda, Inayara Cristina Alves. II. Drummond, Regina Maria Nardi. III. Rosa, Carlos Augusto. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD: 664.23

Renata Gomes Caetano

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E LEVEDURAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO FERMENTATIVO DA MANDIOCA PARA PRODUÇÃO DE TUCUPI E AVALIAÇÃO HIGIÊNICO SANITÁRIA**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Ciências de Alimentos.

Aprovado em / 2018

BANCA EXAMINADORA

---

---

---

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade.

À Professora Doutora Inayara Cristina Alves Lacerda, pela orientação, dedicação, paciência, confiança durante a realização deste trabalho, pela amizade e carinho, pois não foi fácil.

À Professora Doutora Regina Maria Nardi, pela ideia do projeto, ensinamentos, colaboração e pela nossa aventura em Belém em busca das amostras de tucupi.

Ao Professor Doutor Carlos Augusto Rosa por todas as contribuições para a realização deste trabalho.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pelas disciplinas lecionadas contribuindo meu aprendizado.

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo.

As funcionárias Elaine e Ludmila pelas contribuições e amizade durante a execução do trabalho.

À amiga Fernanda Penido pela ajuda, paciência, companhia, conversas e desabafos, e principalmente pela grande contribuição na execução das práticas e elaboração da escrita desta dissertação.

À amiga Carmen, por repassar todos os seus conhecimentos para a execução deste trabalho.

Ao Agenor e sua esposa por abrir as portas de seu laboratório disponibilizando tempo, conhecimento e material. Muito obrigada!

À Ludmila Conon pelas coletas de tucupi, sei que não foi fácil (os lugares eram de difícil acesso), pela amizade, hospedagem e companhia. Muito obrigada!

Aos produtores de Tucupi em Belém pelas amostras cedidas.

À todos os alunos, ICs, professores e funcionários quem fazem parte do LAMIB e do departamento de Alimentos da FAFAR/UFMG.

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 mestrado.

*“Se o dinheiro for a sua esperança de independência, você jamais a terá. A única segurança verdadeira consiste numa reserva de sabedoria, de experiência e de competência.”*

Henry Ford

## RESUMO

A mandioca é um substrato para produção de vários alimentos fermentados que são consumidos no Brasil, Ásia e África. A mandioca destaca-se como importante produto da agricultura, pois constitui a base alimentar para famílias no norte e nordeste do Brasil. O tucupi, um molho fermentado e submetido à cocção, é obtido após a fermentação espontânea da manipueira, resíduo líquido oriundo da prensagem da massa ralada de mandioca. O tucupi é considerado um ingrediente muito apreciado e utilizado na culinária paraense e do norte do Maranhão. Estudos relativos à caracterização do perfil de qualidade e identidade do tucupi são escassos. Dentre as principais características deste produto destaca-se a cor amarela, o baixo valor de pH, a alta acidez total, o baixo teor proteico e de cianeto total e livre. O objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota presente no processo de fermentação de mandioca para a produção de tucupi. Para isto as amostras foram obtidas da produção de tucupi e do produto final foram submetidas a realização do isolamento de bactérias lácticas e leveduras em meios de cultura MRS e YM, respectivamente, e a identificação das espécies por técnicas moleculares, por Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP) para BAL e Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (PCR) *fingerprinting* GTG<sub>5</sub> para leveduras. Os isolados não identificados por estas técnicas moleculares citadas acima, foram submetidas ao sequenciamento da região 16S do gene rRNA para BAL e região D1/D2 da subunidade maior do gene rRNA para leveduras. Além disso, todas as amostras foram submetidas às análises físico-químicas e quanto às condições higiênico sanitárias. As bactérias lácticas e leveduras foram isoladas em todas as amostras com contagens variando de 1,80 a 7,25 log<sub>10</sub> UFC/mL e 2,15 a 8,11 log<sub>10</sub> UFC/mL, respectivamente. *Lactobacillus fermentum* foi a espécie mais isolada em amostras da produção de tucupi, em que foi possível acompanhar todo o processo, seguida por *L. plantarum*. Outras espécies foram encontradas em menor frequência, *L. acidophilus* e *L. parabuchneri*. *Candida ethanolica* e *Yarrowia lipolytica* foram as espécies de leveduras mais isoladas durante a produção de tucupi, seguidas pelas espécies de *Candia tropicalis*, *Pichia scutulata*, *Pichia exigua*, *Candida humilis* e *Wickerhamomuces anomalus*, que apareceram em menor frequência. Os valores de pH variaram entre 3,10 a 4,29, e acidez entre 0,2 g a 1,1 g de ácido láctico / 100 mL, classificando o tucupi como um alimento de baixo pH e alta acidez. As amostras de tucupi apresentaram contagens de coliformes totais nas amostras de massa de mandioca, no início da fermentação e no tucupi puro, e coliformes termotolerantes somente em duas amostras (início da fermentação e tucupi puro). As amostras foram negativas para *Salmonella* sp e insatisfatórias para a presença de *B. cereus sensu stricto* (*s. s.*), destacando



que os isolados de *B. cereus s. s.* foram avaliados quanto à detecção de genes produtores de toxinas e todos apresentaram um potencial toxigênico. Desta forma, sugere-se que a produção de tucupi deve ser realizada em melhores condições higiênico-sanitárias.

**Palavras-chave:** Mandioca. Tucupi. Fermentação. Bactérias. Leveduras.

## ABSTRACT

Cassava is a substrate to produce various fermented foods that are consumed in Brazil, Asia and Africa. Cassava stands out as an important agricultural product, since it constitutes the food base for families in the north and northeast of Brazil. The tucupi, a fermented sauce and subjected to cooking, is obtained after the spontaneous fermentation of the manipueira, a liquid residue from the pressing of the grated manioc mass. The tucupi is considered an ingredient very appreciated and used in the cuisine of Parana and northern Maranhão. Studies on the characterization profile of tucupi quality and identity are scarce. Among the main characteristics of this product are the yellow color, low pH value, high total acidity, low protein content and total and free cyanide. The objective of this study was to characterize the microbiota present in the cassava fermentation process to produce tucupi. For this, the samples were obtained from the production of tucupi and the final product were submitted to the isolation of lactic bacteria and yeasts in culture media MRS and YM, respectively, and the identification of the species by molecular techniques, by Fragment Length Polymorphism Restriction (RFLP) for BAL and GTG5 fingerprinting Restriction Fragment Length PCR (PCR) for yeasts. The isolates not identified by these molecular techniques mentioned above were submitted to sequencing the 16S region of the rRNA gene for BAL and D1 / D2 region of the major subunit of the rRNA gene for yeast. In addition, all samples were submitted to physical-chemical analysis and sanitary hygiene conditions. Lactic bacteria and yeasts were isolated in all samples with counts varying from 1.80 to 7.25 log<sub>10</sub> CFU / mL and 2.15 to 8.11 log<sub>10</sub> CFU / mL, respectively. *Lactobacillus fermentum* was the most isolated species in samples of tucupi production, in which it was possible to follow the whole process, followed by *L. plantarum*. Other species were found less frequently, *L. acidophilus* and *L. parabuchneri*. *Candida ethanolica* and *Yarrowia lipolytica* were the most isolated yeast species during tucupi production, followed by *Candida tropicalis*, *Pichia scutulata*, *Pichia exigua*, *Candida humilis* and *Wickerhamomyces anomalus*, which appeared less frequently. The pH values ranged from 3.10 to 4.29, and acidity from 0.2 g to 1.1 g lactic acid / 100 mL, classifying tucupi as a low pH and high acidity food. The tucupi samples showed total coliform counts in the samples of cassava mass, at the beginning of the fermentation and in the pure tucupi, and thermotolerant coliforms in only two samples (beginning of the fermentation and pure tucupi), were negative for *Salmonella* sp and unsatisfactory for the presence of *B. cereus* s. s., noting that the isolates of *B. cereus sensu stricto* were evaluated for the detection of toxin - producing genes and all

showed a toxigenic potential. Thus, it is suggested that the production of tucupi should be performed under better hygienic-sanitary conditions.

**Keywords:** Cassava. Tucupi. Fermentation. lactic acid bacteria Yeast.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Utilização industrial de fécula de mandioca .....	25
Figura 2: Fluxograma da produção de tiquira .....	29
Figura 3: Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de tucupi .....	36
Figura 4: Perfil de digestão de espécies de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados do tucupi .....	53
Figura 5: Perfil de digestão de espécies de <i>Lactobacillus</i> spp. isolados do tucupi .....	54
Figura 6: Perfil de PCR <i>fingerprinting</i> de leveduras isoladas da fermentação de mandioca para produção de tucupi em Belém (PA) .....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Contagens das bactérias lácticas e leveduras ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) em amostras obtidas do processo de produção de tucupi e produto final .....	52
Tabela 2: Contagens populacionais ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) das espécies de BAL isoladas durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi .....	55
Tabela 3: Contagens populacionais ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) das espécies de leveduras isoladas da fermentação de mandioca, para produção de tucupi .....	59
Tabela 4: Parâmetros físico-químicos das amostras do tucupi obtidas durante o processamento de tucupi e produto final .....	62
Tabela 5: Determinação de coliformes totais e coliforme termotolerantes na produção de tucupi .....	65
Tabela 6: Contagens ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) de <i>Bacillus cereus s.s</i> em amostras de tucupi em fermentação e produto final .....	66
Tabela 7: Resultados da reação de PCR para pesquisa de genes codificadores dos fatores de virulência nos isolados de <i>B. cereus s.s</i> .....	68

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3.1 Mandioca .....	19
3.2 Microbiota presente na fermentação da mandioca .....	20
3.2.1 Bactérias do ácido láctico .....	21
3.2.2 Leveduras.....	22
3.2.3 <i>Bacillus</i> spp.....	23
3.3 Produtos derivados da mandioca .....	24
3.3.1 Beiju.....	25
3.3.2 Cauim.....	25
3.3.3 Tiquira .....	26
3.3.4 Farinha d'água .....	29
3.3.5 Polvilho.....	31
3.3.6 Fufu, Gari e Lafun .....	33
3.3.7 Tucupi.....	34
3.3.7.1 Processo de produção do tucupi .....	35
3.4 Análise higiênico-sanitárias de produtos obtidos pela fermentação de mandioca .....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Coleta das amostras .....	39
4.2 Processamento das amostras e análise microbiológica.....	41
4.3 Isolamento, quantificação e identificação dos micro-organismos.....	41
4.3.1 Bactérias do ácido láctico .....	41
4.3.2 Leveduras.....	41
4.4 Avaliação das condições higiênico-sanitárias .....	42
4.4.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	42
4.4.2 Coliformes totais e termotolerantes .....	42
4.4.3 <i>Salmonella</i> sp.....	43

4.5 Identificação molecular das bactérias do ácido láctico .....	44
4.5.1 Extração de DNA.....	44
4.5.2 Amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA .....	44
4.5.3 Agrupamento pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP .....	45
4.5.4 Amplificação da região 16S do gene do rRNA para a reação de sequenciamento .....	45
4.5.5 Purificação dos amplicons .....	45
4.5.6 Reação de sequenciamento .....	46
4.6 Isolamento e identificação molecular das leveduras .....	47
4.6.1 Isolamento das leveduras.....	47
4.6.2 Identificação molecular das leveduras.....	47
4.6.2.1 Extração de DNA.....	47
4.6.2.2 Agrupamentos por PCR <i>fingerprinting</i> .....	48
4.6.2.3 Amplificação do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA para reação de sequenciamento.....	48
4.6.2.4 Purificação dos amplicons .....	49
4.6.2.5 Reação de sequenciamento .....	49
4.7 Detecção dos genes codificadores das enterotoxinas e de fatores de virulência dos isolados de <i>B. cereus</i> .....	49
4.8 Análises físico-químicas.....	50
4.8.1 Determinação de pH .....	50
4.8.2 Determinação de acidez total titulável.....	50
4.8.3 Análise de umidade e sólidos totais.....	50
4.8.4 Análise de cinzas .....	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
5.1 Coleta e isolamento de micro-organismos.....	51
5.1.1 Isolamento e identificação molecular de bactérias lácticas durante a produção de Tucupi .....	53
5.1.2 Isolamento e identificação de leveduras .....	57
5.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos.....	62
5.3 Aspectos higiênico-sanitários .....	65
6 CONCLUSÕES .....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos fermentados são mundialmente de grande importância devido à melhora significativa do seu valor nutricional, propriedades organolépticas e aumento da vida de prateleira do produto quando comparada a matéria prima usada para o preparo dos alimentos. A mandioca é um substrato utilizado para vários alimentos fermentados que são consumidos no Brasil, Ásia e África. O processo de fermentação não somente aumenta a detoxificação desse alimento, mas também melhora sua qualidade e segurança higiênica (SANTOS, *et al.*, 2012).

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é o principal cultivo tradicional no sistema de agricultura no Brasil (SANTOS, *et al.*, 2012), pois constitui uma base alimentar para famílias no norte e nordeste do Brasil, onde vários indivíduos do meio rural vivem da produção e processamento da farinha (CHISTÉ; COHEN, 2011), mas também é utilizada como matéria prima para elaboração de diversos pratos típicos (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). A mandioca é um produto extensivamente utilizado para o consumo animal na forma de raspa, ou resíduos para a fabricação de ração (APLEVICZ, 2006) e para o consumo humano, como na produção de inúmeras receitas culinárias tradicionais, como por exemplo, tapiocas, bolos, mingaus, dentre outros ou produtos derivados como farinhas, féculas e polvilhos doce e azedo (SANTOS; SOUSA; SILVA, 2011).

Uma das formas de aproveitamento das raízes de mandioca é a produção de farinha. Durante o processo de fabricação da farinha de mandioca, as raízes trituradas são prensadas para a remoção de seu líquido, e a massa prensada segue para a torração, o resíduo líquido obtido é denominado de manipueira (CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016). O tucupi, um molho fermentado, é obtido após a fermentação espontânea da manipueira (CHISTÉ; COHEN, 2011). O processo de produção consiste em deixar a manipueira em repouso por um a três dias para a decantação do amido, que é posteriormente removido. Após esta etapa, é realizada a fervura do líquido fermentado ao qual são adicionados os condimentos (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016). O tucupi é considerado um ingrediente muito apreciado e utilizado na culinária paraense e do norte do Maranhão (CHISTÉ; COHEN, 2011; CAMPOS, CARVALHO; MATTIETTO, 2016).

Apesar do tucupi ser muito utilizado na culinária regional e de ser comercializado majoritariamente na região Norte do país, existem poucas informações científicas sobre a



composição e a dinâmica do processo fermentativo. Acredita-se que ocorra acetificação durante seu processamento, e que as bactérias produtoras de ácido lático e leveduras possivelmente participem do processo fermentativo. Não foi encontrado, na literatura consultada, pesquisas com ênfase na microbiota envolvida nas etapas de fermentação da manipueira e do produto final (tucupi).

A microbiota envolvida no processo fermentativo do tucupi é desconhecida. Uma das hipóteses sugere a acetificação durante o seu processamento, e que as bactérias produtoras de ácido lático e leveduras possivelmente participam do processo fermentativo. O tucupi é bastante valorizado, mas para que possa ser divulgado como forma de utilização da manipueira, na forma de tecnologia de baixo custo, é necessário que as bases dos processos de produção sejam estabelecidas (CASSONI, 2008). Portanto, por ser obtido de maneira artesanal, a falta de padronização e heterogeneidade do produto final, justifica a importância do estudo sobre o processo fermentativo de mandioca para a produção do tucupi.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Caracterizar a microbiota presente no processo de fermentação de mandioca para a produção de tucupi e amostras comerciais.

### **2.2 Objetivos específicos**

Quantificar e isolar, as populações de bactérias lácticas e leveduras presentes ao longo do processo de fermentação da mandioca para a produção de tucupi;

Identificar bactérias e leveduras presentes na produção de tucupi por técnicas moleculares;

Determinar a presença de coliformes totais, termotolerantes, *E. coli* e *Bacillus cereus* durante o processo de produção tucupi e produto final;

Pesquisar a presença de *Salmonella* spp. durante o processo de produção tucupi e produto final;

Determinar as características físico-químicas por meio das realizações das análises de pH, acidez titulável, sólidos totais, e cinzas totais do processo de tucupi e produto final.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) pertence à família Euphorbiaceae e ao gênero *Manihot* (BEZERRA, 2001), é de origem brasileira, da região amazônica sendo introduzida na África durante o século XVI e na Ásia no século XVIII (AVANCINI, 2007). Planta arbustiva, composta de uma parte aérea, que pode atingir de 1 a 5 metros de altura e uma parte subterrânea, que produz de 5 a 20 raízes tuberosas com aproximadamente 20 a 80 cm de comprimento e 5 a 10 cm de diâmetro, que consiste na parte comestível e armazena grande quantidade de amido (BEZERRA, 2001; AVANCINI, 2007; STARLING, 2010).

É uma importante fonte de alimento para uma faixa de 500 milhões a um bilhão de pessoas nos países tropicais, constituindo-se em um dos principais alimentos energéticos e entre as tuberosas, perde apenas para o arroz, o trigo e o milho (DI-TANNO, 2001; COELHO, 2008; FERRAREZZO, 2011). A mandioca é também conhecida como aipim, macaxeira ou mandioca de mesa no Brasil, tapioca nos países asiáticos, yuca nos países da América do Sul e como *manioc* em países de língua francesa na África (STARLING, 2010).

A parte mais utilizada da planta é a raiz tuberosa, rica em carboidratos e usada de diversas formas, desde a alimentação humana e de animais ou como matéria prima para diversas indústrias, sendo na indústria de alimentos utilizada para obtenção de importantes produtos como a farinha de mandioca, a fécula, o polvilho doce e o polvilho azedo (COELHO, 2008; STARLING, 2010; CORRÊA, 2010).

No norte do Brasil as folhas da mandioca são utilizadas para preparar a maniçoba, que é um dos pratos típicos da cozinha regional que melhor retrata a maneira indígena no preparo de seus pratos. Tradicionalmente as folhas de mandioca são moídas e cozidas por aproximadamente oito dias. No quarto dia de cozimento acrescentam-se artigos defumados como chouriço, toucinho, charque e outros. É servida com arroz branco cozido e encontrada nos melhores restaurantes e barracas de comidas típicas (CEREDA & VILPOUX, 2003).

A planta da mandioca classificada como dicotiledônea é composta de raízes tuberosas, caules e folhas. Possui uma fina camada externa de cor amarronzada, com espessura de poucas células

correspondendo a 3% da sua massa, seguida da entrecasca, o que contribui com 11 a 20% da sua massa. O parênquima (cilindro central) corresponde a 85% da sua massa, que é a parte comestível da mandioca. As cascas e entrecasas contêm a maior parte da proteína, matéria graxa, fibra e minerais (FERRAREZZO, 2011). As raízes possuem teores elevados de carboidratos, fibras dietéticas, sódio, magnésio, vitaminas B, D e E, e quantidades menores de proteínas, lipídios, ferro e vitamina A (D-TANNO, 2001; STARLING, 2010).

A mandioca é uma planta cianogênica, ou seja, que acumula dois glicosídeos cianogênicos, a linamarina e lotaustralina, dos quais o principal e de maior concentração na mandioca é a linamarina e está distribuída por toda a planta, inclusive na parte comestível das raízes (CASSONI, 2008; STARLING, 2010). Estes compostos secundários funcionam como um sistema de defesa contra predadores e doenças, pois liberam ácido cianídrico (HCN) (STARLING, 2010). O teor de cianeto total encontrado nas raízes de mandioca determina a sua nomenclatura e o tipo de mercado consumidor. A mandioca mansa ou doce possui baixo teor de linamarina com menos de 50 mg de HCN/kg de polpa crua. As chamadas de bravas, amargas ou tóxicas, são as que normalmente apresentam altas concentrações de linamarina (com mais de 100 mg HCN/kg de polpa crua) (STARLING, 2010). Esses valores não têm importância durante a produção de derivados de mandioca, como farinha e fécula, pois a linamarina é eliminada durante o processamento sob a ação da enzima linamarase presente nos tecidos da própria raiz, decompondo-a e não oferece riscos ao consumidor (CASSONI, 2008; COELHO, 2008).

### **3.2 Microbiota presente na fermentação da mandioca**

Uma grande variedade de bactérias e leveduras estão presentes na fermentação da mandioca que pode ocorrer em estado sólido ou submerso em água por diferentes períodos, como da noite para o dia, por semanas ou até meses, gerando diferentes produtos alimentícios e bebidas alcólicas (DI-TANNO, 2001; COELHO, 2008). As modificações diversas que acontecem na fécula de mandioca durante o processo de fermentação ocorrem devido à presença de uma variada microbiota originária da matéria-prima, água e meio ambiente, já que o único substrato empregado restringe-se a uma suspensão de amido granular em água (LACERDA, 2002; COELHO, 2008; PENIDO, 2013).

A fermentação natural é feita por uma microbiota mista, que aumenta a acidez titulável durante o processo o que resulta em uma população dominada pelas bactérias do ácido lático, sendo as principais responsáveis pelo processo fermentativo da mandioca. A acidez total expressa como ácido lático alcança valores de 0,40 - 0,53g %. O ácido lático constitui 60 % da acidez total, confirmando o papel das bactérias lácticas no durante o processo. O restante dos ácidos é constituído pelo ácido acético e uma mistura de ácido butírico e acético (LACERDA, 2002; COELHO, 2008). Segundo Cereda & Cataneo (1986 *apud* LACERDA, 2002, p. 9), uma fermentação que ocorre ao ar livre sem nenhum controle, tem influência da temperatura ambiente no processo. Nas regiões frias a fermentação é lenta e predomina a microbiota láctica, enquanto que nas regiões quentes, a fermentação é mais rápida e predomina a microbiota butírica.

É importante o estudo dos micro-organismos que estão presentes na fermentação da mandioca para contribuir com novos conhecimentos acerca das espécies que dominam o processo, além de proporcionar uma melhoria sanitária na qualidade do produto beneficiando o produtor e o consumidor (COELHO, 2008).

### **3.2.1 Bactérias do ácido lático**

As bactérias do ácido lático (BAL) compreendem um grupo de diversos micro-organismos amplamente distribuídos em diferentes ecossistemas, além de serem utilizadas em grande escala nos processos fermentativos para produção de alimentos (AVANCINI, 2007; HUERTAS, 2010).

De acordo com ORLA-JENSEN (1919 *apud* LACERDA, 2002, p. 11), as bactérias lácticas formam um grupo natural de organismos Gram-positivos, bastonentes, cocos e cocobacilos, não móveis, não formadores de esporos, fermentadores de carboidratos e álcoois, para formar principalmente ácido lático como maior produto final por meio da fermentação de carboidratos. São heterotróficas e têm necessidades nutricionais complexas, anaeróbias facultativas e catalase negativa (COELHO, 2008; HUERTAS, 2010; PENIDO, 2013). Na indústria de alimentos, as bactérias lácticas desempenham um papel importante nos processos de fermentação, não somente por sua habilidade de acidificar, mas também por preservar os alimentos, e também no desenvolvimento de textura, sabor, cheiro e aroma dos alimentos fermentados (HUERTAS, 2010).

As bactérias do ácido láctico, são agrupadas como homofermentativas ou heterofermentativas, com base no produto final da fermentação. A homofermentativa tem como principal produto de fermentação da glicose a produção de ácido láctico. A heterofermentativa além do ácido láctico da fermentação da glicose, produzem produtos como o dióxido de carbono, ácido acético e etanol. As homofermentativas lácticas incluem os gêneros de *Streptococcus* e *Pediococcus*, e as heterofermentativas incluem *Leuconostoc* e *Lactobacillus* (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As bactérias lácticas são utilizadas como culturas iniciadoras comerciais no processamento de produtos lácteos tais como, leites fermentados, iogurtes, queijos e manteigas. São importantes comercialmente também na fabricação de embutidos, salsichas, vinhos e cervejas (LACERDA, 2002; HUERTAS, 2010), preservando e proporcionando propriedades sensoriais e nutricionais aos produtos (HUERTAS, 2010).

### 3.2.2 Leveduras

As leveduras encontradas nas fermentações tradicionais dos produtos de mandioca, geralmente estão associadas às BAL, que predominam neste tipo de fermentação (PENIDO, 2013). Em muitos alimentos produzidos pela fermentação da mandioca, há relatos da possível associação entre bactérias lácticas e leveduras, pois as bactérias do ácido láctico produzem uma condição ácida que inibe o crescimento de alguns micro-organismos, mas favorece o crescimento de leveduras. No processo de fermentação submersa, somente as leveduras e bactérias do ácido láctico têm apresentado resistência às extremas condições de acidez que ocorrem sempre no final da fermentação (LACERDA, 2002).

Schwan *et al.* (2007) realizou um estudo com o objetivo de isolar e identificar as espécies de leveduras dominantes envolvidas na fermentação do cauim, produzida a partir de mandioca e arroz. Foram identificadas as seguintes espécies: *Candida tropicalis* (foi a levedura mais comum entre as espécies isoladas), representando 26 % do total de espécies de leveduras encontradas, seguidas por *Pichia guilliermondii* (22 %), *Candida intermedia* (17 %), *Trichosporon asahii* (11 %), *Saccharomyces cerevisiae* (11 %) e *Candida parapsilosis* (11 %).

Em um estudo realizado por Lacerda *et al.* (2005) foram encontradas as seguintes espécies de leveduras durante a fermentação de mandioca para a produção do polvilho azedo: *Candida rugosa*, *Candida humilis*, *Candida ethanolica*, *Candida tropicalis*, *Issatchenkia terricola*,

*Debaryomyces hansenii*, *Galactomyces geotrichum*, *Saccharomyces exiguus*, *Issatchenkia* sp. e *Rhodotorula mucilaginosa*.

Penido (2013), também encontrou leveduras na fermentação do polvilho azedo produzido em escala piloto e identificou as seguintes espécies: *Candida humilis*, *Candida ethanolica*, *Geotrichum fragans*, *Kazachstania exigua* e *Pichia scutulata*.

### 3.2.3 *Bacillus* spp.

As bactérias do gênero *Bacillus* são bastonetes que produzem esporos, sendo largamente encontradas na natureza, um saprófita comum em solos (LACERDA, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). *B. cereus*, uma bactéria Gram-positiva, móvel, aeróbica, mas pode crescer em condições de anaerobiose e é catalase-positivo. Possui a capacidade de produzir esporos, dando origem a célula vegetativa capaz de multiplicação e habilitada geneticamente a esporogênese (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Este patógeno tem importância sanitária durante a fermentação da mandioca (KRAMER & GILBERT, 1989 *apud* LACERDA, 2002, p. 17). Os alimentos mais frequentes relacionados com surtos são os produtos cozidos ou contendo ingredientes cozidos ricos em amido ou proteínas, como massas, arroz, sopas, vegetais, pudins, saladas de vegetais, carnes e brotos de sementes. A sua presença não implica necessariamente risco à saúde, a menos que a bactéria possa se multiplicar e atingir populações maiores do que  $10^3$  células viáveis por grama (SILVA *et al.*, 2010).

Almeida, Rachid e Schwan (2007), após analisarem a microbiota da bebida fermentada de mandioca cauíam encontraram as espécies de *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *B. cereus* e *B. circulans*, onde a espécie de *B. licheniformis* foi a espécie predominante durante a fermentação.

A contaminação dos alimentos pelo *B. cereus* está associada à ocorrência de duas síndromes relacionadas a ingestão de alimentos contaminados com cepas patogênicas produtoras de toxinas diarreicas e emética (PAIVA *et al.*, 2009). *Bacillus cereus* produz seis tipos de toxinas, uma toxina emética, quatro enterotoxinas e uma citotoxina (LOGAN & DEVOS; 2009). A enterotoxina Hemolisina BL (HBL) é hemolítica e é sugestiva de ser o primeiro fator de virulência relacionado em *Bacillus cereus* (PAIVA, *et al.*, 2009; LOGAN & DEVOS, 2009). A enterotoxina não hemolítica (*nhe*) é similar a HBL e apresenta os mesmos sintomas em pessoas infectadas (PAIVA *et al.*, 2009). Tais toxinas estão associados à síndrome diarreica sendo os

alimentos envolvidos os vegetais crus e cozidos, massas, leite, sorvetes, produtos cárneos, pescados, arroz, pudim, sopas, purê de batata, entre outros. A doença é caracterizada por um período de incubação de oito a dezesseis horas, sendo o mais comum entre seis a doze horas, apresentando como principais sintomas a diarreia intensa, dores abdominais, tenesmos retais e raramente náuseas e vômitos. A síndrome emética é mais grave e aguda, o período de incubação é curto (1 a 6 horas) (JAY, 2000; FRANCO & LANDGRAF, 2005), causando vômitos, náuseas e mal-estar geral, e em alguns casos pode provocar diarreia com duração de 6 a 24 horas (FRANCO & LANDGRAF, 2005). Está associada com pratos de arroz fritos ou cozidos, creme pasteurizado, espaguete, purê de batata e brotos de legumes (JAY, 2000).

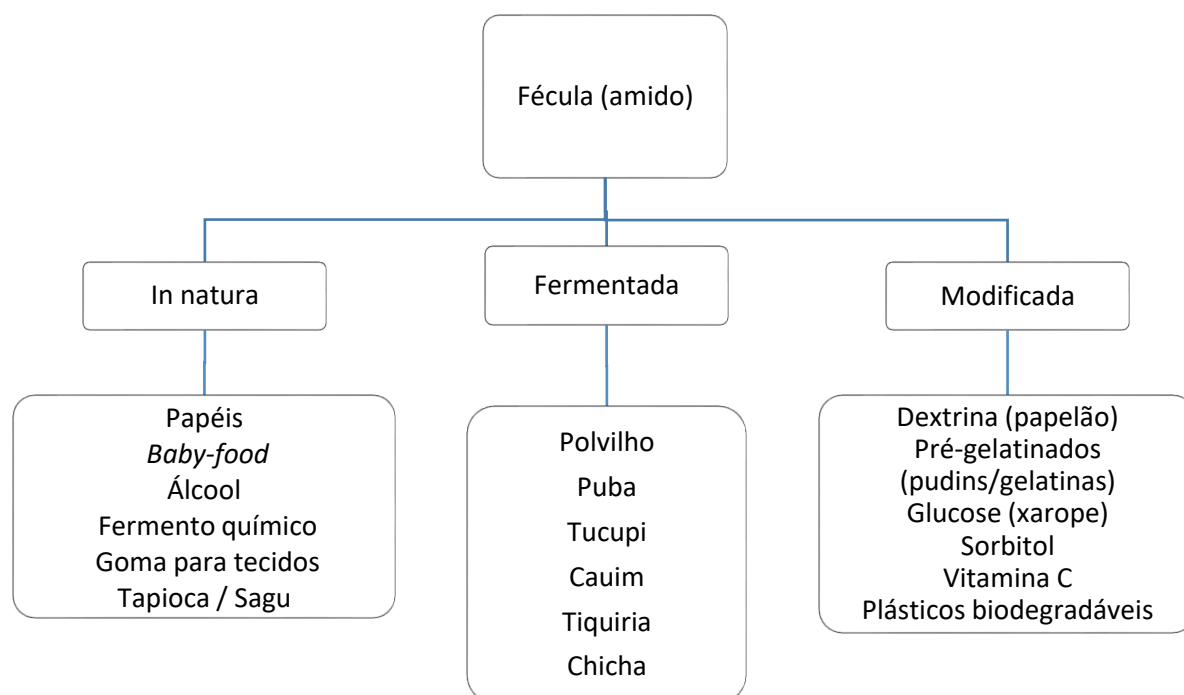
Chisté *et al.*, (2006) em um estudo com o objetivo de avaliar o padrão de qualidade das farinhas de mandioca do grupo seca, subgrupo fina, tipo 1, comercializadas nos principais supermercados e feiras da cidade de Belém, PA, encontraram em pequena quantidade ( $< 1 \times 10^1$  UFC/g) a espécie de *Bacillus cereus*, sendo essa contagem dentro do permitido pela Resolução RDC nº 12 de 2001 (ANVISA).

### 3.3 Produtos derivados da mandioca

As raízes de mandioca contêm elevados teores de amido, possuem alto teor de amilopectina, que é utilizado como matéria prima, fornecendo produtos e subprodutos de grande relevância nas utilizações industriais e nos campos alimentícios (COELHO, 2008). A mandioca de mesa geralmente é comercializada *in natura* em supermercados e feiras livres em todo o país. Podem ser encontradas nas formas congeladas ou refrigeradas, minimamente processadas, e em forma de “chips”. A mandioca destinada às indústrias é usada principalmente para fabricação de farinhas, que exerce papel importante na dieta da população brasileira e, também, para a produção de fécula, polvilhos, com ampla utilização na forma fermentada, modificada e *in natura* (Figura 1). Esta pode ser empregada desde a base alimentar, como aditivo na fabricação de embutidos, leite em pó, chocolates, balas, biscoitos, sopas, sobremesas, sagu e pão, entre outros, até como insumo eficiente na produção de colas e embalagens e nas indústrias farmacêuticas, petroleiras, mineração e têxteis (FIALHO & VIEIRA, 2013).



**Figura 1: Utilização industrial de fécula de mandioca**



Fonte: adaptado de FIALHO & VIEIRA, 2013, p. 24.

### 3.3.1 Beiju

O beiju é uma placa ou cartucho produzido da raiz de mandioca ralada, moída e aquecida sobre uma chapa quente. Depois são colocados em prateleiras forradas com palha de banana ou babaçu para o crescimento de fungos (RIBEIRO, 2011). Os indígenas costumam comê-lo com peixe ou outro tipo de carne (ALMEIDA, 2009).

### 3.3.2 Cauim

Caium (kawi) é uma bebida não alcoólica elaborada por diferentes técnicas de processamentos. Produzida pelos índios da tribo Tapirapé, são fermentadas a partir de vários substratos diferentes além da mandioca como milho, amendoim, banana, semente de algodão, arroz e demais frutas fermentescíveis (SCHWAN *et al.*, 2007; ALMEIDA, 2009; RAMOS *et al.*, 2010). O cauim pode ser denominado como cozido e/ou fermentando, dependendo dos procedimentos de preparação, sendo ambos consumidos pelos índios Tapirapé, incluindo crianças (SCHWAN *et al.*, 2007; ALMEIDA, 2009). O processo de preparação da bebida é rudimentar e tradicional (ALMEIDA, 2009), onde se adiciona um inóculo que desencadeia o processo fermentativo. O inóculo é obtido a partir de fluidos gerados pelas mulheres da tribo,

as quais mastigam batata doce (SCHWAN *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2010), e quando adicionado, desencadeia o processo fermentativo, pois na saliva contém a enzima amilase que age sobre os componentes do amido, principal componente do substrato. A amilase quebra os açúcares complexos, libera os açúcares simples sendo utilizados pelos micro-organismos iniciadores do processo fermentativo (ALMEIDA, 2009).

Para preparar a bebida, as raízes de mandioca são fermentadas por três a cinco dias em água corrente para amolecer a pele. Após esse tempo a mandioca é descascada, cortada em pequenos pedaços e secas ao sol. Em seguida os pedaços secos são ralados até virar farinha. Essa farinha é misturada com água e cozida por aproximadamente 2h, sendo resfriada a temperatura ambiente. O inóculo é adicionado quando o mingau está frio e o processo fermentativo é iniciado, a qual normalmente dura de 24 a 48 horas. O processo de fermentação da mandioca é adequado para redução de glicosídeos cianogênicos tóxicos, para preservação e melhorar a produção de sabor e aroma (ALMEIDA; RACHID; SCHWAN, 2007).

De acordo com Miguel *et al.* (2015), após 120 horas de fermentação do cauim produzido com mandioca, batata doce e milho, são encontradas as seguintes espécies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, *Candida tropicalis*, *Debaryomyces fabryi*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus carnosus* e *Escherichia coli*. Os micro-organismos envolvidos no processo de fermentação do cauim e seu metabolismo fermentativo não são conhecidos. Em amostras de cauim de mandioca com arroz, foram identificadas uma população microbiana de *Candida*, *Cryptococcus*, *Lypomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Trichosporon*, *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans*, *Serratia plymuthica*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Paenibacillus* (ALMEIDA, 2009).

### 3.3.3 Tiquira

A tiquira é uma bebida alcoólica destilada (ALMEIDA *et al.*, 2010) de origem indígena e típica do estado do Maranhão. A fermentação natural ocorre com a participação de fungos filamentosos, leveduras e bactérias lácticas, sendo destilado posteriormente. Podem participar do processo de obtenção da tiquira os bolores autóctones *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* e *Neurospora sitophila* (FERRAREZO, 2011). É consumida pela população de baixa renda do norte e nordeste do Brasil e sua produção é tipicamente artesanal (VENTURINI FILHO &

MENDES, 2003). Na língua tupi, tiquira refere-se à *tykir* que significa cair gota a gota (ALMEIDA *et al.*, 2010; FERRAREZO, 2011; SOUZA, 2014). A pigmentação levemente arroxeadada é obtida quando os produtores adicionam ao vinho folhas de tangerina (*Citrusreticulata Blanco*) durante a etapa de destilação (SANTOS *et al.*, 2005; FERRAREZO, 2011).

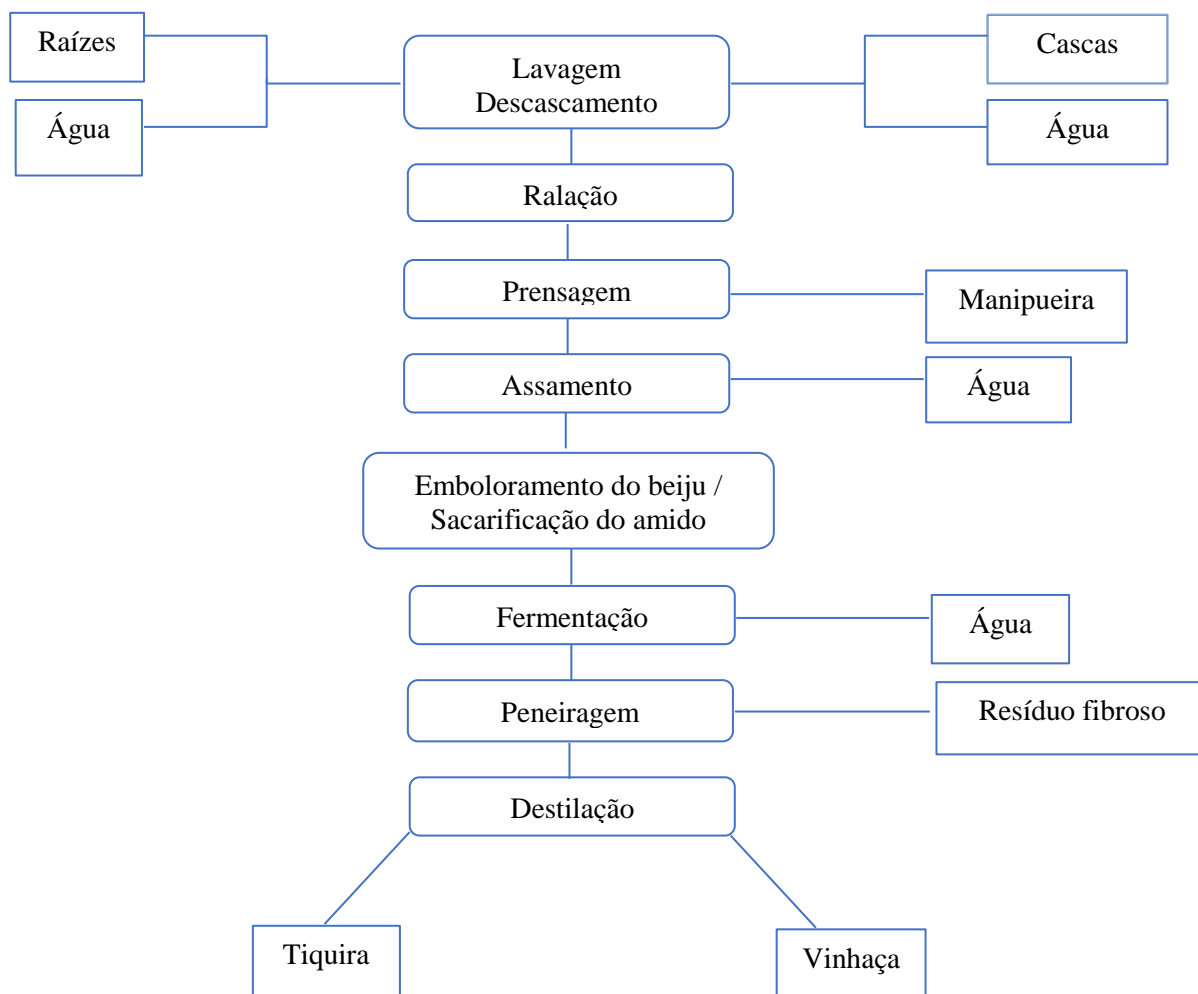
De acordo com o Decreto nº 6.871 de 2009, a tiquira é definida como um destilado alcoólico simples de mandioca, ou pela destilação de seu mosto fermentado, que possui graduação alcoólica de 36° a 54° GL (AMARAL; JAIGOBIND; JAISINGH, 2007; FURTADO *et al.*, 2007).

No processo de hidrólise, ocorre a transformação do amido em açúcar, o que pode ser feito por processo contínuo ou descontínuo, com hidrólise ácida ou enzimática. Este processo é necessário para a preparação do mosto para a produção de álcool (AMARA; JAIGOBIND; JAISINGH, 2007). A produção de álcool a partir do amido, as etapas de gelificação do amido, com a posterior liquefação e sacarificação em açúcares simples, fermentação alcoólica e destilação, são necessárias (SOUZA, 2014; ROCHA & PIRAS, 2010). As leveduras utilizadas para a fermentação alcoólica como *Saccharomyces cerevisiae* não possuem enzimas amilolíticas, o que torna a necessidade da transformação de amido de mandioca em açúcares simples. A sacarificação biológica se faz por ação enzimática do malte ou pela ação de enzimas de certos fungos, produzindo assim, a tiquira (SOUZA, 2014).

Para produção de tiquira as raízes de mandioca são lavadas, descascadas, raladas e prensadas para a retirada parcial da umidade (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003). Sobre uma chapa aquecida, a massa prensada que possui 50% de umidade é esfarelada e aquecida para ocorrer à formação do beiju, que é a gelificação do amido próximo às superfícies externas, apresentando uma estrutura coesa (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003; AMARAL; JAIGOBIND; JAISINGH, 2007). Os beijus são depositados em lugares sombreados, mas quente o suficiente para propiciar o crescimento de fungos, como os *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* *Neurospora sitophila* (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003; AMARAL; JAIGOBIND; JAISINGH, 2007). No início do processo, os beijus que contém o amido sacarificado são depositados normalmente em cochos de madeira, sendo em seguida cobertos com água. Após algumas horas, o meio é agitado e deixado em repouso para iniciar o processo de fermentação. O processo é natural e utiliza micro-organismos que ocorrem naturalmente no beiju, na parede

interna dos cochos e na água. A fermentação ocorre entre 48 a 72 horas, sendo um processo descontínuo de fermentação alcoólica, que utiliza uma mista população de micro-organismos, das quais prevalecem as leveduras (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003).

Após o término da fermentação, inicia o processo de separação dos sólidos insolúveis onde o meio fermentado é coado, pois quando estão presentes na destilação sofrem pirólise na caldeira do destilador, o que afeta negativamente a qualidade do destilado. A destilação deve ser realizada de forma branda, sem pressa, identificando e separando as frações de cabeça, coração e cauda (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003; AMARAL; JAIGOBIND; JAISINGH, 2007). A primeira fração a sair do destilador é a cabeça e estão presentes os componentes mais voláteis que o etanol, como os ésteres e aldeídos. A última fração é a cauda, que contém os componentes menos voláteis que o álcool etílico, como os álcoois superiores. O coração é a fração aproveitada para a produção de tiquira, pois é pobre em impurezas de cabeça e cauda (VENTURINI FILHO & MENDES, 2003). A produção desta bebida é mostrada na Figura 2.

**Figura 2: Fluxograma da produção de tiquira**

Fonte: VENTURINI FILHO & MENDES, 2003; AMARAL; JAIGOBIND; JAISINGH, 2007.

### 3.3.4 Farinha d'água

De acordo com a Instrução Normativa nº 52, de 07 de novembro de 2011, farinha d'água é definida como um produto predominantemente fermentado, obtido das raízes de mandioca sadias, maceradas, descascadas, trituradas ou moídas, prensadas, desmembradas, peneiradas e secas à temperatura adequada, podendo ser novamente peneirada (MAPA, 2011). Originária da região amazônica e consumida até o Estado do Maranhão, a farinha d'água é fermentada e apresenta uma granulometria maior que das outras farinhas, proporcionando um aspecto granulado (VILPOUX, 2003; CHISTÉ; COHEN, 2011).

A fabricação de farinha d'água é realizada pela fermentação das raízes ou pubagem, que é realizada em água parada ou corrente, podem ser realizadas antes ou após o descascamento, a qual confere as características sensoriais peculiares (MARINHO & ARKCOLL, 1981;

VILPOUX, 2003; CHISTÉ *et al.*, 2010; CHISTÉ; COHEN, 2011). Na maioria das unidades produtoras de farinha d'água da região Amazônica, a mandioca é descascada manualmente. Se o descascamento for realizado antes da pubagem pode-se utilizar a mecanização desta operação, se o descascamento for feito após a pubagem, deverá ser manual, pois com a pubagem anterior as raízes amolecem muito, o que impede a mecanização do descascamento por equipamentos tradicionais (VILPOUX, 2003). O tempo de pubagem pode variar para cada produtor, sendo realizada entre dois e três dias, e em alguns casos em 24 horas (VILPOUX, 2003; COELHO, 2008). Após a fermentação, a mandioca apresenta uma textura mole, com cheiro característico de fermentado. A fermentação geralmente ocorre em tanques de alvenarias construídos nas comunidades ou em caixas d'água de amianto (ALMEIDA, 1992; VILPOUX, 2003).

Após o descascamento a mandioca é tradicionalmente prensada utilizando *tipitys* (VILPOUX, 2003; COELHO, 2008), que permitem uma excelente prensagem, mas é um método limitado devido à quantidade de massa introduzida a cada um deles em cada prensagem. Esta operação só é possível porque as raízes se tornaram muito macias com a fermentação. O processo de prensagem é seguido de duas ralações, o que consiste em uma primeira prensagem, seguida de uma ralação e de uma segunda prensagem com uma ralação final (VILPOUX, 2003).

A massa ralada é colocada em sacos abertos do tipo de farinha ou de ração animal, em panos (VILPOUX, 2003), ou em cofos (cestas de taguara de boca estreita) (COELHO, 2008). A massa ralada é distribuída por igual sobre sacos, que em seguida são dobrados sobre si como um envelope, não ultrapassando camadas de 15 cm. Não se deve usar mais de 5 a 6 camadas para não reduzir a eficiência da prensagem (VILPOUX, 2003). Após a prensagem a massa ralada é esfarelada numa peneira com furos de 5 mm de diâmetro. O resíduo retido volta ao ralador para reaproveitamento, e em seguida a massa esfarelada é seca no forno (VILPOUX, 2003).

A etapa mais importante do processamento da farinha d'água é a secagem, pois a granulometria final do produto depende dela e, conseqüentemente, a qualidade repassada aos consumidores. Para a formação de grânulos típicos do produto, a temperatura de secagem deve ser superior à temperatura de secagem da farinha seca. A granulometria é proporcionada, além da temperatura, pela quantidade de material colocado no forno e pela forma de revirar a farinha. No caso da farinha d'água, o material a ser seco é colocado rapidamente no início da operação de secagem, enquanto que para a farinha seca, a colocação no forno é mais lenta (VILPOUX, 2003).

Após a secagem, para uma padronização da granulometria, a farinha deve ser peneirada. Para a farinha d'água, o produto deve conter o mínimo possível de pó fino e de caroços grandes (VILPOUX, 2003). O produto é passado em peneira fina, com furos de 2 mm, onde é classificada como fina quando o produto fica retido em até 10 %; média quando fica retido em mais de 10 % até 15 % e grossa quando o produto fica retido em mais de 15 % (MAPA, 2011), obtendo um produto homogêneo com as características desejadas pelos consumidores. Os resíduos obtidos podem ser repassados no ralador, onde reintegram o processo (VILPOUX, 2003).

### **3.3.5 Polvilho**

O polvilho azedo é um produto tradicional de Minas Gerais, com produção realizada por pequenas e médias empresas (AQUINO; GERVIN; AMANTE, 2016). O preparo artesanal é obtido do tubérculo da mandioca por meio da fermentação prolongada da mandioca, após a etapa de decantação da fécula, seguido de secagem ao sol (PENIDO, 2013; AQUINO; GERVIN; AMANTE, 2016). O polvilho doce passa pelo mesmo processo de extração da fécula do polvilho azedo, mas possui tempo de fermentação menor o que confere teores de acidez diferentes (PENIDO, 2013).

De acordo com a Legislação Brasileira regulamentada pela Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) o polvilho é definido como um produto amiláceo extraído da mandioca. O polvilho é classificado de acordo com o teor de acidez titulável como doce ou azedo. Para o polvilho azedo, a acidez titulável deve ser no máximo de 5,0 mL de NaOH 1N/100g de matéria seca e para o polvilho doce 1,0 mL solução NaOH. A diferença entre os dois grupos está nos índices de acidez titulável, pH e aspectos gerais como granulação, aroma e cor (BRASIL, 1978; PENIDO, 2013).

A fermentação espontânea do amido de mandioca é necessária para a obtenção do polvilho azedo, realizada por diversos micro-organismos naturalmente presentes na matéria-prima, na água e nos tanques de fermentação (LACERDA, 2002; ALMEIDA, 2009; PENIDO, 2013; AQUINO; GERVIN; AMANTE, 2016). Para a obtenção do polvilho doce e azedo, utiliza-se o mesmo processo de extração da fécula (LACERDA, 2002). As raízes de mandioca são lavadas em tanques, descascadas, e em seguida raladas (LACERDA, 2002; PENIDO, 2013). A massa é lavada em peneiras até que a água não esteja mais leitosa. Essa água é recolhida e decantada

em cochos de madeira até que a fase sobrenadante se torne límpida. O sobrenadante e as impurezas superficiais são removidas. Para a obtenção do polvilho doce, o amido decantado é fermentado por um período de dois a sete dias (PENIDO, 2013), e para o polvilho azedo a fermentação ocorre por 20 a 70 dias (LACERDA, 2002). Após o período de fermentação ocorre o processo de secagem, onde espalha-se o material em jiraus de bambu, com panos sobrepostos ou em terreiros batidos ou cimentados, revestidos com plásticos. Este período de secagem varia de acordo com as condições climáticas, podendo ser de 8 a 14 horas (LACERDA, 2002).

A grande variação encontrada na qualidade do polvilho azedo proveniente de diversos produtores ou de um mesmo produtor pode ser explicada por estas características. As condições climáticas brasileiras são diferentes e definem a microbiota predominante nos processos fermentativos, fazendo com que polvilhos produzidos em diferentes regiões apresentem diferenças relacionadas com a acidez e a composição de ácidos orgânicos (AQUINO; GERVIN; AMANTE, 2016). Lacerda *et al.* (2005) ao estudarem as BAL e leveduras associadas com fermentação espontânea durante a produção de polvilho azedo em Minas Gerais, identificaram as seguintes espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. perolens*, *Candida rugosa*, *Candida tropicalis*, *Debaromyces hansenii*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces exiguus*, *Candida ethanolica*, *Galactomyces geotrichum*, *Issatchenkia* sp., *Issatchenkia terricola*, *Kluyveromyces lactis*, *Dipodascus ingens*, *Candia humilis*, *Candida cylindracea*. Penido *et al.* (2018) ao estudarem a produção de polvilho azedo em escala piloto identificaram as seguintes espécies: *L. brevis*, *Enterococcus faecium*, *L. casei/Lb. paracasei*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri*, *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Weissella cibaria*, *Leuconstoc mesenteroides*, *Candia humilis*, *Kazachstania exigua*, *Pichia scutulata*, *Candida ethanolica* e *Geotrichum fragans*.

O processo fermentativo de mandioca para produção de polvilho é acompanhado por uma rápida queda na concentração de oxigênio dissolvido no início do processo fermentativo, que é ocasionada pela presença de bactérias amilolíticas aeróbias capazes de consumir oxigênio e resulta na produção de gases como o dióxido de carbono e hidrogênio. A baixa disponibilidade de oxigênio e os produtos oriundos da hidrólise do amido induzem o processo das vias fermentativas acidogênicas, com aumento na produção destes ácidos e oscilações nas concentrações de açúcares. A atuação da  $\alpha$ -amilase provoca o aumento do teor de açúcares redutores na fase inicial de fermentações realizadas em laboratório, com um decréscimo no final do período fermentativo, atribuído aos micro-organismos consumidores destes



carboidratos e às condições desfavoráveis para atuação das enzimas (LACERDA, 2002). Segundo Cereda (1973 *apud* LACERDA, 2002, p. 10), identificou uma microbiota abundante no material em fermentação de mandioca para produção de polvilho, e subdividiu-a em três grupos pela ordem de ocorrência ao longo do processo fermentativo, embora as fases não sejam obrigatoriamente distintas. Na primeira fase, o ambiente é microaerófilo, devido à queda de tensão de oxigênio nos tanques de fermentação, e ocorre a presença de microrganismos como bactérias dos gêneros *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Na segunda fase, o consumo de oxigênio propicia condições para o desenvolvimento dos microrganismos facultativos ou anaeróbios estritos, ocorrendo microrganismos mais exigentes, produtores de ácido e gás. Foram identificados grupos responsáveis por fermentações butírica, láctica, acética, propiônica, em função de fatores ambientais, principalmente temperatura da região produtora. Na terceira fase, apareceram micro-organismos saprófitas e contaminantes, entre os quais leveduras, que formam compostos aromáticos, e filamentosos com capacidade de produção de aflatoxinas (COELHO, 2008).

### 3.3.6 Fufu, Gari e Lafun

Fufu, Gari e Lafun são produtos fermentados da mandioca muito parecidos e são típicos dos países africanos (FERRAREZO, 2011; FAYEMI; OJOKOH, 2012). Fufu, também conhecido como ‘akpu’, é obtido quando as raízes de mandioca são descascadas, lavadas, cortadas em pedaços maiores e mergulhadas em água dentro de vasos de barro ou em um fluxo lento por 4 a 5 dias para que ocorra a fermentação, e posteriormente a mandioca é desintegrada em água limpa e peneirada, ficando em repouso por 3 a 4 horas para decantação da água. O sedimento é o fufu, que é colocado em sacos e submetidos a pressão para eliminar o restante da água, e pode ser consumido após a gelatinização com água para formar uma pasta (IWUOHA; EKE, 1996; AVANCINI, 2007; FERRAREZO, 2011). Sua produção envolve fermentação por BAL (*Lactobacillus plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. coprophilus*, *L. delbruckii* spp. *lactis*, *L. delbruckii* spp. *bulgaricus*) (OYEWOLE & ODUNFA, 1990) e leveduras (*Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Pichia saitoi*, *S. cerevisiae*, *Pichia anomala* e *Zygosaccharomyces bailii*) (OYEWOLE, 2001).

Gari é um alimento seco e granulado, produzido com um pequeno sabor ácido, e é uma das formas de processos mais comum no oeste da África (BECHOFF *et al.*, 2015). A produção do gari é realizada quando as raízes de mandioca são descascadas e raladas. A polpa ralada é

colocada em sacos de panos e amarradas. Pedras pesadas são colocadas no saco para extrair o suco da mandioca. A mandioca é deixada para fermentar nessa posição por 3 a 5 dias, a polpa é depois torrada em uma panela de metal rasa, e o produto final é um pó seco, farináceo de cor creme (IWUOHA; EKE, 1996; OGUNTOYINBO; DODD, 2010). As BAL lácticas estão envolvidas na fermentação do gari. Em trabalho conduzido por Oguntoyinbo & Dodd (2010) foram encontradas no gari as espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. pentosis*, *L. casei* e *L. acidophilus*. As espécies de *L. delbruckii*, *L. coryneformis* e *Saccharomyces* sp. também foram isoladas na fermentação do gari, em um estudo realizado com o objetivo de melhorar a qualidade do gari (OKAFOR; UMEH; IBENEGBU, 1998).

Lafun é uma farinha seca de mandioca fermentada, consumida comumente na Nigéria e Benin (OYEWOLE & ODUNFA, 1988; IWUOHA; EKE, 1996; PADONOU *et al.*, 2009). A produção envolve o descascamento das raízes de mandioca, que são lavadas e cortadas em pedaços (PADONOU *et al.*, 2009; PADONOU *et al.*, 2010). Os pedaços são imersos em água e deixadas para fermentar por 3 a 4 dias. No final da fermentação os pedaços macios são secos sob o sol por 2 dias, moídos e peneirados (IWUOHA; EKE, 1996). Oyewole & Odunfa (1988), em estudo da microbiota na fermentação da mandioca para produção de lafun, identificou a espécie de *Candida* sp., que apareceu entre 24 e 48 horas de fermentação e aumentou rapidamente depois. As BAL que apareceram estão envolvidas em todo o período de fermentação. Após 48 horas de fermentação, teve a predominância das BAL e leveduras. Padonou *et al.* (2009), mostraram que o início do processo é dominado por *Bacillus cereus*, *L. plantarum* e *Weissella confusa*, e as leveduras ocorrem em níveis mais baixos. Após 24 horas de fermentação os micro-organismos envolvidos são: *L. fermentum*, *B. cereus*, *W. confusa* e *L. plantarum* como bactéria predominante, e *Kluyveromyces marxianus* foi e espécie de levedura predominante. As espécies de *Bacillus* desapareceram após 48 horas de fermentação, sendo a microbiota constituída por *L. fermentum*, *L. plantarum*, *Weissella* sp. *W confusa*, *Leuconostoc fallax*, *Pichia scutulata*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *K. marxianuse* *Candida tropicalis*.

### 3.3.7 Tucupi

Durante o processo de produção, nas casas de farinha no interior do Pará, tem-se um líquido residual, que é obtido da massa ralada e triturada da mandioca, denominada manipueira (CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016), a partir do qual, por meio de processo de

fermentação e cocção é possível extrair um produto da culinária de elevado valor comercial: o tucupi (MODESTO JUNIOR, 2012).

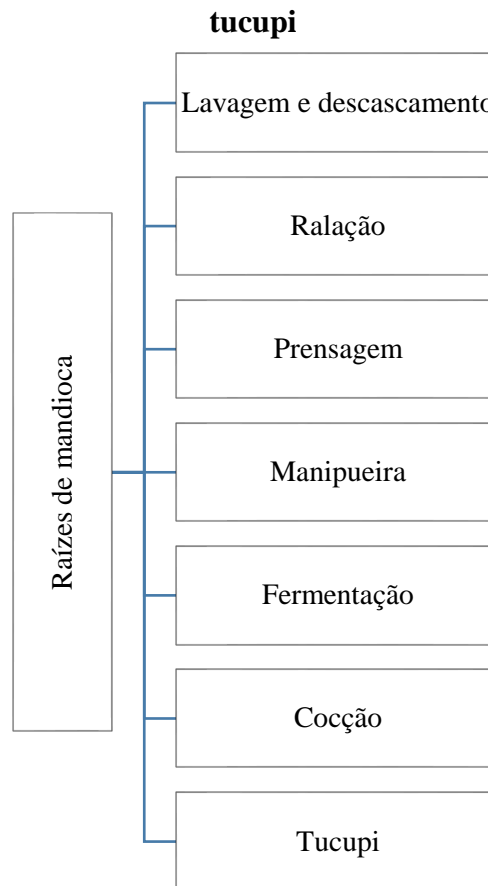
O tucupi, um molho fermentado, é um condimento caseiro, típico do Amazonas, Pará e norte do Maranhão (CASSONI, 2008), possui um sabor inigualável que compõe o mais famoso prato dos paraenses, o pato no tucupi. É amplamente utilizado no preparo de vários pratos ao molho como leitão, peixe, camarão e alguns tipos de caça. Usado no preparo do tradicional tacacá e no molho com pimenta-de-cheiro ou malagueta (MODESTO JUNIOR, 2012).

É definido de acordo com o regulamento técnico de Padrão de Identidade e Qualidade como um produto e/ou subproduto obtido da raiz da mandioca (*Manihot esculenta* Cratz) e suas variedades, por meio de processos tecnológicos adequados, com o uso predominante na culinária paraense, no qual deve apresentar as seguintes características: duas fases distintas, sendo uma sólida e outra líquida, cujas características são perceptíveis quando o produto está em repouso; coloração variando de amarelo claro ao amarelo intenso, quando homogeneizado; sabor levemente ácido e aroma próprio e pode ser adicionado sal, açúcar, alho e vegetais usados na culinária tradicional (BRASIL, 2008).

### **3.3.7.1 Processo de produção do tucupi**

As raízes de mandioca são prensadas e trituradas para remoção de seu líquido, durante o processo de fabricação da farinha. A manipueira é coletada sob a prensa e deixada em repouso por ser de até 72 horas para que ocorra a fermentação e a decantação do amido, popularmente conhecido e comercializado como goma (COHEN; OLIVEIRA; CHISTÉ, 2007; DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2017). Após esse tempo, o produto final, tucupi, é submetido ao processo de cocção, que dura em torno de uma hora e meia (dependendo do volume), é então embalado e comercializado (DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2017). As etapas de seu processamento são descritas a seguir (Figura 3).

**Figura 3: Fluxograma do processamento das raízes de mandioca para a produção de tucupi**



Fonte: COHEN; OLIVEIRA; CHISTÉ, 2007, p.12.

A lavagem é realizada por agitação das raízes com paus ou por uma pessoa que pisa sobre elas dentro do tanque de água. Com este processo as raízes ficam bem lavadas e com economia de água (CEREDA & VILPOUX, 2003). Em seguida, as raízes previamente colhidas são descascadas manualmente com facas (CEREDA & VILPOUX, 2003; DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016), para posteriormente serem moídas no *catitu* (ralador). O ralo é cilíndrico, em madeira, dotado de serras metálicas ou taliscas. Em seguida, a massa ralada é recebida em um dos cochos de madeira para extração da fécula (CEREDA & VILPOUX, 2003; DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016). A extração é feita sobre quadros cobertos por telas de tecido de algodão ou uma tela fina de náilon, apoiados sobre as laterais dos cochos de madeira (CEREDA & VILPOUX, 2003; DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016). O processamento é manual e a massa é prensada até a obtenção do líquido, denominado de manipueira (DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016). A fermentação da manipueira reduz os níveis de ácido

cianídrico, tornando o produto apropriado para o consumo. Durante o processo de fermentação ocorre à diminuição gradativa do processo de hidrólise do cianeto livre, o que reduz sua toxicidade de forma natural. O processo de fermentação é realizado em temperatura ambiente por aproximadamente 24 horas. Durante esse período de repouso, o amido presente no líquido decanta dando origem a goma (DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016). Normalmente a fermentação ocorre em tanques de cimentos revestidos de azulejos ou em bombonas plásticas de aproximadamente 120 litros. Após a fermentação, o tucupi é fervido por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, onde pode ser observada a formação de uma espuma espessa sobre o líquido. Nesta espuma encontra-se maior concentração de compostos toxigênicos (ácido cianídrico) que ainda se fazem presentes no caldo e devem ser reduzidas consideravelmente, de forma que, não cause intoxicação a quem for consumir a especiaria (DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016). Nos últimos 20 minutos de fervura pode acrescentar alguns condimentos, como a chicória, sal a gosto e pimenta de cheiro (DIAS; RODRIGUES; CALIXTO, 2016).

Unidades processadoras no Norte do país costumam adicionar corantes artificiais no tucupi. Apesar de não ser documentada, a adição de corantes sintéticos é uma prática de rotina realizada nas unidades processadoras na região Norte. Essa prática tem o objetivo de conferir ou intensificar a cor amarela, tornando os produtos mais atraentes para os consumidores. Esses corantes, como por exemplo, o amarelo tartrazina (limite máximo de 0,005-0,03 g/100g ou 100 mL), são empregados sem critérios. Grupos de saúde e órgãos de regulamentação, discutem a utilização do amarelo tartrazina, uma vez que vem sendo associado a reações de natureza alérgica, como asma brônquica e urticárias, principalmente em pessoas que tem alergia ao ácido acetilsalicílico (MODESTO JÚNIOR; ALVES, 2016).

### **3.4 Análise higiênico-sanitárias de produtos obtidos pela fermentação de mandioca**

Segundo Tondo & Bartz (2012) alimento seguro é aquele que não causa danos à saúde do consumidor. Um indicador de condições de higiene insatisfatória utilizado para avaliar a qualidade higiênico-sanitária na produção e / ou manipulação de alimentos, é a presença de coliformes (CHISTÉ *et al.*, 2006; COELHO, 2008). A *Escherichia coli* é até o momento a melhor indicadora fecal, sendo relevante a presença desta bactéria, pois existem algumas linhagens patogênicas (COELHO, 2008). O número elevado de coliformes pode não significar contaminação direta com material fecal, mas sim manipulação inadequada, como higiene do

manipulador, acondicionamento inadequado e transporte (CHISTÉ *et al.*, 2006; COELHO, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa Adepará nº 1 de 24 de junho de 2008, o tucupi deve apresentar os seguintes limites máximos microbiológicos: *Salmonella* spp ausente em 25 mL; coliformes fecais NMP < 3/mL; *Staphylococcus* coagulase positivo < 10<sup>2</sup> UFC/mL e *Bacillus cereus* < 10<sup>2</sup>UFC/mL (BRASIL, 2008).

A obtenção da massa de puba é realizada por processos manuais e deve-se atentar para o aspecto sanitário, pois no sistema rotineiro de fermentação, as raízes são imersas em água não tratada. Análise microbiológica deve ser realizada nesses alimentos para garantir sua qualidade. As principais fontes de contaminação da puba são os micro-organismos da água, solo, utensílios, superfícies e dos manipuladores. De tal modo que as precárias condições de processamento, conservação e comercialização podem refletir na qualidade da puba, na sua vida útil e eventuais riscos aos consumidores (COELHO, 2008).

Em relação à produção de farinha de mandioca, a qualidade é comprometida, pois a maior parte das casas de farinhas possui uma estrutura muito rudimentar, sendo comum possuírem construções abertas, com piso de terra batida, equipamentos e utensílios de madeira construídos pelos próprios trabalhadores. As operações de processamento normalmente são realizadas manualmente, envolvendo toda a família. A estrutura e os procedimentos adotados nas unidades de processamento comprometem o rendimento de produção e a qualidade dos produtos, e que as normas da legislação para unidades de alimento não são atendidas, práticas higiênico-sanitárias não são adotadas, ocorrendo contaminações microbiológicas e por partículas sólidas que comprometem a conservação dos produtos e sua segurança para consumo humano (PAIVA, 1991 *apud* OLIVEIRA, 2008, p. 30).

É importante o estudo sobre os micro-organismos presentes na fermentação da mandioca, onde poderá contribuir com novos conhecimentos acerca das espécies que dominam o processo, além de proporcionar uma melhoria sanitária na qualidade do produto beneficiando o produtor e consumidor (COELHO, 2008).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta das amostras**

Um total de 18 amostras de tucupi foram obtidas para a realização do presente estudo, sendo que esta coleta foi realizada em três etapas. Na primeira etapa as amostras foram codificadas de A1 a A4, referente a amostras de produto final, coletadas em Belém do Pará e Belo Horizonte. Na segunda e terceira etapa, as amostras codificadas de T1 a T9 e B1 a B5, foram coletadas durante seu processo de produção em uma fábrica artesanal no município de Castanhal em Belém (PA) (Quadro 1). As amostras codificadas como T5 a T8 (produção 1), correspondem a um processo de produção, assim como B1 a B5 (produção 2). Todas as amostras foram coletadas assepticamente em frascos esterilizados e transportadas para o laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMIB) da Faculdade de Farmácia da UFMG, em caixas de isopor contendo gelo, para posterior análise.

**Quadro 1: Amostras obtidas durante o processo de produção de tucupi e produto final**

<b>Amostra</b>	<b>Local</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Tempo de fermentação (horas)</b>
A1	Mercado Central / Belo Horizonte	07/10/2016	NI
A2	Feira “Ver o Peso” / Belém	07/10/2016	NI
A3	Supermercado / Belém	07/10/2016	NI
A4	Supermercado / Belém	07/10/2016	NI
T1	Castanhal / Belém	14/02/2017	24
T2	Castanhal / Belém	14/02/2017	24
T3	Castanhal / Belém	14/02/2017	NI
T4	Castanhal / Belém	14/02/2017	NI
T5	Castanhal / Belém	14/02/2017	0
T6	Castanhal / Belém	14/02/2017	0
T7	Castanhal / Belém	14/02/2017	6h22
T8	Castanhal / Belém	14/02/2017	9h40
T9	Castanhal / Belém	14/02/2017	NI
B1	Castanhal / Belém	26/06/2017	0
B2	Castanhal / Belém	26/06/2017	8
B3	Castanhal / Belém	27/06/2017	25h40
B4	Castanhal / Belém	27/06/2017	25h40
B5	Castanhal / Belém	27/06/2017	25h40

NI = não informado. A1 (tucupi produto final); A2 (tucupi produto final); A3 (tucupi produto final); A4 (tucupi produto final); T1 (tucupi produto final com pimenta malagueta e pimenta de cheiro); T2 (tucupi produto final com pimenta de cheiro); T3 (tucupi cru); T4 (massa de mandioca amarela); T5 (massa de mandioca amarela moída - produção 1); T6 (1º fermentação (manipueira) - produção 1); T7 (2º fermentação - produção 1); T8 (3º fermentação - produção 1); T9 (tucupi puro - fermentado, antes de realizar cocção); B1 (1º fermentação (manipueira) - produção 2); B2 (2º fermentação - produção 2); B3 (3º fermentação - produção 2); B4 (tucupi produto final cozido com tempero - jambu, chicória, alfavaca, alho e sal - produção 2); B5 (tucupi produto final cozido sem tempero - produção 2).



## **4.2 Processamento das amostras e análise microbiológica**

O isolamento, quantificação e identificação de bactérias do ácido láctico, leveduras, e *Bacillus cereus* e a determinação do número mais provável de coliformes totais, termotolerantes e *E. coli* foram realizados nas amostras estudadas. Foram pipetados volumes de 25 mL de cada amostra em recipientes previamente estéreis, homogeneizadas e diluídas em 225 ml de água peptonada 0,1% estéril. Para as amostras sólidas (massa de mandioca) foram pesadas 25 gramas em recipientes estéreis, homogeneizadas e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% estéril. Das diluições decimais seriadas, foram retiradas alíquotas de 1 mL ou 0,1 mL e inoculados nos diferentes meios de cultura (LACERDA, 2002).

## **4.3 Isolamento, quantificação e identificação dos micro-organismos**

### **4.3.1 Bactérias do ácido láctico**

As bactérias do ácido láctico foram isoladas em ágar MRS (MAN, ROGOSA E SHARPE - DIFCO) pelo plaqueamento de alíquotas de 0,1 mL das diluições decimais adequadas (LACERDA, 2002). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose por 48 horas a 37 °C (SIQUEIRA, 1995 *apud* LACERDA, 2002, p. 21). Decorrido este período, foram feitas as contagens das colônias e subsequente purificação em ágar MRS dos diferentes morfotipos, e então congeladas no freezer a – 21 °C em criotubos esterilizados contendo 10% de glicerol estéril, para posterior identificação. A partir das culturas puras foram realizadas as provas de coloração de Gram e reação de catalase (NORRIS *et al.*, 1981 *apud* LACERDA, 2002, p. 21).

### **4.3.2 Leveduras**

As leveduras foram isoladas em ágar extrato de malte-extrato de levedura – YM (peptona 0,5%, extrato de levedura 0,3%, glicose 1,0%, extrato malte 0,3%, ágar 2,0%). As placas foram incubadas em aerobiose por 48 horas a 30 °C (LACERDA, 2002). Após este período foram feitas as contagens das colônias e subsequente purificação em ágar YM, e então congeladas no freezer a – 21 °C em criotubos esterilizados contendo 20% de glicerol estéril, para posterior identificação.

#### 4.4 Avaliação das condições higiênico-sanitárias

##### 4.4.1 *Bacillus cereus*

A quantificação e o isolamento de *Bacillus cereus* foram realizadas utilizando o ágar MYP (Mannitol Egg Yolk Polymyxin Ágar), enriquecido com emulsão de ovo e solução de polimixina B a 1%. Alíquotas de 0,1 mL de diluições apropriadas foram semeadas na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 a 48 horas. Após a incubação, a obtenção de culturas puras foi feita pelo estriamento de colônias típicas em Ágar Nutriente e incubadas a 30 °C, por 24 horas (SIQUEIRA, 1995 *apud* LACERDA, 2002, p. 23).

As colônias que apresentaram características de coloração rosa rodeada por um halo opaco, indicando a ação da lecitinase, foram submetidas ao teste de catalase e à coloração de Gram. As provas bioquímicas confirmatórias foram realizadas em seguida como: utilização anaeróbica da glicose, redução de nitrato, Voges-Proskauer (VP), decomposição da tirosina e resistência à lisozima. Para diferenciação dos membros do grupo de *B. cereus* foram realizados os testes de crescimento rizoidal, motilidade, atividade hemolítica, detecção de cristais à microscopia óptica (TALLENT *et al.*, 2012; MASCARENHAS, 2018). A identificação convencional foi realizada na Fundação Ezequiel Dias (FUNED), laboratório de microbiologia de alimentos.

Foram identificados como *B. cereus sensu stricto (s.s)* as culturas que apresentaram as seguintes características: Gram e catalase positiva, produção de lecitinase e não utilização do manitol, crescimento em meio de glicose, redução de nitrato, VP positivo, decomposição da tirosina, crescimento em lisozima, móveis, sem crescimento rizoidal e forte atividade hemolítica. Para a diferenciação entre *B. cereus s.s.* e *B. thuringiensis* foi realizada a prova para a detecção de cristais de toxina protéica, onde o *B. cereus s.s.* não produz cristais de toxinas após esporulação (TALLENT *et al.*, 2012; MASCARENHAS, 2018).

##### 4.4.2 Coliformes totais e termotolerantes

A determinação do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes foi realizada pelo inóculo do volume de 1 mL de diluições apropriadas, em três séries de três tubos, contendo caldo lauril sulfato triptose (LST) com tubos de Durham invertidos, para análise do tucupi em processo de fermentação e do produto final (SIQUEIRA, 1995 *apud* LACERDA, 2002, p. 21).

Os tubos foram incubados a 37 °C, por 24/48 horas. Dos resultados positivos evidenciados, retirou-se uma alçada de cada tubo e semeou-se em tubos, contendo Caldo Verde Brilhante e Bile 2% e caldo EC (*Escherichia coli*). Os tubos foram incubados em banho-maria a 44,5 °C, para o caldo EC e 37 °C para o caldo Verde Brilhante e Bile 2 %, por 24/48 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram produção de gás nos tubos de Durhan e turvação do meio de cultura, indicando que houve desenvolvimento de bactérias do grupo coliforme. Os resultados foram expressos pelo número mais provável de coliformes por grama ou 100 mL da amostra (NMP/100ml).

#### **4.4.3 *Salmonella* sp.**

Para a pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada um pré-enriquecimento, utilizando 25 mL de amostra em 225 mL de água peptonada 0,1%, incubada por 24 horas a 37 °C. Após este período foi realizado um enriquecimento em caldo seletivo tais como o caldo tetracionato e caldo selenito cistina, incubado a 37 °C por 24 horas. Em seguida, foi realizado o plaqueamento seletivo diferencial, utilizando Ágar Entérico de Hecktoen (HE), *Salmonella-shigella* (SS) e Ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD), incubados a 37 °C por 24 horas. As colônias suspeitas foram inoculadas em Ágar tríplice açúcar (TSI) e Ágar lisina ferro (LIA), incubadas a 37 °C por 24 horas (NEUMANN; CARMO; DRUMMOND, 2014).

## 4.5 Identificação molecular das bactérias do ácido láctico

### 4.5.1 Extração de DNA

O DNA total das BAL foi extraído a partir de uma adaptação do método descrito por Hoffman & Winston (1987). As colônias previamente crescidas em ágar MRS foram ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de Tris-EDTA (TE). A seguir, foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e 2 pérolas de vidro à suspensão. Os tubos contendo essa mistura foram então levados ao Vortex (QL-901, Biomixer) por três minutos e meio e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos (MiniSpin® Eppendorf). Decorrido o tempo, retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo. Adicionou-se ao tubo um volume de etanol gelado a 96% correspondente ao volume de sobrenadante recuperado. Os tubos foram então homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por cinco minutos (MiniSpin® Eppendorf). A fase líquida foi descartada, os tubos foram secos *overnight* e o DNA ressuspendido em 50  $\mu\text{L}$  de TE. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) (PENIDO, 2013).

### 4.5.2 Amplificação por PCR da região 16S do gene do rRNA

O DNA das BAL foi submetido à amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região 16S do gene do rRNA, utilizando-se os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') conforme Lane (1991). No experimento realizado utilizou-se 5  $\mu\text{L}$  de tampão 10X (MBI Fermentas), 1  $\mu\text{L}$  de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM (MBI Fermentas), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador 27F 10  $\mu\text{mol}^{-1}$  (Invitrogen, EUA), 1  $\mu\text{L}$  do iniciador 1492R 10  $\mu\text{mol}^{-1}$  (Invitrogen, EUA), 0,25  $\mu\text{L}$  de taq DNA polimerase 1,25 U (MBI Fermentas) e 1  $\mu\text{L}$  de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50  $\mu\text{L}$ . A reação foi realizada no termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, trinta ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por um minuto e meio, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 minutos (PENIDO, 2013).

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 % (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL

de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 120 V por 25 minutos para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) (PENIDO, 2013).

#### **4.5.3 Agrupamento pela análise dos perfis moleculares obtidos por RFLP**

As BAL foram agrupadas por análise dos perfis moleculares obtidos por polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP) por meio da digestão com enzimas de restrição *MspI*, *HaeIII* e *HinfI*, 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 de soro bovino (BSA) apenas para a enzima *MspI*, 1 µL de enzima, 1 µL de DNA na dosagem  $\geq 1500$  ng/µL e água q.s.p. 20 µL. Os tubos foram incubados a 37 °C por três horas (PENIDO, 2013).

Os fragmentos de restrição obtidos foram separados em gel de agarose a 2 % por eletroforese em tampão TBE 0,5 % a 100 V por 2 horas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) (PENIDO, 2013).

#### **4.5.4 Amplificação da região 16S do gene do rRNA para a reação de sequenciamento**

Um isolado de cada perfil molecular diferenciado previamente pela técnica de digestão com enzimas de restrição (RFLP) foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região 16S do gene do rRNA. Para a reação foram utilizados os iniciadores 27F e 1492R, conforme citado anteriormente no item 4.5.2 (LANE, 1991). Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão TBE 0,5 % a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) (PENIDO, 2013).

#### **4.5.5 Purificação dos amplicons**

Os produtos de PCR (amplicons) obtidos foram purificados mediante técnica com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e etanol absoluto (APPLIED BIOSYSTEMS, 2002).

Inicialmente foram adicionados 11,75 µL de EDTA 125 mM e 141 µL de etanol absoluto a 47 µL dos produtos de PCR. Os tubos foram homogeneizados, deixados em repouso sobre a bancada por 30 minutos e, então, centrifugados a 13.000 rpm por 25 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi descartado e adicionou-se 120 µL de etanol 70 % gelado aos tubos, os quais foram homogeneizados e centrifugados a 13.000 rpm por dez minutos (MiniSpin® Eppendorf). O etanol foi descartado e os tubos foram secos *overnight*. Decorrida essa etapa, o DNA foi ressuspensionado em 10 µL de água deionizada e hidratados a 37 °C por 30 minutos. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies) (PENIDO, 2013).

#### 4.5.6 Reação de sequenciamento

As amostras foram sequenciadas na plataforma ABI Fundação FIOCRUZ, Centro de Pesquisa René Rachou. A reação de sequenciamento inicial foi de 96 °C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 96 °C por 15 segundos, hibridização a 50 °C por 15 segundos, extensão a 60 °C por 4 minutos e final a 4°C. Para reação de precipitação foi adicionado 1 µL de EDTA 125 mM, 1 µl acetato de sódio 3M e 50 µL de etanol absoluto. Após selagem, a placa foi levada ao vórtex por 10 a 15 segundos e deixada em repouso sobre a bancada por 15 minutos. Em seguida, centrifugou a 4.000 rpm °C por 45 minutos a 4 °C. Foi retirado o selante e descartado o conteúdo por inversão, foi adicionado 100 µL de etanol 70%, selada a placa e centrifugada novamente por 15 minutos. Foi retirado o selante e o sobrenadante foi descartado por inversão, pulsada a centrifuga até atingir 900 rpm (*spin*) com a placa aberta e invertida sobre papel toalha e deixado secar por 15 minutos e selada a placa. Foi adicionado 10 µL de formamida, selada e levada ao vórtex, em seguida procedeu a desnaturação a 95 °C por 3 minutos em gelo. Para análise das sequências, foi utilizado o programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 disponível no portal NCBI ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)), para a comparação com as sequências já depositadas no GenBank.

## 4.6 Isolamento e identificação molecular das leveduras

### 4.6.1 Isolamento das leveduras

As leveduras foram isoladas em ágar extrato de malte - extrato de levedura – YM (extrato de malte 0,3 %, extrato de levedura 0,3 %, peptona 0,5 %, glicose 1,0 %, ágar 2,0 %). As placas foram incubadas aerobicamente por 48 horas a 30 °C (ROSSITA & FLEET, 1996). Os diferentes morfotipos de leveduras foram descritos e quantificados, sendo a contagem dos isolados expressa em UFC/g e UFC/mL. Os micro-organismos predominantes foram contados e três representantes de cada morfotipo foram purificados e cultivados em caldo GYMP (glicose 2,0 %, extrato de levedura 0,5 %, extrato de malte 1 % e fosfato de sódio monobásico 0,2 %) a 25 °C por 48 horas e então congeladas em criotubos esterilizados em freezer a - 86 °C, após a adição de 20 % de glicerol esterilizado, para posterior identificação (PENIDO, 2013).

### 4.6.2 Identificação molecular das leveduras

#### 4.6.2.1 Extração de DNA

O DNA total de cada isolado das leveduras foi extraído utilizando a metodologia de Silva-Filho *et al.* (2005) modificada. 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 30 minutos. Decorrido esse tempo foi adicionado 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) aos tubos e esses levados ao Vortex (QL – 901, Biomixer) por três minutos e centrifugados por 15 minutos (MiniSpin® Eppendorf). O sobrenadante foi então retirado e transferido para outro tubo, onde foi adicionado 100 µL de etanol 70 % gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.400 rpm por 10 minutos (MiniSpin® Eppendorf) e o etanol foi descartado. Foi adicionado 200 µL de etanol 70% gelado e homogeneizado por inversão. Os tubos foram centrifugados a 13.400 rpm por 10 minutos. Descartou-se o etanol e os tubos foram secos em estufa a 37°C por ± 2 horas. Concluída essa etapa, o *pellet* de DNA foi ressuspendido em 50 µL de TE, e armazenado em freezer a -20 °C (PENIDO, 2013).

#### 4.6.2.2 Agrupamentos por PCR *fingerprinting*

O *primer* utilizado foi o microssatélite (GTG)<sub>5</sub> após o agrupamento das leveduras por análise dos perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting*, seguindo a metodologia de Lieckfeldt *et al.* (1993). Para a reação, foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,1 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (MBI Fermentas), 2 µL do iniciador (GTG)<sub>5</sub> 10 µmol<sup>-1</sup> (Invitrogen, EUA), 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) 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 dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 50 °C por um minuto e extensão a 72 °C por um minuto, seguidos de extensão final a 72 °C por seis minutos (PENIDO, 2013).

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5 % em tampão TBE 0,5 % a 80 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) (PENIDO, 2013).

#### 4.6.2.3 Amplificação do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA para reação de sequenciamento

Conforme descrito por Lachance *et al.* (1999), um isolado de cada perfil molecular obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen, EUA), 3 µL de MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (MBI Fermentas), 1 µL do iniciador NL1 10 µmol<sup>-1</sup> (Invitrogen, EUA), 1 µL do iniciador NL4 10 µmol<sup>-1</sup> (Invitrogen, EUA) 0,2 µL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) e 1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 µL. A reação foi realizada no termociclador Eppendorf (Mastercycler® pro) com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por dois minutos, trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento a 54 °C por 25 segundos e extensão a 72 °C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72 °C por 10 minutos (PENIDO, 2013).



Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1 % em tampão TBE 0,5 % a 120 V para a visualização das bandas. Os géis foram corados com solução de GelRed™ (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França) (PENIDO, 2013).

#### **4.6.2.4 Purificação dos amplicons**

A purificação dos amplicons foi realizada como no item 4.5.5.

#### **6.5.2.5 Reação de sequenciamento**

A reação de sequenciamento foi realizada como no item 4.5.6.

### **4.7 Detecção dos genes codificadores das enterotoxinas e de fatores de virulência dos isolados de *B. cereus***

A pesquisa de detecção dos genes foram realizadas na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sediado no Rio de Janeiro. Os ensaios de PCR foram efetuados em um termociclador (AppliedBiosystem® GeneAMP® PCR System 9700). Para as reações de PCR, foram utilizadas linhagens de espécies *B. cereus s.s* (LFB-FIOCRUZ 406) como controle positivo e como controle negativo foi utilizada água livre de DNase/RNase (MASCARENHAS, 2018). Em seguida foram realizadas as etapas de extração de DNA através de lise térmica, utilizando o Kit INSTAGENMATRIX da BIO-RAD®, seguindo as instruções do fabricante. Amplificação dos genes codificadores da enterotoxina não-hemolítica (*nheAe nheB*), por reação de PCR, segundo metodologia descrita por Guinebretiere *et al.* (2010). Amplificação simultânea dos genes codificadores da hemolisina BL (*hblA, hblCe hblD*) e toxina emética(*ces*), utilizando a PCR-multiplex, de acordo com a metodologia descrita por Yang *et al.* (2005). Para a amplificação dos genes codificadores da citotoxina K (*cytK-1 e cytK2*) foi utilizado a PCR duplex conforme metodologia descrita por Guinebretiere *et al.* (2006). Amplificação de genes codificadores de hemolisinas (*hlyII e hlyIII*) e fosfolipases C (*piplc, pcplc e sph*), a reação de PCR foi utilizada de acordo com Hendriksen *et al.* (2006). E para detecção da cereolisina O (*clo*) foi utilizada uma reação de PCR de acordo com Martinez-Blanch *et al.* (2009). (MASCARENHAS, 2018).

## **4.8 Análises físico-químicas**

### **4.8.1 Determinação de pH**

A determinação dos valores de pH em todas as amostras foi realizada por leitura direta em potenciômetro modelo MPA210 (MS Tecnopon, Brasil), previamente calibrado com as soluções tampões pH 7,0 e pH 4,0 (ZENECON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

### **4.8.2 Determinação de acidez total titulável**

A acidez expressa em porcentagem de ácido láctico foi determinada pelo método de titulação com solução de NaOH 0,1 N (P.A, Dinâmica) padronizada usando como indicador a solução de fenolftaleína a 1% (P.A-ACS, Êxodo Científica) (BRASIL, 2006).

### **4.8.3 Análise de umidade e sólidos totais**

A análise de umidade e sólidos totais foi determinada através de pesagem das amostras em cápsulas e em seguida foi realizada a secagem direta das amostras em estufa a 105 °C até peso constante (ZENECON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

### **4.8.4 Análise de cinzas**

A análise de cinzas foi realizada através da pesagem das amostras em cadinhos de porcelana e incinerados em mufla a 500 °C até a obtenção de um resíduo branco (ZENECON; PASCUET; TIGLEA, 2008).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Coleta e isolamento de micro-organismos

Das amostras de tucupi que foram coletadas em Belém (PA), foi possível acompanhar duas produções (produção 1 e produção 2), em um processo de produção, foram coletadas a massa de mandioca, manípueira, amostra em fermentação e produto final, e outro processo de produção onde foi possível coletar a massa de mandioca, manípueira e amostras em fermentação, mas não o produto final. As amostras codificadas como T5, T6, T7 e T8 correspondem a um mesmo lote de produção, assim como B1, B2, B3, B4 e B5. As amostras foram coletadas em tempos distintos de fermentação que variam em torno de 24 horas. As outras amostras obtidas foram do produto final coletadas no comércio de Belém (PA) e Belo Horizonte (MG).

Das 18 amostras obtidas durante o processo de produção de tucupi e do produto final foi possível isolar bactérias lácticas e leveduras. As bactérias lácticas estavam presentes em todas as amostras atingindo níveis populacionais que variaram de 1,80 log<sub>10</sub> a 7,25 log<sub>10</sub>/mL. As leveduras também foram encontradas em todas as amostras, exceto na amostra codificada como A3, com contagens atingindo níveis populacionais variando de 1,78 log<sub>10</sub>/mL a 8,11 log<sub>10</sub>/mL (Tabela 1). As contagens de bactérias lácticas foram ligeiramente maiores em relação às contagens de leveduras em todas as amostras analisadas, com exceção da amostra B1, sugerindo um maior envolvimento das bactérias lácticas em relação as leveduras, na fermentação de mandioca para produção de tucupi, embora contagens significativas de leveduras também foram encontradas. NOUT (1991 *apud* Lacerda, 2006, p. 15) sugeriu que devido ao ambiente ácido criado pelas BAL é favorecido a proliferação de leveduras em alimentos; e simultaneamente, o crescimento das bactérias é estimulado pela presença de leveduras, as quais fornecem fatores de crescimento, tais como, vitaminas e compostos nitrogenados para as bactérias.

Muitos autores relatam a predominância das BAL na fermentação de mandioca (LACERDA, *et al.*, 2005; ALMEIDA; RACHID; SCHWAN, 2007; CRISPIM *et al.*, 2013; PENIDO, 2013). Miguel *et al.* (2015) em um estudo da descrição sobre a microbiota do caxiri, uma bebida alcoólica obtida da fermentação da mandioca, observou a predominância das BAL durante a

fermentação, com contagens de  $5,6 \log \text{UFC mL}^{-1}$  no início da fermentação e  $4,1 \log \text{UFC mL}^{-1}$  no final do processo fermentativo.

**Tabela 1: Contagens das bactérias lácticas e leveduras ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) em amostras obtidas do processo de produção de tucupi e produto final**

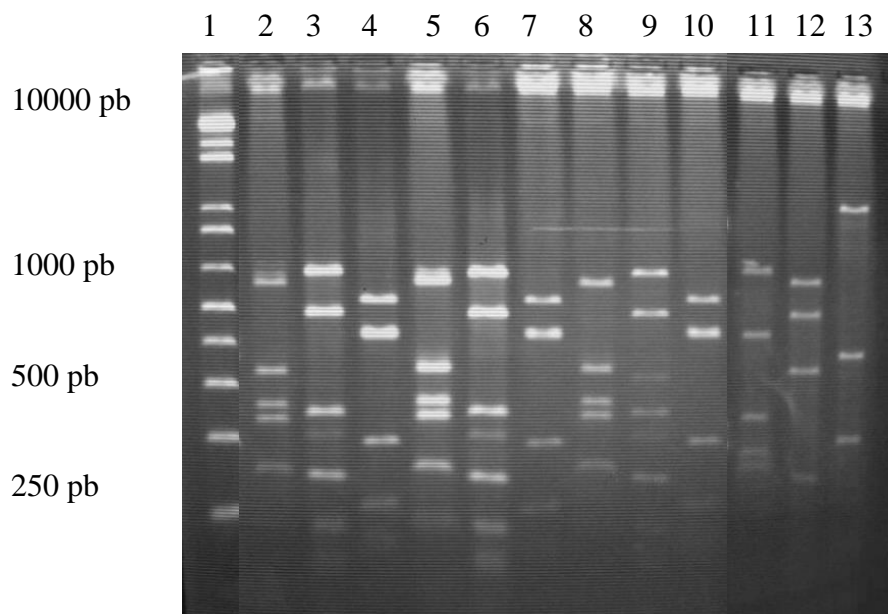
Amostras	Bactérias lácticas	Leveduras
A1	5,47	4,87
A2	5,47	3,86
A3	1,80	---
A4	4,20	3,0
T1	4,52	3,87
T2	4,61	2,84
T3	5,47	3,04
T4	4,77	4,0
T5	4,40	3,0
T6	4,08	3,0
T7	4,11	2,15
T8	4,17	3,30
T9	5,34	1,84
B1	6,86	8,11
B2	7,25	6,20
B3	7,20	7,18
B4	5,67	3
B5	4,90	3,53

A1 (tucupi produto final); A2 (tucupi produto final); A3 (tucupi produto final); A4 (tucupi produto final); T1 (tucupi produto final com pimenta malagueta e pimenta de cheiro); T2 (tucupi produto final com pimenta de cheiro); T3 (tucupi cru); T4 (massa de mandioca amarela); T5 (massa de mandioca amarela moída - produção 1); T6 (1° fermentação (manipueira) - produção 1); T7 (2° fermentação - produção 1); T8 (3° fermentação - produção 1); T9 (tucupi puro - fermentado, antes de realizar cocção); B1 (1° fermentação (manipueira) - produção 2); B2 (2° fermentação - produção 2); B3 (3° fermentação - produção 2); B4 (tucupi produto final cozido com tempero - jambu, chicória, alfavaca, alho e sal - produção 2); B5 (tucupi produto final cozido sem tempero - produção 2).

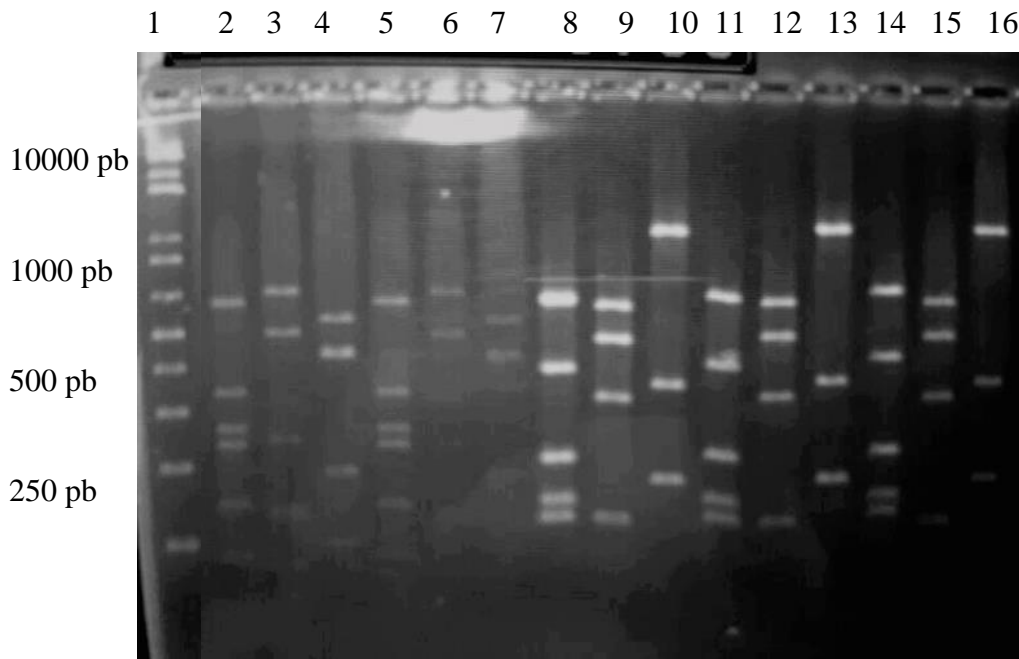
### 5.1.1 Isolamento e identificação molecular de bactérias lácticas durante a produção de Tucupi

De todas as amostras de tucupi analisadas, foram obtidos 55 isolados de bactérias lácticas. No entanto, 11 isolados perderam a viabilidade durante as condições de preservação e 14 isolados não foi possível verificar a visualização de bandas após a extração de DNA. A análise microscópica dos 30 isolados restantes revelou a predominância de bacilos, com 93,3% do isolados e 6,7% como cocos, Gram positivos e catalase negativa. Estas características preliminares são sugestivas de bactérias lácticas. Desta forma, foi realizada a identificação molecular destes isolados por meio da análise do perfil de restrição, obtido por digestão com enzimas de restrição (*HinfI*, *HaeIII* e *MspI*) da região intergênica 16S-23S do DNA ribossomal e discriminou 3 espécies de BAL. As espécies encontradas foram *Lactobacillus fermentum* (50%), *Lactobacillus plantarum* (39,3%) e *Lactobacillus acidophilus* (7,14%) (Figuras 4 e 5).

**Figura 4: Perfil de digestão de espécies de *Lactobacillus* spp. isolados do tucupi.**  
**Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-10: *Lactobacillus fermentum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*); 11-13: *Lactobacillus plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*).**



**Figura 5: Perfil de digestão de espécies de *Lactobacillus* spp. isolados do tucupi.**  
**Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-7: *Lactobacillus acidophilus* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*); 8-16: *Lactobacillus plantarum* (*MspI*, *HaeIII*, *HinfI*).**



Para alguns isolados de BAL não foi possível a identificação molecular por RFLP, e desta forma foram submetidos ao sequenciamento da região 16S do gene de rRNA. A partir do sequenciamento foi possível identificar as espécies *L. parabuchneri* (3,6 %) e *L. fermentum*.

Foi possível observar que para as amostras obtidas durante a produção de tucupi da Produção 1, somente duas espécies foram encontradas, *L. plantarum* isolado na massa de mandioca e somente em uma amostra em fermentação (1° fermentação = manipueira), seguido por *L. fermentum* isolado somente em uma amostra em fermentação (2° fermentação). E para as amostras obtidas do processamento de tucupi da Produção 2, foi possível observar uma frequência maior de *L. fermentum* que foi isolado em todas as amostras em fermentação coletadas durante o processamento e no produto final, não sendo encontrado somente na massa de mandioca desta produção. Outras duas espécies foram isoladas, porém em menor frequência, como *L. acidophilus* e *L. parabuchneri*, isolados em uma amostra em fermentação e produto final, respectivamente. Nesta produção não foi encontrado a espécie *L. plantarum* (Tabela 2).

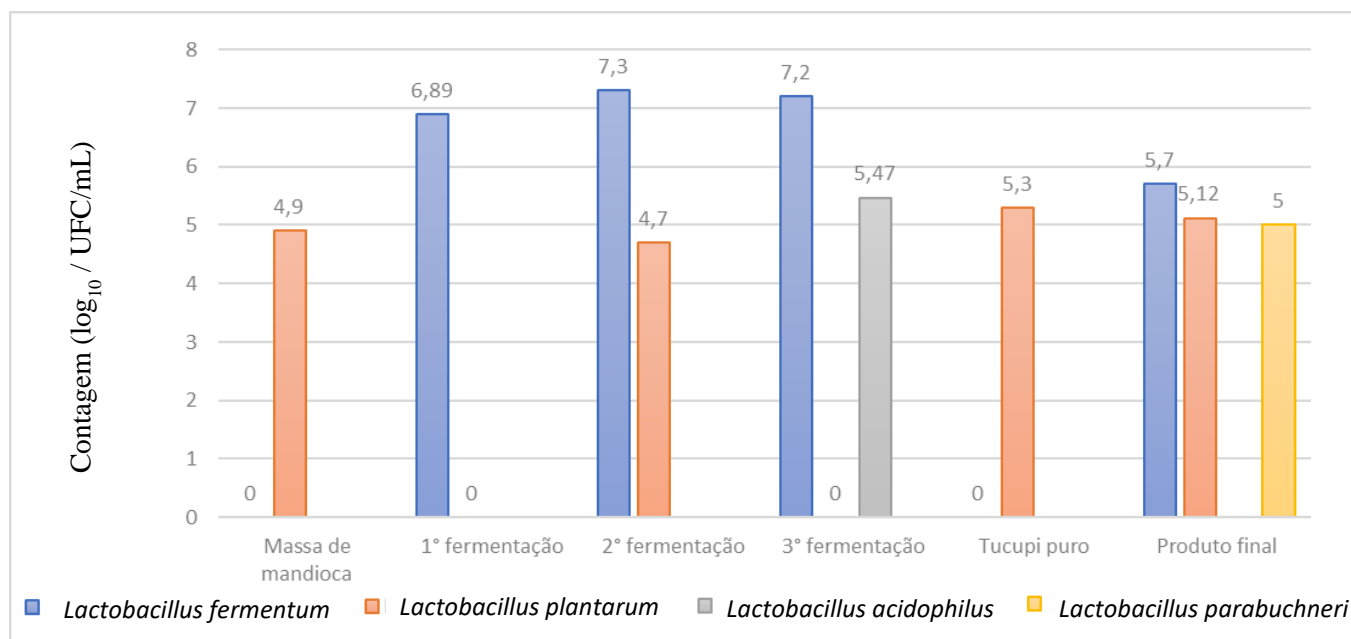
**Tabela 2: Contagens populacionais ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) das espécies de BAL isoladas durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi**

Espécies	Massa de mandioca	Amostras em Fermentação			Produto final
		1°	2°	3°	
Produção 1					
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	4,7	-	-	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,0 - 4,9	-	4,7 – 5,5	-	
Produção 2					
<i>Lactobacillus fermentum</i>	-	5,47 – 6,9	7,3	5,4 – 7,2	4,3 – 5,7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-	5,47	-
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	-	-	-	-	8,0

Produção 1 (amostras T5 a T8); produção 2 (amostras B1 a B5); 1° fermentação (tempo 0); 2° fermentação (0 – 6 horas); 3° fermentação (9 – 25 horas).

No presente estudo, em relação às contagens das espécies de BAL, *L. plantarum* foi isolado em cinco amostras, apresentando contagens que variaram de 3,00 a 5,50  $\log_{10}/\text{mL}$ ; *L. fermentum* foram encontrados em oito amostras com contagens de 4,3 a 7,3  $\log_{10}/\text{mL}$ . As espécies de *L. acidophilus* e *L. parabuchneri* foram encontradas em uma amostra, na 3° fermentação e no produto final (produção 2), respectivamente, com contagens de 5,47  $\log_{10}/\text{mL}$  para *L. acidophilus* e 8,00  $\log_{10}/\text{mL}$  para *L. parabuchneri*. Pode-se sugerir que *L. fermentum* é a espécie mais isolada na produção de tucupi, seguido por *L. plantarum* (Gráfico 1).

**Gráfico 1: Distribuição das espécies de BAL ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) isoladas da fermentação de mandioca para produção de tucupi**



Penido *et al.* (2018) em um estudo com o objetivo de selecionar as culturas iniciadoras com as características adequadas para a produção de polvilho azedo durante processo de fermentação em escala piloto, identificaram as espécies de *Lactobacillus brevis*, que representou o maior número de isolados (21,5 %), seguido de *Enterococcus faecium* (16,5 %), *Lactobacillus fermentum* (15,2 %) e *Lactobacillus plantarum* (13,9 %). Lacerda (2006) em um estudo sobre a microbiota encontrada durante a fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo em Conceição dos Ouros-MG, identificou espécies de BAL como predominantes pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. As espécies encontradas foram: *L. plantarum* (68,8 %), *L. fermentum* (11,7 %), *L. delbruecki* subsp. *delbruecki* (6,8 %), *L. hilgardi* (4,9 %), *L. confusus* (4,9 %) e *L. amylophilus* (2,9 %). Estes resultados acima estão de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, onde as espécies mais envolvidas em fermentação de mandioca para diferentes produtos, são *L. fermentum* e *L. plantarum*.

Coulin *et al.* (2006) identificaram as espécies de BAL predominantes durante a fermentação da mandioca para produção de attiéké, um produto africano, consumido largamente em Côte d'Ivoire. Foram identificadas as espécies de *Lactobacillus buchneri* ( $1,0 \times 10^8$  UFC/g), *L. brevis* ( $1,0 \times 10^8$  UFC/g), *L. bifementans* ( $2,8 \times 10^5$  UFC/g), *L. confusus* ( $1,3 \times 10^8$  UFC/g), *L.*



*delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ( $2,1 \times 10^8$  UFC/g), *L. salivarius* ( $2,6 \times 10^8$  UFC/g), *L. amylovorus* ( $2,6 \times 10^7$  UFC/g), *L. jenseni* ( $5,2 \times 10^7$  UFC/g) e *L. plantarum* ( $5,2 \times 10^7$  UFC/g).

Trabalhos envolvendo fermentação de mandioca para elaboração de produtos fermentados tradicionais africanos como lafun, gari, fufu, *akyeke*, *attiéké*, tem demonstrado a ocorrência da predominância de BAL. Padonou *et al.* (2009) encontrou no processo de fermentação do lafun, a predominância de *Lactobacillus plantarum* (30 %) e *Lactobacillus fermentum* (42 %), além de *Weissella confusa* (18 %). Oyewole & Odunfa (1990) identificou as espécies de *Lactobacillus plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. brevis*, *L. coprophilus*, *L. delbrueckii* spp. *lactis*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis*, após estudo da microbiota da fermentação da mandioca para produção do ‘fufu’.

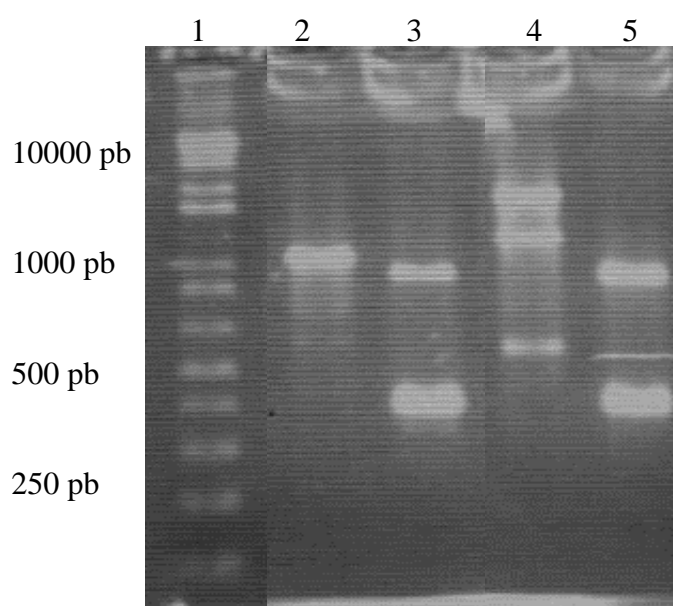
Santos *et al.* (2012) em estudo da identificação da microbiota do caxiri produzido pelo povo Juruna (Yudjá) em Mato Grosso, encontrou nas primeiras horas de fermentação a espécie de *Lactobacillus plantarum*. Na identificação da microbiota do cauim, Almeida; Rachid; Schwan (2007), encontraram que *Lactobacillus* foi a mais o gênero mais frequente, incluindo as espécies de *L. pentosus* e *L. plantarum*. Crispim *et al.* (2013) identificou as espécies de *Lactobacillus* predominantes na fermentação de mandioca para produção de puba: *L. fermentum* (7,23 – 8,73  $\log_{10}$  UFC/g), *L. plantarum* (7,23 – 8,09  $\log_{10}$  UFC/g), *L. brevis* (7,18 – 8,59  $\log_{10}$  UFC/g), *L. casei* (7,18 – 7,97  $\log_{10}$  UFC/g), *L. delbrueckii* (7,66 – 8,59  $\log_{10}$  UFC/g), *L. gasseri* e *L. reuteri* (7,18 - 8,09  $\log_{10}$  UFC/g), *L. paraplantarum* (7,23 – 8,15  $\log_{10}$  UFC/g), *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris* e *L. pseudomesenteroides* (7,84  $\log_{10}$  UFC/g)

### 5.1.2 Isolamento e identificação de leveduras

De todas as amostras de tucupi analisadas, foram obtidos 75 isolados de leveduras. No entanto, 14 isolados perderam a viabilidade durante as condições de preservação e 21 espécies não foram possíveis visualizar a amplificação de bandas após a realização de PCR *fingerprinting*. A identificação molecular dos 40 isolados de leveduras destas amostras foi realizada por meio da análise de perfis moleculares obtidos por PCR *fingerprinting* GTG<sub>5</sub> e discriminou quatro espécies. As espécies encontradas foram *Yarrowia lipolytica* (28,2 %), *Candida ethanolica* (20,5 %), *Pichia scutulata* (15,4 %) e *Candida humilis* (2,6 %) (Figura 6).

Para alguns isolados de leveduras não foi possível a identificação molecular por PCR *fingerprinting* GTG<sub>5</sub> e desta forma foram submetidos ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene de rRNA. A partir do sequenciamento foi possível identificar as espécies *Candida tropicalis* (17,95 %), *Pichia exigua* (2,6 %) e *Wickerhamomyces anomalus* (2,6 %).

**Figura 6: Perfil de PCR *fingerprinting* de leveduras isoladas da fermentação de mandioca para produção de tucupi em Belém (PA). Canaleta 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2: *Candida humilis*; 3 e 5: *Yarrowia lipolytica*; 4: *Pichia scutulata***



Foi possível observar que para as amostras obtidas durante a produção de tucupi da Produção 1, foram encontradas as espécies de *Candida ethanolica* (2° e 3° etapas da fermentação) e a espécie de *Yarrowia lipolytica* (1° e 3° etapas de fermentação). E para as amostras obtidas do processamento de tucupi da Produção 2, foi possível observar a espécie de *C. ethanolica* também na 2° etapa da fermentação e *Y. lipolytica*, além de ter sido identificada na 1° etapa de fermentação, a espécie foi observada no produto final. *C. tropicalis* foi observada na 3° etapa de fermentação e *C. tropicalis*, no produto final. Outra espécie isolada em menor frequência, foi *Pichia exigua*, onde foi observada apenas no produto final. *Pichia scutulata* foi identificada na 1° etapa da fermentação (manipueira) e no produto final. *C. ethanolica* e *Y. lipolytica* foram isoladas nas duas produções de tucupi acompanhadas neste estudo. E é possível observar uma maior diversidade de leveduras na nas amostras referentes a produção 2 (Tabela 3).

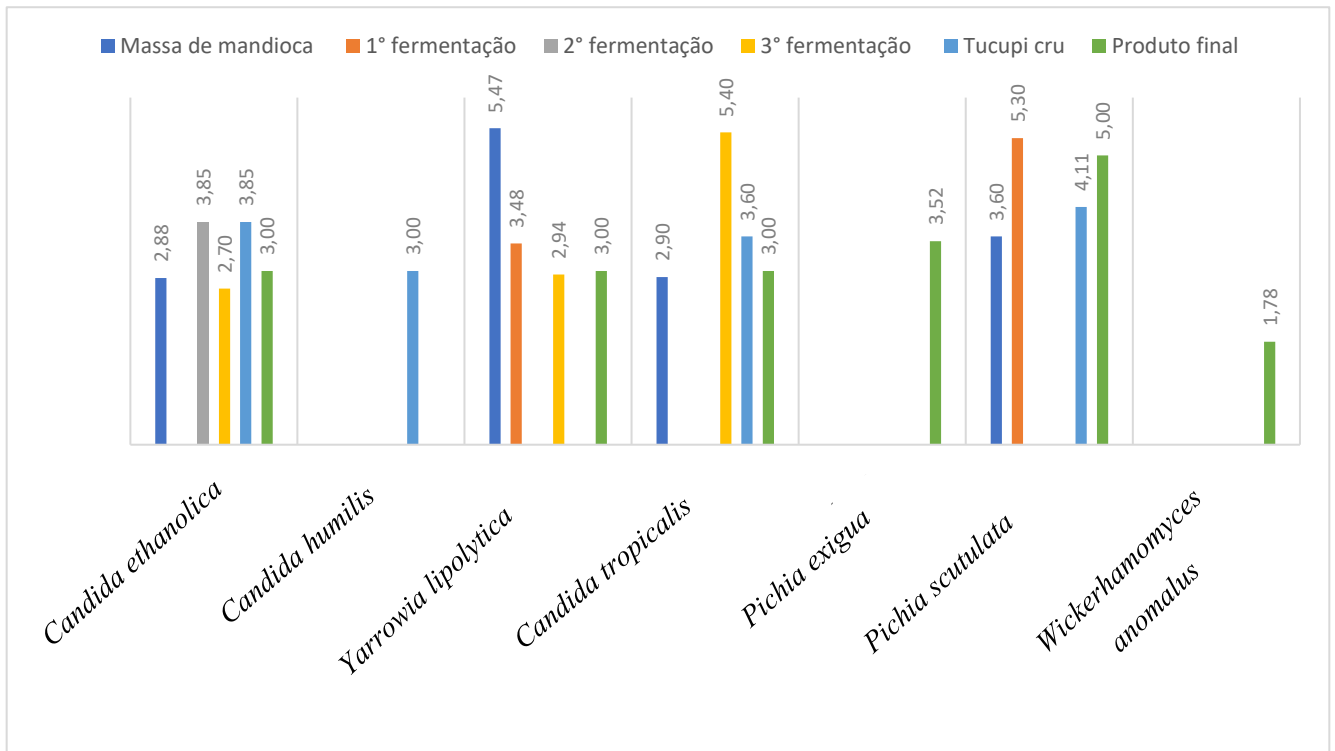
**Tabela 3: Contagens populacionais ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) das espécies de leveduras isoladas da fermentação de mandioca, para produção de tucupi**

Espécies	Massa de mandioca	Amostras em Fermentação			Produto final
		1°	2°	3°	
Produção 1					
<i>Candida ethanolica</i>	-	-	2,97	2,70	
<i>Yarrowia lipolytica</i>		2,49	-	2,94	
Produção 2					
<i>Candida ethanolica</i>	-	-	3,85	-	-
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	3,48	-	-	3,00
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	-	5,40	3,00
<i>Pichia exigua</i>	-	-	-	-	3,52
<i>Pichia scutulata</i>	-	5,30	-	-	5,00

Produção 1 (amostras T5 a T8); produção 2 (amostras B1 a B5); 1° fermentação (tempo 0); 2° fermentação (0 – 6 horas); 3° fermentação (9 – 25 horas).

No presente estudo, em relação as contagens das espécies de leveduras, *C. ethanolica* e *Yarrowia lipolytica* foram isoladas em oito amostras, apresentando contagens que variaram de 2,70 a 3,85  $\log_{10}/\text{mL}$  e 2,49 a 3,48  $\log_{10}/\text{mL}$ , respectivamente; *Candida humilis* foi encontrada apenas em uma amostra (tucupi puro – T9) com contagem de 3,0  $\log_{10}/\text{mL}$  e *Wickerhamomyces anomalus*, no produto final (1,78  $\log_{10}/\text{mL}$ ). *Candida tropicalis* além de ser isolada na 3° etapa da fermentação e produto final, também foi encontrada na massa de mandioca (2,90  $\log_{10}/\text{mL}$ ) e no tucupi cru (3,60  $\log_{10}/\text{mL}$ ). *Pichia scutulata* estava presente na massa de mandioca e no tucupi cru (3,60  $\log_{10}/\text{mL}$  e 4,11  $\log_{10}/\text{mL}$ , respectivamente) (Gráfico 2).

**Gráfico 2: Distribuição das espécies de leveduras ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) isoladas da fermentação de mandioca para produção de tucupi**



Penido *et al.* (2018), após a identificação da microbiota associada ao processo fermentativo da mandioca para produção de polvilho azedo, encontraram as espécies de *Candida ethanolica*, *Candida humilis*, *Geotrichum fragans*, *Kazachstania exiguae* *Pichia scutulata*. A espécie *P. scutulata* representou o maior número de isolados (52,2 %), seguida de *K. exigua* (17,4 %), *C. humilis* (13,0 %), *G. fragans* (13,0 %) e *C. ethanolica* (4,4 %). Lacerda (2002), em estudo sobre a microbiota presente durante a fermentação da mandioca para produção de polvilho azedo, encontrou as seguintes espécies: *Candida cylindracea* ( $10^4$  UFC/g), *Candida ethanolica*-similar ( $10^3$  UFC/g), *Candida rugosa* ( $10^3$  UFC/g), *Candida tropicalis* ( $10^5$  UFC/g), *Galactomyces geothricum* ( $10^2 - 10^5$  UFC/g), *Issatchenkia scutulata* var. *exigua*-similar ( $10^4 - 10^5$  UFC/g), *Issatchenkia terricola* ( $10^4$  UFC/g), *Klyveromyces lactis* ( $10^4$  UFC/g), *Pichia membranifaciens* ( $10^3$  UFC/g) e *Saccharomyces exiguus* ( $10^3$  UFC/g). Os resultados encontrados no presente estudo estão semelhantes ao de Penido *et al.* (2018), onde também foram encontradas as espécies de *Candida ethanolica*, *Candida humilis* e *Pichia scutulata*. De acordo também ao trabalho de Lacerda (2002), onde *Candida tropicalis* também foi uma espécie isolada.

Schwan *et al.* (2007) realizaram um estudo sobre as espécies de leveduras na fermentação de um mix de mandioca e arroz para produção de cauim produzidos pelos indígenas Tapirapé. As espécies encontradas foram: *Candida tropicalis*, *Pichia guilliermondii*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Trichosporon asahii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Exophila dermatidis*. *C. tropicalis* foi a espécie mais comum isolada, representando 26 % do total de isolados, seguidas por *P. guilliermondii* (22 %), *C. intermedia* (17 %), *T. asahii* (11 %), *S. cerevisiae* (11 %) e *C. parapsilosis* (11 %). Santos *et al.* (2012) após caracterização da microbiota do caxiri encontraram que a população de leveduras após 24 horas de fermentação foi composta por *S. cerevisiae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Após 48 horas e até o final da fermentação (72 horas) a espécie dominante foi *S. cerevisiae*, *Pichia guilliermondii* e *Pichia membranifaciens*.

Oyewole (2001), identificou as espécies de *Candida krusei* ( $1,1 \times 10^8$  UFC/g), *Candida tropicalis* ( $1,1 \times 10^8$  UFC/g), *Pichia saitoi* ( $1,3 \times 10^6$  UFC/g), *S. cerevisiae* ( $1,8 \times 10^6$  UFC/g), *Pichia anomala* ( $1,5 \times 10^5$  UFC/g) e *Zygosaccharomyces bailii* ( $1,1 \times 10^8$  UFC/g), em um estudo sobre a presença de leveduras envolvidas na fermentação da mandioca para produção de 'fufu'. Padonou *et al.* (2009), identificaram as seguintes espécies após o processo de fermentação do lafun: 22 % dos isolados pertenciam a espécie de *Saccharomyces cerevisiae*, seguidos de *Pichia scutulata* (20 %), *Kluyveromyces marxianus* (18 %), *Hansenias poraguilliermondii* (12 %), *Pichia rhodanensis* e *Candida glabrata*, que representaram 8 % dos isolados. *Candida tropicalis* e *Trichosporon asahii* foram as espécies encontradas com menor incidência (< 5 %).

## 5.2 Avaliação dos parâmetros físico-químicos

Os resultados referentes às análises de pH, acidez total titulável, sólidos totais e cinzas das amostras de tucupi em fermentação e produto final obtidas durante neste estudo estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4: Parâmetros físico-químicos das amostras do tucupi obtidas durante o processamento de tucupi e produto final**

Amostras	pH	ATT %	Acidez expressa em ácido láctico (g/mL)	Sólidos totais (%)	Cinzas
A1	4,04 ± 0,04 <sup>de</sup>	1,93 ± 0,12 <sup>bc</sup>	0,5	1,601	0,22
A2	3,65 ± 0,06 <sup>f</sup>	2,97 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,8	4,556	1,10
A3	4,21 ± 0,04 <sup>abc</sup>	2,00 ± 0,06 <sup>de</sup>	0,4	3,564	0,74
A4	4,10 ± 0,03 <sup>cd</sup>	2,00 ± 0,00 <sup>bc</sup>	0,6	4,709	2,00
T1	3,10 ± 0,04 <sup>h</sup>	2,17 ± 0,58 <sup>b</sup>	0,9	5,772	1,72
T2	3,15 ± 0,04 <sup>h</sup>	2,10 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,9	5,863	1,72
T3	3,75 ± 0,05 <sup>f</sup>	1,53 ± 0,06 <sup>cd</sup>	0,4	1,239	-
T4	4,22 ± 0,04 <sup>abc</sup>	0,73 ± 0,12 <sup>f</sup>	1,1	-	-
T5	4,31 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,12 <sup>ef</sup>	0,8	-	-
T6	4,12 ± 0,05 <sup>cd</sup>	0,40 ± 0,00 <sup>g</sup>	0,2	0,403	--
T7	4,29 ± 0,05 <sup>ab</sup>	0,27 ± 0,06 <sup>g</sup>	0,2	0,030	-
T8	4,04 ± 0,05 <sup>d</sup>	0,57 ± 0,06 <sup>fg</sup>	0,2	0,446	-
T9	4,17 ± 0,06 <sup>bcd</sup>	2,30 ± 0,00 <sup>b</sup>	1,0	10,557	0,39
B1	3,75 ± 0,06 <sup>f</sup>	-	-	6,442	-
B2	3,68 ± 0,04 <sup>f</sup>	0,33 ± 0,06 <sup>g</sup>	0,3	6,783	-
B3	3,67 ± 0,05 <sup>f</sup>	0,67 ± 0,06 <sup>fg</sup>	0,6	15,123	-
B4	3,42 ± 0,06 <sup>g</sup>	0,50 ± 0,10 <sup>fg</sup>	0,4	1,744	-
B5	3,91 ± 0,03 <sup>e</sup>	0,33 ± 0,12 <sup>g</sup>	0,3	9,792	-

Resultados são média ± desvio-padrão. Médias seguidas pela mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ). A1 (tucupi produto final); A2 (tucupi produto final); A3 (tucupi produto final); A4 (tucupi produto final); T1 (tucupi produto final com pimenta malagueta e pimenta de cheiro); T2 (tucupi produto final com pimenta de cheiro); T3 (tucupi cru); T4 (massa de mandioca amarela); T5 (massa de mandioca amarela moída - produção 1); T6 (1° fermentação (manipueira) - produção 1); T7 (2° fermentação - produção 1); T8 (3° fermentação - produção 1); T9 (tucupi puro - fermentado, antes de realizar cocção); B1 (1° fermentação

(manipueira) - produção 2); B2 (2° fermentação - produção 2); B3 (3° fermentação - produção 2); B4 (tucupi produto final cozido com tempero - jambu, chicória, alfavaca, alho e sal - produção 2); B5 (tucupi produto final cozido sem tempero - produção 2).

Os valores de pH variaram entre 3,10 a 4,29, classificando o tucupi como um alimento de baixo pH e alta acidez. Para acidez total titulável observou variação entre 0,2 g a 1,1 g de ácido láctico / 100 mL. De acordo com a Instrução Normativa Adepará n° 1 de 2008, o tucupi deve apresentar pH entre 3,5 a 4,3; acidez total variando de 0,1 g a 0,8 g de ácido láctico / 100 mL; sólidos totais (g/100g) 2,5 a 6,5, e cinzas de no mínimo de 3,912 g/L. Observou-se que os resultados encontrados não estão de acordo com a Instrução Normativa. As amostras T1, T2 e T5 não apresentam pH na faixa estabelecida; as amostras T1, T2, T4 e T9 não estão de acordo com o estabelecido para acidez total titulável, estando acima do estabelecido pela legislação vigente; os resultados das amostras A1, T3, T6, T7, T8, T9, B2, B3, B4 e B5 não estão de acordo com o estabelecido para sólidos totais, que variaram de 0,030 a 15,123 g/100 mL, sendo que somente as amostras A1, B4 e B5 correspondem ao produto final. Em relação aos resultados de cinzas, nenhuma amostra está de acordo com o estabelecido.

No estudo realizado, as amostras de tucupi comercial apresentaram valores de pH variando entre 3,10 a 4,21 (A1, A2, A3, A4, T1, T2, B4 e B5) e para acidez total titulável valores de 0,4 a 0,8 g de ácido láctico / 100 mL. Campos *et al.* (2016) ao avaliarem as características físico-químicas do tucupi comercial na cidade de Belém, encontraram valores semelhantes de pH e acidez titulável. Para pH encontraram valores variando entre 2,80 a 4,26 e acidez titulável de 0,3 g a 1,6 g de ácido láctico / 100 mL.

Em estudo posterior, Campos *et al.* (2017) determinou as características físico-químicas durante as etapas de processamento de tucupi em dois estabelecimentos (X e Y) na cidade de Belém, PA. Os valores de pH para as amostras dos dois estabelecimentos foi de 3,28 a 3,98, onde somente as amostras do estabelecimento Y estão de acordo com legislação. Para a acidez total titulável, observou-se aumento significativo durante as etapas de processamento, mas quando se compara as amostras dos dois estabelecimentos entre si, verifica-se que o estabelecimento Y, possui um tempo maior de fermentação (8-12 horas), e com isso apresentou um produto final com maior acidez (0,8 g de ácido láctico / 100 mL); o estabelecimento X, a amostra apresenta um menor tempo de fermentação (6-8 horas), resultando em um menor valor de acidez no produto final (0,6 g de ácido láctico / 100 mL).

Campos; Carvalho; Mattietto (2016) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar o efeito dos tempos de fermentação e cocção da maniveira nas características físico-químicas do tucupi. O trabalho foi dividido em 2 experimentos. Em relação ao pH, no experimento 1 houve uma diminuição significativa quando se aumenta o tempo de fermentação, reduzindo de 5,16 (tempo 0) para 3,36 (72 horas) e após a cocção de 30 minutos após 72 horas de fermentação, também observou uma diminuição do pH, apresentando um valor menor (3,26). Em relação a acidez titulável ocorreu um aumento, de 1,42 meq NaOH / 100mL (tempo 0) para 14,03 meq NaOH/100mL (72 horas de fermentação e 30 minutos de cocção). No experimento 2, houve uma redução no pH para as amostras no tempo 0 (6,38) e após 24 horas de fermentação e 20 minutos de cocção (3,94). Para acidez titulável observou um aumento, tempo 0 (0,30 meq NaOH / 100mL) e após 24 horas de fermentação (6,24 meq NaOH / 100mL). Os autores concluíram que de maneira geral, as amostras que foram fermentadas por 24 horas apresentam maiores teores de acidez titulável e menores valores de pH, e que quanto maior o tempo de cocção, maior o valor de acidez titulável, mas não existe diferença estatística em relação ao pH.

No presente estudo as amostras que fermentaram por um período de 24 horas também apresentaram características semelhantes ao estudo citado acima, onde os valores de pH foram menores em relação aos valores de acidez titulável. As amostras T1 e T2 não diferem estatisticamente entre si em relação ao pH e acidez titulável e as amostras B4 e B5 diferem entre si em relação a estatística nos valores de pH, mas não diferem em relação a acidez titulável.



### 5.3 Aspectos higiênico-sanitários

De acordo com a Instrução Normativa Adepará nº 01 de 2008, que preconiza norma de identidade, qualidade, acondicionamento e rotulagem do tucupi, além de exigências básicas para a construção e funcionamento de estabelecimentos produtores de tucupi, para fins de comercialização, são descritos também os padrões microbiológicos para o alimento. Desta forma, as contagens de coliformes termotolerantes para o tucupi devem ser NMP < 3/mL. O início do processo e durante a fermentação do tucupi foi verificado a presença de coliforme total e termotolerante (Tabela 5).

**Tabela 5: Determinação de coliformes totais e coliforme termotolerantes na produção de tucupi**

Amostra	Coliformes Totais	Coliformes Termotolerantes
T4	23 NMP/g	-
T5	500 NMP/g	4 NMP/g
T6	23 NMP/mL	-
T7	90 NMP/mL	-
T8	23 NMP/mL	-
T9	> 1.100 NMP/mL	7 NMP/mL

NMP (número mais provável); T4 (massa de mandioca amarela); T5 (massa de mandioca amarela moída - produção 1); T6 (1º fermentação (manipueira) - produção 1); T7 (2º fermentação - produção 1); T8 (3º fermentação - produção 1); T9 (tucupi puro - fermentado, antes de realizar cocção).

As amostras do produto final obtidas neste estudo foram negativas para coliformes totais e termotolerantes. Todas as amostras foram negativas para *Salmonella* spp. Lacerda (2002) encontrou duas amostras positivas para coliformes fecais no início do processo fermentativo para a produção de polvilho. Os valores encontrados foram 240 e 14 NMP/g de coliformes totais e 93 e 7 NMP/g de coliformes fecais. Entretanto, no decorrer do processo todas as amostras foram negativas para estes micro-organismos. Penido (2013) ao analisar a presença de coliformes termotolerantes no polvilho azedo, não encontrou coliformes termotolerantes. Para pesquisa de *Salmonella* spp, de acordo com a RDC 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), deve ter ausência em 25 mL ou g do produto. Todas as amostras analisadas por este autor foram negativas para este micro-organismo.

Das amostras de tucupi analisadas, foram obtidos 11 isolados sugestivos ao grupo *Bacillus cereus*. Após uma previa identificação convencional dos isolados, utilizando meio de cultura MYP, por meio das características das colônias (rosa com produção de lecitinase) (TALLENT *et al.*, 2012), os isolados foram submetidos a uma série de testes bioquímicos com o objetivo de identificar fenotipicamente *B. cereus*. Após a identificação fenotípica, foram considerados como *B. cereus* s.s, aqueles que demonstraram as seguintes características: catalase positivo, Gram positivo, produção lecitinase (halo típico em meio ágar MYP) e não utilização de manitol, fermentação anaeróbica de glicose, redução de nitrato, teste de VP (*Voges-Proskauer*) positivo, decomposição da tirosina e resistência à lisozima. Os resultados para a diferenciação de *B. cereus* s.s dos demais membros do grupo de *B. cereus*, foram: motilidade positivo, crescimento rizoidal negativo e forte atividade hemolítica. Para diferenciar *B. cereus* s.s. e *B. thuringiensis* foi realizada a prova para a detecção de cristais de toxina protéica, onde nenhuma linhagem testada produziu cristais de toxinas após esporulação (VOS *et al.*, 2009; MASCARENHAS, 2018). Os isolados de *B. cereus* s.s foram encontrados nas amostras T1, T2, T3, T7, T8, T9, B1, B2 e B5, com contagens que variaram de  $2,0 \times 10^2$  UFC/mL  $3,5 \times 10^4$  UFC/mL (Tabela 6).

**Tabela 6: Contagens ( $\log_{10}/\text{mL}$ ) de *Bacillus cereus* s.s em amostras de tucupi em fermentação e produto final**

<b>Amostra</b>	<b>Contagem</b>
T1	2,90
T2	4,58
T3	3,62
T7	3,72
T8	3,43
T9	2,60
B1	3,23
B2	3,26
B5	4,18

T1 (tucupi produto final com pimenta malagueta e pimenta de cheiro); T2 (tucupi produto final com pimenta de cheiro); T3 (tucupi cru); T7 (2° fermentação - produção 1); T8 (3° fermentação - produção 1); T9 (tucupi puro - fermentado, antes de realizar cocção); B1 (1° fermentação (manipueira) - produção 2); B2 (2° fermentação - produção 2); B5 (tucupi produto final cozido sem tempero - produção 2).

De acordo com a Instrução Normativa Adepará, nº 1 de 2008, as contagens para *B. cereus* devem ser menores que  $10^2$  UFC/mL para o produto final. Os resultados encontrados nas amostras T2, T3, T7, T8, B1, B2 e B5 não estão de acordo com o estabelecido pela Instrução Normativa. As amostras T3, T7(2), T8, B1 e B2 apresentaram contagens acima do permitido, contudo, essas contagens foram encontradas durante as etapas de processamento do tucupi. Já as amostras T1, T2 (C e D) e B5 são amostras de produto final do tucupi. O tucupi estudado é produzido em um estabelecimento de estrutura familiar, em um ambiente doméstico, não atendendo as exigências da legislação de uma unidade de produção ideal. Lacerda (2002), encontrou *Bacillus cereus* durante a fermentação de mandioca para produção de polvilho azedo, contagens de  $10^3$ – $10^4$  UFC/g de amostra. Na polvilharia A, as contagens de *B. cereus* foram baixas no início da fermentação, aumentaram a seguir, permanecendo constantes até o quadragésimo dia e diminuindo no final do processo. Entretanto, na polvilharia B, as contagens de *B. cereus* foram altas no início do processo, permanecendo constantes até o 14º dia de fermentação. Após este período, ocorreu um decréscimo nas contagens deste microrganismo, sendo que, no final do processo, não foi detectado (BRASIL, 2001).

Santos *et al.* (2012), caracterizaram a microbiota da fermentação da mandioca para produção de caxiri. As espécies de *Bacillus* spp. apareceram nas primeiras 24 horas de fermentação, entre elas: *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. simplex*. Após 48 horas de fermentação foi isolada a espécie de *B. megaterium* e após 72 horas, *B. amyloliquefaciens*. Santos *et al.* (2012) após a identificação da microbiota do caxiri produzido pelo povo Jurana (Yudjá) no Mato Grosso, encontrou isolados identificados como *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereuse* *B. thuringiensis*. Almeida; Rachid; Schwan (2007), identificaram as espécies de *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis* *B. circulans*, na fermentação da mandioca para produção da bebida cauim. *B. licheniformis* foi a espécie predominante durante a fermentação.

A virulência do *B. cereus* s.s. está atribuída à presença de vários genes que são relacionados com doenças gastrintestinais e somáticas. Esses genes codificam diferentes fatores de virulência extracelulares incluindo enterotoxinas, hemolisinas, fosfolipases, (CEUPPENS *et al.*, 2011). No presente estudo foi avaliada a ocorrência dos genes que codificam a enterotoxina não-hemolítica (*nheAB*), hemolisina BL (*hblA*, C e D), a citotoxina K (*cytK-1* e *cytK-2*) e a cereulida (*ces*) em 11 linhagens de *B. cereus* s.s isoladas das amostras do processamento do tucupi e do produto final. Todos os isolados (n=11, 100%) foram positivas para dois genes codificadores do complexo NHE. O gene *cytK-2* foi detectado em n = 9, 81,81 % amostras. Todas as linhagens

foram negativas para os genes *ces* e *cytK-1*. Os genes do complexo HBL (*hblA*, *hblC* e *hblD*) foram detectados em n = 8, 72,73 % amostras. O gene codificadores da hemolisina cereolisina O foi detectado em 100% das linhagens. O gene codificador da hemolisina II foi detectado em 1 (9,1 %) linhagem e o gene codificador da hemolisina III foi detectado em 8 (72,73 %) linhagens. Os genes codificadores das fosfolipases *Pi-plc*, *Pc-plc* e *sph* foram detectados em 8, 7 e 9 linhagens avaliadas, respectivamente (tabela 7). Não existe estudos que relatam sobre a presença de *B. cereus s.s.*, bem como seu potencial toxigênico em tucupi, seja em seu processamento ou produto final. Chaves, Pires e Vivoni (2011) em estudo envolvendo 97 estirpes isoladas de alimentos no Brasil nas décadas de 1980, 1990 e 2000, com objetivo de investigar perfis toxigênicos de *Bacillus cereus*, apresentou resultado similar, onde 84,5% das linhagens positivas para os genes do complexo *NHE*, 62,9% para os genes do complexo *HBL* e 45,4% para a variante *cytK-2*.

**Tabela 7: Resultados da reação de PCR para pesquisa de genes codificadores dos fatores de virulência nos isolados de *B. cereus s.s.***

Nº CCGB (LFB-FIOCRUZ)	<i>nheAB</i>	<i>hbl</i>	<i>cytK-1</i>	<i>CytK-2</i>	<i>ces</i>	<i>clo</i>	<i>HlyII</i>	<i>HlyIII</i>	<i>Pi-plc</i>	<i>Pc-plc</i>	<i>sph</i>
1789	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
1790	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
1791	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1792	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1793	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1794	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1795	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1796	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1799	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1800	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
1801	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+

+ resultado de PCR positivo; - resultado de PCR negativo

Em função da elevada presença de genes codificadores de fatores de virulência, essas linhagens de *B. cereus s.s.* isoladas de tucupi foram consideradas potencialmente patogênicas. Embora as contagens de *B. cereus s.s.* nessas amostras estejam abaixo da dose capaz de causar doença ( $10^5$  UFC/g), falhas na conservação desse alimento podem favorecer a multiplicação do micro-

organismo, colocando-o como um risco à saúde do consumidor (JAY, 2005; CEUPPENS *et al.*, 2011).

## 6 CONCLUSÕES

A fermentação de mandioca utilizada para a produção de tucupi possui uma microbiota constituída principalmente por bactérias lácticas e leveduras, que apresentam contagens populacionais significativas.

*L. fermentum* foi a espécie encontrada em maior frequência, sendo isolada durante todo o processo fermentativo de mandioca para produção de tucupi, inclusive no produto final evidenciado em uma das produções de tucupi (produção 1), seguida de *L. plantarum* que foi a segunda espécie mais isolada nas diferentes amostras obtidas neste trabalho.

*Yarrowia lipolytica* foi a espécie mais isolada durante a fermentação de mandioca para produção de tucupi, seguidas de *Candida ethanolica*, *Candida tropicalis*, *Pichia scutulata*, *Pichia exigua* e *Wickerhamomyces anomalus*.

*Bacillus cereus s.s* foi encontrado durante as etapas de produção do tucupi, e no produto final. As linhagens isoladas apresentaram potencial toxigênico, isto é preocupante, uma vez que algumas amostras ultrapassaram o limite permitido segundo a Instrução Normativa Adepará n° 1 de 2008. Desta forma, as condições higiênico-sanitárias estão insatisfatórias no que diz respeito à presença deste patógeno.

Os valores de pH e acidez encontrados classificam o tucupi como um alimento de baixo pH e alta acidez, o que normalmente é esperado neste tipo de fermentação. Em relação a análises de cinzas, nenhuma amostra está de acordo com o estabelecido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Euziclei G.; RACHID, Caio C.t.c.; SCHWAN, Rosane F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Brazilian Amerindians. *International Journal Of Food Microbiology*, Lavras, n. 120, p.146-151, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507004552>>. Acesso em: 17 jun. 2016.

ALMEIDA, Euziclei Gonzaga de. Caracterização físico-química e microbiológica de bebidas fermentadas produzidas pelos Índios Tapirapé. 2009. 132 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ALMEIDA, Katilayne Vieira de et al. Avaliação Físico-Química da Aguardente de Mandioca. In: CONGRESSO QUÍMICO DO BRASIL, 1., 2010, João Pessoa. S. I.: 2010. p. 1 - 4.

ALMEIDA, Paulo Fernando de. Processamento e caracterização da puba. 1992. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

AMARAL, Lucia do; JAIGOBIND, Allan George A.; JAISINGH, Sammay. Processamento da mandioca. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, 2007. 48 p.

APLEVICZ, Krischina Singer. Caracterização de produtos panificados à base de féculas de mandioca nativas e modificadas. 2006. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

APPLIED BIOSYSTEMS. BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit – Protocol. Rev. A. USA, 2002. 72 p.

AQUINO, Ana Carolina Moura de Sena; GERVIN, Vanessa Maria; AMANTE, Edna Regina. Avaliação do processo produtivo de polvilho azedo em indústrias de Santa Catarina. *Brazilian Journal Of Food Technology*, [s.l.], v. 19, p.1-8, 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.5515>.

AVANCINI, Sandra Regina Paulon. Caracterização química, microbiológica e toxicológica da água da fermentação do amido de mandioca. 2007. 103 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Agrárias, Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

BECHOFF, Aurélie et al. Carotenoid stability during storage of yellow gari made from biofortified cassava or with palm oil. *Journal Of Food Composition And Analysis*, [s.l.], v. 44, p.36-44, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2015.06.002>.

BEZERRA, Valéria Saldanha. Valor nutricional da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e transformações pós-colheita. Amapá: Embrapa Amapá, 2001. 18 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/web/mobile/publicacoes/-/publicacao/347527/valor-nutricional-da-mandioca-manihot-esculenta-crantz-e-transformacoes-pos-colheita>>. Acesso em: 02 out. 2017.

BRASIL. Constituição (1978). Resolução nº 12, de 24 de julho de 1978. Padrões de identidade e qualidade para os alimentos (e bebidas). Resolução Cnnpa. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/12\\_78.pdf](http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/resol/12_78.pdf)>. Acesso em: 02 nov. 2017.

BRASIL. Constituição (2008). Instrução Normativa nº 1, de 24 de junho de 2008. Padrão de Identidade e Qualidade do Tucupi para comercialização no Estado do Pará. Instrução Normativa Adepará. Disponível em: <[http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-1-2008-pa\\_147065.html](http://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-1-2008-pa_147065.html)>. Acesso em: 22 nov. 2017.

BRASIL. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Estabelecer os Padrões Microbiológicos Sanitários para Alimentos especificados no Anexo I e determinar os critérios para a Conclusão e Interpretação dos Resultados das Análises Microbiológicas de Alimentos Destinados ao Consumo Humano especificados no Anexo II. Resolução RDC. Brasil, Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)>. Acesso em: 13 dez. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria de Defesa Agropecuária. Métodos Analíticos Físico-Químicos para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Instrução Normativa 68, 12/12/06. Brasília: Ministério da Agricultura, 2006.



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.

CAMPOS, Ana Paula Rocha et al. Caracterização físico-química do tucupi durante as etapas de processamento. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 20 p.

CAMPOS, Ana Paula Rocha; CARVALHO, Ana Vânia; MATTIETTO, Rafaella de Andrade. Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor do cianeto durante o processamento de tucupi. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 23 p. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/amazonia-oriental/publicacoes>>. Acesso em: 10 out. 2017.

CARR, Frank J.; CHILL, Don; MAIDA, Nino. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews In Microbiology*, London, v. 28, n. 4, p.281-370, 2002.

CASSONI, Vanessa. Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (manipueira) por acetificação. 2008. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da Unesp, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2008.

CEREDA, M. P. Alguns aspectos sobre a fermentação de mandioca., 1973. 89 p. (Tese de Mestrado). Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Botucatu.

CEREDA, M. P.; CATANEO, A. Avaliação de parâmetros que influem na qualidade do polvilho azedo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, Camburiú, Anais, p.62, 1986.

CEREDA, Marney Pascoli; VILPOUX, Olivier. Produtos regionais a base de mandioca ou derivados. In: CEREDA, Marney Pascoli. Tecnologias, usos e potencialidade de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. Cap. 25. p. 693-711.

CEUPPENS, S. *et al.*, Regulation of toxin production by *Bacillus cereus* and its food safety implications. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 37, p. 188–213, 2011.

CHAVES, Jeane Quintanilha; PIRES, Eder Soares; VIVONI, Adriana Marcos. Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 147, n. 1, p.12-16, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.029>.

CHISTÉ, Renan Campos et al. Qualidade da farinha de mandioca do grupo seca. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Belém, v. 4, n. 26, p.861-864, dez. 2006.

CHISTÉ, Renan Campos; COHEN, Kelly de Oliveira. Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d'água. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 41, n. 2, p.279-284, 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aa/v41n2/v41n2a13>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

CHISTÉ, Renan Campos; COHEN, Kelly de Oliveira. Teor de cianeto total e livres nas etapas de processamento do tucupi. *Instituto Adolfo Lutz*, Campinas, v. 1, n. 70, p.41-46, mar. 2011.

CHISTÉ, Renan Campos; COHEN, Kelly de Oliveira; OLIVEIRA, Suzy Sarzi. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 3, n. 27, p.437-440, jul. 2007.

CHISTÉ, Renan Campos et al. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. *Acta Amazonica*, Belém, v. 40, n. 1, p.221-226, 2010.

COELHO, Luana Martins. Verificação da microbiota e ocorrência de aflotoxinas em farinha de puba consumida em Palmas, Tocantins. 2008. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Ciências do Ambiente, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, 2008.

COHEN, Kelly de Oliveira; OLIVEIRA, Suzi Sarzi; CHISTÉ, Renan Campos. Quantificação de teores de compostos cianogênicos totais em produtos elaborados com raízes de mandioca. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. 24 p.

CORRÊA, Maria Ivaneide Coutinho. Avaliação de bactérias do ácido láctico, endógenas da mandioca, nas características do polvilho azedo. 2010. 83 f. Tese (Doutorado) - Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG, 2010.

COULIN, P. et al. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 106, n. 2, p.131-136, fev. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.012>.

CRISPIM, Silvia Malta et al. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with puba, a Brazilian fermented cassava food. *Brazilian Journal Of Microbiology*, Belo Horizonte, v. 1, n. 44, p.15-21, jul. 2013.

DIAS, Vanessa Lima; RODRIGUES, Natália Lima; CALIXTO, Mikaele da Silva. A fabricação do tucupi e seu usona preparação de molhos de pimenta artesanais. In: XVIII ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA (XVIII ENEQ), 18., 2016, Florianópolis. Anais. 1 - 12. Disponível em: <<http://www.eneq2016.ufsc.br/anais/resumos/R0733-1.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2017.

DI-TANNO, Marilisa Flavia Pereira. Influência da temperatura, tempo e concentração de pectinase na textura, rendimento e características físico-químicas da mandioca (*Manihot esculenta* C.) durante a fermentação. 2001. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

FAYEMI, O.E.; OJOKOH, A.O. The Effect of Different Fermentation Techniques on the Nutritional Quality of the Cassava Product (fufu). *Journal Of Food Processing And Preservation*, [s.l.], v. 38, n. 1, p.183-192, 22 jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4549.2012.00763.x>.

FERRAREZZO, Eliane Maria. Desenvolvimento de mandioca chips, moldada e frita. 2011. 190 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências da Engenharia de Alimentos, Faculdade de Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

FIALHO, Josefino de Freitas; VIEIRA, Eduardo Alano. Mandioca: Orientações técnicas. 2. ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2013. 203 p.

FRANCO, Bernadette D. Gombossy de Melo; LANDGRAF, Mariza. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu, 2005. 196 p.

FURTADO, Jomar Livramento Barros et al. Cianeto em tiquiras: riscos e metodologia analítica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 4, p.694-700, dez. 2007.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* Ability of *Bacillus cereus* group strains to cause food poisoning varies according to phylogenetic affiliation (Groups I to VII) rather than species affiliation. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 48, n. 9, p. 3388–3391, 2010.

GUINEBRETIERE, M. H. *et al.* Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol Lett*, v. 259, p. 74-80, 2006.

HENDRIKSEN, N. B. *et al.* Occurrence and pathogenic potential of *Bacillus cereus* group bacteria in a sandy loam. *Antonie Van Leeuwenhoe*n, v. 89, p. 239-249, 2006.

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.

HUERTAS, Ricardo Adolfo Parra. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia*, v. 8, n. 1, p.93-105, jan. 2010. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6117902.pdf>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

IWUOHA, Chinyere I.; EKE, Onyekwere S. Nigerian indigenous fermented foods: their traditional process operation, inherent problems, improvements and current status. *Food Research International*, Canadian, v. 5-6, n. 29, p.527-540, 1996.

JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. *Bacillus cereus* gastroenteritis, *Morden Food Microbiology*, & TH ED. Springer Science Business Media, Ney York, USA, p. 583-590, 2005.

JAY, James M. *Modern Food Microbiology*. 6. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 635 p.

KRAMER, J. M.; GILBERT, R. J. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: "Food-borne Bacterial Pathogens," ed. M. Doyle, p.21. Marcel Dekker, New York, N. Y, 1989.

LACERDA, I. C. A. Caracterização fisiológica e molecular das bactérias lácticas e leveduras na produção de polvilho azedo e utilização de culturas iniciadoras para processo fermentativo. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. 2006. 150 p. (Tese, Doutorado em Microbiologia).

LACERDA, Inayara Cristina Alves et al. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of s. *International Journal Of Food Microbiology* 105, Belo Horizonte, v. 2, p.213-219, set. 2005.

LACERDA, Inayara Cristina Alves. Caracterização da microbiota associada ao processo fermentativo da mandioca para a produção do polvilho azedo. 2002. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

LACHANCE, M. A. et al. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p.172-177, 1999.

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.

LIECKFELDT, E. et al. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.

LOGAN, N. A.; DEVOS, P. Genus *Bacillus*. In: DE VOS P. *et al.* *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2ª Ed. New York: Springer. 2009. v. 3, p 21-128.

MAPA. Constituição (2011). Instrução Normativa nº 52, de 07 de novembro de 2011. Definir o padrão oficial de classificação da farinha de mandioca, considerando seus requisitos de identidade e qualidade, a amostragem, o modo de apresentação e a marcação ou rotulagem, nos aspectos referentes à classificação do produto. Instrução Normativa. Brasil, Disponível em:

<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 04 jan. 2018.

MARINHO, H. A.; ARKCOLL, D. B. Estudos sobre o caroteno em algumas variedades amazônicas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). *Acta Amazonica*, Manaus, v. 11, n. 1, p.71-75, 1981.

MASCARENHAS, Luís Renato dos Santos. Perfil toxigênico e de virulência de *Bacillus cereus* sensu stricto isolados de alimentos em minas gerais/brasil. 2018. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

MIGUEL, Maria Gabriela C. P. et al. Physicochemical and microbiological description of Caxiri - a cassava and corn alcoholic beverage. *International Journal Of Food Science & Technology*, [s.l.], v. 50, n. 12, p.2537-2544, 27 jul. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/ijfs.12921>.

MODESTO JUNIOR, Moisés de Souza. Fabricação artesanal de derivados de mandioca: tucupi e goma. 2012. Disponível em: <<http://www.diadecampo.com.br/zpublisher/materias/Materia.asp?id=26331&secao=Artigos Especiais>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

MODESTO JÚNIOR, Moisés de Souza; ALVES, Raimundo Nonato Brabo. Cultura da mandioca: Aspectos socioeconômicos, melhoramento genético, sistemas de cultivo, manejo de pragas e doenças e agroindústria. Brasília: Embrapa, 2016.

NEUMANN, Elisabeth; CARMOS, Luis Simeão do; DRUMMOND, Regina Maria Nardi. Roteiro de aulas práticas: Microbiologia de Alimentos. Belo Horizonte. 2014. 58 p.

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. (Eds), *The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of bacteria*, vol.2, Springer, New York, p. 1711-1742, 1981.

NOUT, M.J.R. Ecology of accelerated natural lactic fermentation of sorghum-based infant food formulas. *Int.J.Food Microbiol.* v.12.p.217-224, 1991.

ODUNFA, S. A.; ADEYELE, S. Microbiological changes during the traditional production of Ogi-baba, a West African fermented sorghum gruel. *J. Cereal Sci.* v.3, p.175-180, 1985.

OGUNTOYINBO, Folarin A.; DODD, Christine E.r. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. *Food Control*, [s.l.], v. 21, n. 3, p.306-312, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.06.010>.

OKAFOR, N.; UMEH, C.; IBENEGBU, C. Amelioration of garri, a cassava-based fermented food by the inoculation of microorganisms secreting amylase, lysine and linamarase into cassava mash. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology*, Nigeria, v. 14, p.835-838, 1998.

OLIVEIRA, Lidiane Lacerda de. Perfil higiênico-sanitário das unidades de processamento da farinha de mandioca (*Manihot esculenta crantz*) na região sudoeste da Bahia. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

ORLA-JENSEN. S. *The Lactic Acid Bacteria*. Fred Host and Son. Copenhagen, 1919.

OYEWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Microbiological studies on cassava fermentation for 'lafun' production. *Food Microbiology*, Nigeria, v. 5, p.125-133, 1988.

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

OYEWOLE, O.B.; ODUNFA, S. A. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *Journal Of Applied Bacteriology*, Nigeria, n. 68, p.145-152, maio 1990.

PADONOU, S.W. et al. Development of starter culture for improved processing of Lafun, an African fermented cassava food product. *Journal Of Applied Microbiology*, [s.l.], v. 109, n. 4, p.1402-1410, 10 jun. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04769.x>.

PADONOU, Ségla Wilfrid et al. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 133, n. 1-2, p.22-30, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.04.019>.

PAIVA, Emmanuela Prado de et al. *Bacillus cereus* e suas toxinas em alimentos. *Higiene Alimentar, Pernambuco*, v. 23, n. 170, p.87-92, mar. 2009.

PAIVA, F. F. A. Controle de qualidade da farinha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) produzida na região metropolitana de Fortaleza. 1991. 216f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará.

PENIDO, Fernanda Corrêa Leal et al. Selection of starter cultures for the production of sour cassava starch in a pilot-scale fermentation process. *Brazilian Journal Of Microbiology*, [s.l.], v. 49, n. 4, p.911-919, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2018.02.001>.

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. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

RABINOVITCH, Leon; OLIVEIRA, Edmar Justo de. Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160 p.

RAMOS, Cíntia Lacerda et al. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 140, n. 2-3, p.225-231, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.03.029>.

RIBEIRO, Diogo Marcelo Lima. Caracterização e comportamento sacarificante da flora microbiana empregada na fabricação da aguardente de mandioca (tiquira). 2011. 79 f.



Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

ROCHA, Witã dos Santos; PIRAS, Pablo Rodrigo Fica. Produção de levedura de panificação e tiquira através da mandioca. 2010. Disponível em: <<http://www.xvsemic.esy.es/upload/2011/2011XV-026WIT121-100.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

ROSSITA, R.; FLEET, G. H. The occurrence and growth of yeast in Camembert and Blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, v. 28, p. 393-404, 1996.

SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral et al. Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Jurana people of Brazil. *International Journal Of Food Microbiology*, Lavras, p.112-121, mar. 2012.

SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral et al. Microbiological and physicochemical characterisation of caxiri, an alcoholic beverage produced by the indigenous Jurana people of Brazil. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 156, n. 2, p.112-121, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.010>.

SANTOS, Débora Nascimento e; SOUSA, Mariana Séfora Bezerra; SILVA, Robson Alves da. Análise sensorial do bolo de puba da mandioca - manuê - elaborado com açúcar cristal e rapadura. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v. 13, n. 3, p.229-234, jul. 2011.

SANTOS, Geraldino da Silva et al. Identificação e quantificação do cristal violeta em aguardentes de mandioca (tiquira). *Química Nova*, São Luís, v. 28, n. 4, p.583-586, 05 nov. 2005.

SCHWAN, Rosane F. et al. Yeast diversity in rice-assava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. *Fems Yeast Research*, [s.l.], v. 7, n. 6, p.966-972, set. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00241.x>.

SCHWAN, Rosane F. et al. Yeast diversity in rice-assava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. *Fems Yeast Research*, [s.l.], v. 7, n. 6, p.966-972, set. 2007. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00241.x>.

SILVA, Neusely da et al. *Manua de Métodos de Análise MicrobioIógica de Alimentos e Água*. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 624 p.

SILVA-FILHO, E. A. da. et al. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 88, p. 13-23, 2005.

SIQUEIRA, R. S. *Manual de microbiologia de alimentos*. EMBRAPA, 1995.

SOUZA, Igor Albuquerque de. *Produção de aguardente de mandioca utilizando o fungo Aspergillus Oryzae para liquefação e sacarificação do amido*. 2014. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

STARLING, Christiane Almeida. *Otimização dos parâmetros de produção do amido de mandioca fermentado*. 2010. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010.

TALLENT, Sandra M. et al. Efficient Isolation and Identification of *Bacillus cereus* Group. *Journal Of Aoac International*, [s.l.], v. 95, n. 2, p.446-451, 4 abr. 2012. *The Journal of AOAC International*. <http://dx.doi.org/10.5740/jaoacint.11-251>.

TONDO, Eduardo César; BARTZ, Sabrina. *Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos*. Porto Alegre: Sulina, 2012. 263 p.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine LI. *Microbiologia*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VENTURINI FILHO, Waldemar G.; MENDES, Beatriz do Prado. *Fermentação alcoólica de raízes tropicais*. In: CEREDA, Marney Pascoli. *Tecnologias, usos e potencialidade de tuberosas amiláceas latino americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. p. 530-575.

VILPOUX, Olivier François. *Produção de farinha d'água no Estado do Maranhão*. In: CEREDA, Marney Pascoli. *Tecnologias, usos e potencialidade de tuberosas amiláceas latino americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. Cap. 21. p. 621-642.

VOS, Paul de et al. *BERGEY'S MANUAL OF Systematic Bacteriology*. 2. ed. Georgia: Springer, 2009. 1450 p.

YANG, I. C. *et al.* Establishment of a novel multiplex PCR assay and detection of toxigenic strains of the species in the *Bacillus cereus* group. *Journal of food Protection*, v. 68, p. 2123-2130, 2005.

ZENEBON, Odair; PASCUET, Neus Sadocco; TIGLEA, Paulo. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p. Disponível em: <[http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016\\_3\\_19/analisedealimentosial\\_2008.pdf](http://www.ial.sp.gov.br/resources/ediorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf)>. Acesso em: 06 mar. 2018.