Universidade Federal do Rio de Janeiro

ESTUDOS DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VISANDO ÀS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Karine Hojo Rebouças

2015

ESTUDOS DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VISANDO ÀS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Karine Hojo Rebouças

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadores: Prof. Dr[a] Vânia Margaret Flosi Paschoalin
Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila
Prof. Dr. Joab Trajano Silva (***in memoriam***)

Rio de Janeiro
Agosto, 2015

ESTUDOS DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VISANDO ÀS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS

Karine Hojo Rebouças

Orientadores: Prof. Drª. Vânia Margaret Flosi Paschoalin
Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Aprovada por:

_____
Presidente, Prof. Vânia M. Flosi Paschoalin, Doutora, IQ - UFRJ

_____
Prof. Marcia Regina Soares da Silva, Doutora, IQ - UFRJ

_____
Prof. Ana Cláudia do Amaral Melo, Doutora, IQ - UFRJ

_____
Prof. Maria Alice Zarur Coelho, Doutora, EQ - UFRJ

_____
Prof. Carlos Adam Conte Junior, Doutor, UFF - UFRJ

Rio de Janeiro
Agosto, 2015

Rebouças, Karine Hojo

Estudos das características microbiológicas e físico-químicas durante a fermentação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) visando às aplicações tecnológicas/ Karine Hojo Rebouças. Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2015.

xi, 148f.: il.

Orientador: Vânia Margaret Flosi Paschoalin

Tese (doutorado) – UFRJ/ Instituto de Química/ Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, 2015.

Referências bibliográficas: f. 83-99.

1. *Manihot esculenta* Crantz 2. polvilho azedo 3. fermentação 4. microbiota 5. expansão 6. compostos orgânicos e voláteis 7. acidez total titulável 8. bactéria ácido-láctica 9. Leveduras. I. Paschoalin, Vânia Margaret Flosi. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. III. Estudos das características microbiológicas e físico-químicas durante a fermentação da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) visando às aplicações tecnológicas.

À Deus, que me deu força, coragem e determinação.
CONSAGRO

Aos meus pais, meu irmão, familiares e amigos.
DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio de Janeiro, em especial ao Instituto de Química e Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos pela oportunidade;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pelos valiosos ensinamentos repassados durante todo o doutorado;

Ao IFbaiano – Campus Senhor do Bonfim, por conceder o afastamento, que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho, em especial a Aécio José Duarte, João Batista Novais, João Luís Feitosa, Calila Teixeira, Henrique Sereno e Gleice Pacheco. Meus sinceros agradecimentos;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela concessão da bolsa de Doutorado;

Aos órgãos de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos auxílios financeiros;

Ao saudoso e inesquecível orientador, Professor Dr. Joab Trajano Silva (*In Memoriam*), por ter acreditado no meu trabalho, pelos ensinamentos e principalmente, pelo exemplo de humildade, alegria e competência que ele representou em minha vida;

À querida orientadora, Prof[a]. Dra. Vânia Paschoalin pela atenção, bondade, por ter me amparado com contribuições inesgotáveis ao meu trabalho, e também, pela formação como pessoa. Obrigada pela orientação, paciência e dedicação em todos os momentos;

Ao co-orientador Professor Dr. Eduardo Mere Del Aguila, pelas idéias, por estar sempre presente na bancada, ajudando, dando broncas, sendo companheiro, passando conhecimento e principalmente, por toda a dedicação;

À Dra. Analy Leite, por ter me explicado tudo com a maior paciência do mundo, inclusive nos finais de semana. Meus sinceros agradecimentos a você! Obrigada por ter dedicado seu tempo ao meu trabalho, ou melhor, ao nosso trabalho!

Ao Laidson Paes, que além de me ajudar nas análises, foi um grande companheiro e amigo durante todo o doutorado;

Às Professoras Dra. Cláudia Rezende, Dra. Maria Inês Bruno e Dra. Eveline Almeida por contribuírem com as análises;

À todos os colegas do Laboratório de Análises Avançadas em Bioquímica e Biologia Molecular e aos técnicos Ricardo Bretas e Cristiana Passinato, por sempre estarem à minha disposição, ajudando também para a execução desse trabalho;

Diego Baião, Ellen Hojo, Patrícia Pereira obrigada por terem me ajudado na estatística, nas análises e gráficos;

Ao secretário mais perfeito do mundo, Rafael Luiz Pereira, pelo convívio, risadas, experiências e conselhos! Obrigada Rafa, pelo carinho e amizade;

À Valdeci Bastos, não só pela amizade verdadeira de tantos anos, mas além disso, obrigada por ser minha companheira, ajudando tanto com palavras positivas de incentivo e carinho;

AGRADECIMENTOS

À DEUS acima de tudo, por me conceder o dom da sabedoria, por mostrar que eu seria capaz de concluir o doutorado e por estar sempre ao meu lado principalmente nos dias mais difíceis dessa caminhada;

Aos meus amados pais, Abel Rebouças São José e Tiyoko Nair Hojo Rebouças, pelo exemplo de competência, profissionalismo e amizade. Obrigada pelos conselhos, tolerância, amor e carinho;

Ao meu irmão e minha cunhada por fazerem parte da minha família e estarem sempre me apoiando, acreditando e incentivando;

Ao meu namorado, Rafael Montenegro, por ter me ajudado além do dia-a-dia, em dúvidas de formatação e até mesmo nas pesquisas, obrigada pelo amor, carinho, dedicação, paciência e ajuda;

À Yure Bibiana, Camila Leite, Doralice Tavares, Maria Dias, Orene Dias, Thais Nascimento e Gisele Pereira, amigas de todas as horas e se Deus conceder de toda a minha vida. Obrigada pela paciência, consolo, animação, estadia, orações e toda ajuda prestada durante esse tempo que passei aqui no Rio de Janeiro;

À Leilanne Lopes, por me ajudar na coleta das amostras na polvilharia;

À todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

ESTUDOS DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E FÍSICO-QUÍMICAS DURANTE A FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz) VISANDO ÀS APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS.

Karine Hojo Rebouças

Orientadores: Prof. Drª. Vânia Margaret Flosi Paschoalin
Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

A fermentação tradicional de fécula de mandioca foi investigada por uma abordagem polifásica combinando (i) a identificação da comunidade microbiana, utilizando técnicas convencionais e moleculares, (ii) análises de ácidos orgânicos, compostos voláteis, produtos de fermentação e tempo de relaxação *spin-rede* e (iii) avaliação das propriedades tecnológicas, tais como propriedades de pasta, índices de absorção de água e solubilidade em água. A fermentação da mandioca foi dominada por gêneros de bactérias e leveduras incluindo *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pichia* sp., *Issatchenkia* sp., *Geotrichum* sp., *Clavispora* sp., *Rhodotorula* sp. e *Neurospora* sp. A redução do pH foi causada pela produção de ácidos acético, láctico e succínico. Os compostos voláteis, incluídos ácidos orgânicos, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, ésteres e terpenos, que contribuem para o aroma e correspondem a 35% dos compostos após a fermentação e tratamento de secagem ao sol. A capacidade de expansão do produto final foi aumentada conforme revelado por um menor tempo de relaxação *spin-rede*. O produto fermentado mostrou aumento de quebra de viscosidade, diminuição do pico de viscosidade e resistência à retrogradação e não houve ganho na absorção e solubilidade de água. Os resultados deste estudo podem ser úteis para padronizar o processo de fabricação do amido de mandioca no Brasil, fornecendo produtos homogêneos e de alta qualidade.

Palavras chave: Sequenciamento de DNA, análises de compostos voláteis por headspace, ácidos orgânicos, relaxação *spin-rede*, expansão de massa

Rio de Janeiro
Agosto, 2015

ABSTRACT

STUDIES OF MICROBIOLOGICAL AND PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERISTICS DURING THE FERMENTATION OF CASSAVA (*Manihot esculenta* Crantz) TARGETING THE TECHNOLOGICAL APPLICATIONS.

Karine Hojo Rebouças

Orientadores: Prof. Drª. Vânia Margaret Flosi Paschoalin
Prof. Dr. Eduardo Mere Del Aguila

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

The traditional fermentation of cassava starch was investigated by a polyphasic approach combining (i) microbial community identification using conventional and molecular techniques, (ii) analyses of organic acids, volatile compounds, fermentation products and spin-lattice relation time and (iii) evaluation of technological properties, such as pasting properties, water absorption and water solubility indexes. Cassava fermentation was dominated by bacteria and yeasts genera, including *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pichia* sp., *Issatchenkia* sp., *Geotrichum* sp., *Clavispora* sp., *Rhodotorula* sp. and *Neurospora* sp. The pH reduction was caused by the production of acetic, lactic and succinic acids. Volatile compounds included organic acids, aliphatic and aromatic hydrocarbons, esters and terpenes, which contribute to the aroma and correspond to 35% of the compounds after fermentation and sun-drying treatment. The expansion ability of the final product was increased as revealed by a shorter spin-lattice relaxation time. The fermented cassava showed increased breakdown, decreased peak viscosity and setback and no gain in water absorption and solubility. The results of this study may be useful to standardize the manufacturing process of cassava starch in Brazil, providing homogeneous and high quality products.

Keywords: DNA sequencing, headspace volatile analysis, organic acids, spin-lattice relaxation, loaf expansion

Rio de Janeiro
Agosto, 2015

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 15
2 REVISÃO DA LITERATURA..... 18
2.1 A MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)..... 18
2.2 O AMIDO E A FÉCULA..... 20
2.2.1 Grânulos de amido..... 21
2.2.1.1 Amilose e amilopectina..... 23
2.3 PROPRIEDADES DO AMIDO..... 24
2.3.1 Inchamento e solubilidade do amido..... 25
2.3.2 Gelatinização do amido..... 26
2.4 AMIDOS MODIFICADOS..... 27
2.5 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE PASTA DOS AMIDOS..... 28
2.5.1 Analisador Rápido de Viscosidade (RVA) 29
2.6 O POLVILHO..... 29
2.6.1 O polvilho doce..... 30
2.6.2 O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 30
2.6.2.1 Tecnologia de fabricação de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 31
2.6.2.2 Processo fermentativo do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 33
2.6.2.3 Propriedade de expansão do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 33
2.6.2.4 Secagem Artificial..... 34
2.7 PAPEL DOS MICRORGANISMOS DURANTE A PRODUÇÃO DO POLVILHO FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)..... 34
2.7.1 Bactérias ácido-láticas (BAL)..... 35
2.7.1.1 Gênero *Lactobacillus* sp..... 36
2.7.1.2 Gênero *Lactococcus* sp..... 36
2.7.1.3 Gênero *Leuconostoc* sp..... 37
2.7.1.4 Gênero *Enterococcus* sp..... 38
2.7.2 Leveduras..... 38
2.7.3 Associação entre bactérias do ácido lático e leveduras..... 39
2.8 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE DIVERSIDADES MICROBIANAS..... 40
2.8.1 Utilização da biologia molecular para determinação da microbiota do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) e outros produtos fermentados derivados da mandioca..... 40
2.8.2 PCR..... 41
2.8.3 Estudo da diversidade microbiana por meio da análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)..... 41
2.8.4 RAPD..... 42
2.9 COMPOSTOS VOLÁTEIS..... 43
2.9.1 Isolamento dos compostos voláteis..... 44
2.9.1.2 Extração por *headspace*..... 44
2.9.2 Identificação de voláteis em fermentação..... 45
2.10 ÁCIDOS ORGÂNICOS..... 46
2.10.1 Ácidos orgânicos na fermentação de amido de mandioca..... 46
2.11 RELAXAÇÃO MOLECULAR..... 47

3 JUSTIFICATIVA..... 49
4 OBJETIVOS..... 51
4.1 OBJETIVO GERAL..... 51
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 51
5 MATERIAL E MÉTODOS..... 53
5.1 POLVILHO FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)..... 53
5.2 CONTAGEM DOS MICRORGANISMOS..... 53
5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS..... 54
5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLVILHOS..... 55
5.4.1 Avaliação do teor de umidade..... 55
5.4.2 Teor de amilose e amilopectina..... 55
5.4.3 Determinação de acidez total titulável e pH..... 56
5.4.4 Determinação do teor de ácidos orgânicos..... 56
5.4.5 Determinação de compostos voláteis..... 57
5.4.6 Determinação do tempo de relaxação *spin-rede*..... 57
5.5 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO POLVILHO DOCE (*t=1*) E FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)..... 57
5.5.1 Propriedades de pasta..... 57
5.5.2 Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)..... 58
5.5.3 Poder de expansão..... 58
5.6 Análise estatística..... 58
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 59
6.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS..... 59
6.1.1 Contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras nos polvilhos ao longo da produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 59
6.1.2 Identificação molecular de bactérias e leveduras isoladas..... 60
6.2 CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO POLVILHOS..... 64
6.2.1 Teor de umidade..... 64
6.2.2 Teor de amilose aparente e amilopectina..... 67
6.2.3 Determinação de acidez total titulável e pH dos polvilhos durante a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 67
6.2.4 Caracterização dos ácidos orgânicos em polvilhos doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 69
6.2.5 Caracterização dos compostos voláteis em polvilhos doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 70
6.2.6 Avaliação da Relaxometria por RMN de ^{1}H em polvilho doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 75
6.3 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO POLVILHO DOCE E FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)..... 76
6.3.1 Propriedade de pasta..... 76
6.3.2 Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)..... 79
6.3.3 Propriedade de expansão..... 80
7 CONCLUSÕES FINAIS..... 82
REFERÊNCIAS..... 83
ANEXO A - ARTIGO: Evaluating physicochemical and technological characteristics and microbial community dynamics during the fermentation of

cassava starch…… 100
ANEXO B - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO: Análise comparativa de ácidos orgânicos encontrados no material fermentado do polvilho azedo e doce. In: CHEMRIO 2014, Symposium, Rio de Janeiro……. 140
ANEXO C - APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO: Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: 53° Congresso Brasileiro de Olericultura 2014, Palmas……..... 141

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

16S rDNA: gene que codifica o DNA ribossomal 16S
ANOVA: Analysis of variance, análise de variância
ANVISA: Agência nacional de vigilância sanitária
ARDRA: Amplified ribosomal DNA restriction analysis, Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado
BAL: Bactéria ácido lática ou LAB: Lactic acid bacteria
CLAE: Cromografia líquida de alta eficiência
DNA : Deoxyribonucleic acid , ácido desoxirribonucléico
dNTP: Deoxynucleotide triphosphate, desoxiribonucleotídeo tri-fosfato
ITS: Internal transcribed spacer, espaçador não-codificante interno
MRS: Man, rogosa and sharpe
pb: pares de base
PCR: Polimerase chain reaction, reação em cadeia de polimerase
RNAr: ácido desoxirribonucléico ribossomal, ribossomal deoxyribonucleic acid
RVA: Rápido viscoanalisador
TAE: Tris, ácido acético e EDTA
UFC: Unidade formadora de colônia
SPME: Solid phase microextraction
HS: headspace ou espaço confinado
HS-SPME: Headspace solid-phase microextraction ou microextração em fase sólida no modo headspace
GC-qMS: Gas chromatography – quadrupole mass spectrometry ou cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrômetro de massas quadrupolar
DVB/CAR/PDMS: Divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano
cP: centipoise
RVU: Rapid visco unit
HPLC: High-performance liquid chromatography ou cromatografia líquida de alta eficiência
ISA ou WSI: Índice de solubilidade em água ou water solubility index
IAA ou WAI: Índice de absorção em água ou water absorption index
HDPE: High density polyethylene ou polietileno de alta densidade
RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA
LF-NMR: Low field nuclear magnetic resonance ou Ressonância Magnética Nuclear de Baixo Campo
MVOCs: Microbial volatile organic compounds

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)..... 18

Figura 2 - Formas dos grânulos de diferentes tipos de amido: (a) mandioca, (b) milho, (c) araruta, (d) mandioquinha-salsa, (e) batata doce e (f) batata..... 21

Figura 3 - (a) Representação planar da molécula de α-D-glucose, (b) representação esquemática da estrutura de um fragmento da amilose e (c) representação esquemática da estrutura de um fragmento da amilopectina..... 23

Figura 4 - Processamento de produção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por fermentação direta da massa ralada da mandioca (a) e adicionando água ao polvilho doce (b)..... 32

Figura 5 - Exemplo de gel para análise de perfis de restrição dos fragmentos do gene *rrs* de bactérias ácido-láticas isoladas no último dia de fermentação (*t*=30), em meio de cultivo azida sangue. M= marcador de peso molecular DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. DNA amplificado e digerido com a enzima *Dde*I (Fermentas, São Paulo, Brasil)..... 61

Figura 6 - Exemplo de gel para análise dos perfis de amplificação de diferentes espécies de leveduras, no último dia de fermentação (*t*=30), cultivados em meio YPD 2%. M = marcador de peso molecular lambda digerido com *Hind*III. DNA amplificado com o primer *EI*-1..... 63

Figura 7 - Cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos obtido por HPLC. Picos: 1 = ácido cítrico, 2 = ácido succínico, 3 = ácido láctico, 4 = ácido acético, 5 = ácido propiónico e 6 = ácido butírico..... 69

Figura 8 - Perfil cromatográfico obtido no *headspace* das amostras (a) polvilho doce (*t*=1) e (b) polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) através da análise por CG-qEM..... 74

Figura 9 - Curvas de distribuição de domínios para os polvilhos doce (*t*=1) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) obtidas por RMN-BC..... 75

Figura 10- Viscoamilograma (RVA) em centipoise (cp) de polvilho doce (t=1) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), em função do tempo

(min)..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos grânulos de alguns amidos..... 22

Tabela 2 - Conteúdo de amilose e amilopectina de alguns amidos..... 24

Tabela 3 - Contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras (Log10 UFC/g) durante o processamento do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) em diferentes meios de cultivo..... 60

Tabela 4 - Identificação das bactérias no início da fermentação (*t*=1), último dia de fermentação (*t*=30) e produto fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por sequenciamento do gene *rrs*..... 61

Tabela 5 - Identificação das leveduras no início da fermentação (*t*=1), último dia de fermentação (*t*=30) e produto fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por sequenciamento da região espaçadora interna transcrita do DNA ribossômico (ITS do rDNA)..... 63

Tabela 6 - Teor de amilose e amilopectina em polvilho doce (*t*=1) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 66

Tabela 7 - Acidez total titulável ao longo do processo de fermentação polvilho doce (*t*=1), polvilho após 30 dias de fermentação (*t*=30), e no produto final (fermentado e seco ao sol) e respectivos desvios padrão (DP)..... 68

Tabela 8 - Compostos identificados no *headspace* das amostras de povilho doce (*t*=1) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), analisadas por CG-qEM via identificação por espectrometria de massas..... 72

Tabela 9 - Características tecnológicas (viscosidade) dos polvilhos doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 77

Tabela 10 - Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA) dos polvilhos doce (*t*=1) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 79

Tabela 11 - Poder de expansão dos polvilhos doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)..... 80

1 INTRODUÇÃO

A espécie *Manihot esculenta* Crantz, conhecida popularmente como mandioca, é originária do continente americano. O Brasil lidera a produção neste continente e é o segundo país na produção mundial. A produção brasileira de mandioca está em torno de 23,4 milhões de toneladas por ano, sendo plantada em 87% dos municípios brasileiros (IBGE, 2013). O Estado da Bahia é o principal produtor de mandioca da região Nordeste e historicamente se posiciona no ranking entre os maiores produtores do Brasil juntamente com o Estado do Pará e do Paraná (IEA, 2013).

A conservação pós-colheita tem sido uma preocupação das indústrias e dos produtores, já que um dos maiores obstáculos para a utilização dessa raiz é a sua elevada perecibilidade, pois quando armazenada em condições ambientais, possui vida útil muito restrita. Com o intuito de valorizar, inovar e conservar uma grande parte da produção, a mandioca destinada ao consumo humano pode ser utilizada na forma processada de farinha, polvilho, fécula e outros produtos (BATALHA *et al*., 2005; HERMOGENES, 2013).

Muitos produtos industriais hoje, bem aceitos pelos consumidores, são originados de processos artesanais que foram evoluindo ao longo do tempo. A evolução das indústrias tradicionais para inovadoras requer um profundo conhecimento destes tradicionais processos industriais (SPERRY, 2002). Um produto regional, de preparo artesanal com importância e tradição no Brasil e em alguns países da América Latina, é o polvilho ou fécula de mandioca, podendo ser classificado de acordo com o teor da acidez como polvilho doce ou polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

O polvilho doce ou amido de mandioca nativo é obtido da lavagem da massa ralada da mandioca e posterior decantação da água da lavagem, para separar o amido das fibras, material proteico e impurezas, seguido de uma etapa de secagem. O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) é obtido da fermentação natural do amido de mandioca nativo em tanques de fermentação, sem inoculação e sem suplementações nutricionais, até atingir a acidez aproximada de 5%, após um período de aproximadamente 30 a 40 dias, seguido da secagem ao sol (SOUZA & BRAGANÇA, 2000; SILVEIRA *et al*., 2000). Além do teor da acidez, o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) também apresenta uma propriedade de expansão adquirida diferente do polvilho doce (SOUZA & BRAGANÇA, 2000). Esta propriedade vem sendo apreciada de modo crescente pela indústria de panificação, no preparo de biscoitos, sequilhos, pão-de-queijo, bolos, etc, evitando o uso de fermento biológico ou agente químico para a promoção do crescimento durante o assamento.

Também é utilizado para o preparo de massas especiais para consumidores celíacos, por ser um produto livre de glúten (MARCON *et al*., 2009).

O processo fermentativo, para a obtenção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), resulta em aumento da acidez e redução do pH devido à ação da microbiota, formação de ácidos orgânicos, modificações na superfície dos grânulos do amido, provocadas por enzimas amilolíticas que causam modificações reológicas do produto, tais como diminuição da viscosidade e aumento da solubilidade, que conferem ao produto assado aparência inchada, estrutura típica alveolar do miolo e crosta crocante, além de mudanças no sabor e aroma (DEMIATE *et al*., 2000; GUYOT & MORLON-GUYOT, 2001; MARCON *et al*., 2006).

Durante a fermentação ocorre a produção de exopolissacarídeos (EPS) e de ácido láctico por bactérias ácidas lácticas (BAL) responsáveis pela formação da estrutura viscoelástica, que permite a retenção de gás e expansão da massa no forneamento. Outros estudos demonstram que as BAL representam 80,6% dos microrganismos presentes no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (MAEDA & CEREDA, 2001). Ampe *et al* (2001) identificaram como microrganismos dominantes no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) as espécies *Bifidobacterium minimum, Lactococcus lactis, Streptococcus* sp, *Enterococcus saccharolyticus, Lactobacillus plantarum*. Também foram encontradas *Lactobacillus panis, Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum*.

As BAL nos alimentos fermentados não só contribuem para o sabor, aroma e textura, mas também promovem a sua qualidade e segurança (KOPERMSUB & YUNCHALARD, 2010). Em outros estudos também foram encontradas leveduras, tais como *Candida* sp, *Saccharomyces* sp, *Issatchenkia* sp, *Pichia* sp e *Rhodotorula* sp (LACERDA *et al*., 2005; OYEWOLE, 2001). O desenvolvimento de leveduras em alimentos fermentados é favorecido pelo ambiente ácido criado por bactérias e o crescimento destas bactérias é estimulado pela presença de leveduras, que podem fornecer fatores de crescimento tais como açúcares fermentáveis, vitaminas e compostos nitrogenados solúveis durante a interação com as bactérias (DE VUYST & NEYSENS, 2005; SCHWAN *et al*., 2007; PARAMITHIOTIS *et al*., 2006).

Como a fermentação é natural, é comum encontrar falta de uniformidade no padrão microbiológico do produto. Há também uma variação da acidez total titulável que pode ser atribuída ao fato das fermentações não serem submetidas a análises de controle, sendo interrompidas em diferentes estágios de desenvolvimento e de produção dos ácidos e, por este motivo, o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) apresenta falta de uniformidade

até para partidas de mesma matéria-prima e mesma origem (AQUINO *et al*., 2013), mas também pode haver contribuição da natureza dos ácidos formados, com a variação da acidez dependente do tamanho da cadeia e do número de carboxilas, sendo encontrados os ácidos lático, acético, propiônico e butírico (DEMIATE *et al*., 2000).

Visando melhorar o processo produtivo, bem como planejar futuras evoluções nos processos artesanais tradicionais para fabricação do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) e obter uma maior homogeneidade na qualidade do mesmo, existe a necessidade de continuidade dos estudos sobre este processo artesanal, com ênfase na padronização da fermentação para garantir as propriedades tecnológicas exclusivas do amido de mandioca fermentado.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do polvilho doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), tendo em vista a necessidade de padronização e melhoria do processo de fabricação brasileira, o conhecimento e caracterização do processo de fabrico e do produto final, para poder servir de base para o planejamento e obtenção de produtos controlados, superiores aos produzidos atualmente. Tanto quanto sabemos, é a primeira vez que a mandioca e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) foram avaliados considerando as propriedades microbiológicas e físico-químicas durante a fermentação da mandioca visando as aplicações tecnológicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A MANDIOCA (*Manihot esculenta* Crantz)

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (Figura 1) é uma planta da família Euphorbiaceae, arbustiva, com muitos galhos, podendo atingir 3 m de altura, produzindo de 6 a 8 raízes feculentas com aproximadamente 30 cm de comprimento e 7 cm de diâmetro. Seu ciclo pode ser de 1 ou 2 anos. É conhecida como tapioca nos países asiáticos, como aipim, castelinha e macaxeira no Brasil, como *yuca* nos países da América do Sul e como *manioc* em países de língua francesa na África (PANDEY *et al*., 2000).

Figura 1 – Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)
Fonte: Salla *et al*. (2010)

Originária da América do Sul, a mandioca constitui um dos principais alimentos energéticos para mais de 700 milhões de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento (EMBRAPA, 2014). Foi disseminada pelo mundo através dos negociantes portugueses, antes de 1600, que a levaram ao continente africano e depois até a África Oriental e Ásia (CEREDA, 2002).

Mais de 100 países produzem mandioca, sendo que o Brasil participa com 10% da produção mundial (é o segundo maior produtor do mundo). O cultivo da mandioca situa-se entre os oito primeiros produtos agrícolas do país, em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção (EMBRAPA, 2014).

Em relação à safra brasileira de mandioca 2012/13, o IBGE (2013) indicou um volume produzido de 21,179 milhões de toneladas, área colhida de 1,540 milhões de hectares e rendimento médio de 14,026 toneladas/ha, sendo observada uma queda de 11,4% na área e de 9,5% na produção comparada com a safra anterior. Os números pouco estimulantes da safra são o reflexo do fraco desempenho de alguns estados produtores afetados pelas condições climáticas desfavoráveis, principalmente a falta de chuva durante o ciclo vegetativo da lavoura.

A composição química da raiz de mandioca é de aproximadamente 60 a 65% de umidade; 21 a 33% de amido; 1,0 a 1,5% de proteínas; 0,7 a 1,06% de fibras; e 0,6 a 0,9% de cinzas (BUTOLO, 2002). A mandioca é rica em carboidratos, fibras dietéticas, minerais (magnésio e sódio), vitaminas (B, D e E) e pobre em proteínas, lipídios, ferro e vitamina A, porém algumas variedades de cor amarela apresentam quantidade significante de β-caroteno (WESTBY, 2002). Cada cultivar de mandioca tem suas peculiaridades, sendo que o teor de amido é a característica mais importante e é o componente que mais sofre variações, devido à diversidade de clima, época de plantio, sistema de cultivo e época de colheita da planta (ALVES *et al*., 2008).

A velocidade com que a mandioca deve ser processada é um fator determinante na qualidade e segurança alimentar do produto, devendo ser processada dentro de um período de 24 horas, para evitar a propagação de microrganismos. Esse fato demanda que as plantações não estejam distantes das unidades de processamento (SEBRAE, 2014).

A produção de mandioca pode ser transformada em farinha e fécula, gerando no Brasil uma receita equivalente a 600 milhões de dólares em farinha e 150 milhões de dólares em fécula (FUKUDA, 2001). Nas regiões Norte e Nordeste, há predominância da agroindústria de produção familiar, sendo inúmeras as indústrias artesanais ou as casas de farinha, cujo produto se destina principalmente ao consumo doméstico. Os estados do Centro-Oeste, do Sul e do Sudeste também desenvolvem a atividade voltada para a agroindústria de farinha e fécula, formando importantes pólos de produção (SEBRAE, 2008).

A Bahia é o maior produtor nordestino de mandioca e possui um importante centro de pesquisa da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizado na cidade de Cruz das Almas. A mandioca neste estado se destina basicamente ao consumo humano, através de uso *in natura*, de farinha, goma, bijus, tapiocas, entre outros (GROXKO, 2012).

2.2 O AMIDO E A FÉCULA

A diferença entre fécula e amido é muito pequena e reside apenas no fato de cada um deles ser retirado de uma parte diferente do vegetal. Amido é o produto amiláceo extraído das partes aéreas comestíveis dos vegetais (sementes) e fécula é o produto amiláceo extraído das partes subterrâneas comestíveis dos vegetais (tubérculos, raízes e rizomas) (BRASIL, 1978). No entanto, a ANVISA revogou a Resolução nº 12 de 1978, a Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Nesta mais atual, os amidos são considerados os produtos amiláceos extraídos de partes comestíveis de cereais, tubérculos, raízes ou rizomas. Portanto, se o produto é retirado de partes aéreas ou subterrâneas, não há mais diferença na designação, agora todos recebem o nome de amido, inclusive as féculas. Mas os amidos extraídos de tubérculos, raízes e rizomas ainda podem ser designados de fécula.

O amido é um polissacarídeo natural, sendo a principal substância de reserva de energia nos vegetais, fornecendo de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem, diferente dos demais carboidratos e se apresenta na forma de grânulos, insolúveis em água fria, com formato e tamanho típico de cada vegetal. Os depósitos permanentes de amido nas plantas ocorrem nos órgãos de reserva (raiz, caule, folhas, fruto e sementes), por exemplo, em grãos de cereais (milho, arroz e trigo) e nos tubérculos e raízes de batata e mandioca (LEONEL & CEREDA, 2002; FRANCO *et al*., 2001).

O amido ganhou importância no desenvolvimento de novos produtos por seu baixo custo e alta disponibilidade a partir de diferentes fontes (ACOSTA *et al*., 2006). O uso industrial do amido é primeiramente determinado pelas suas propriedades físico-químicas (REIS *et al*., 2002), sendo a mais importante a sua habilidade de inchamento e de produzir uma pasta viscosa quando aquecido, em suspensão aquosa (FENNEMA, 2000).

As indústrias de alimentos e os produtores agrícolas estão interessados na identificação e no desenvolvimento de espécies de amidos com características físico-químicas especiais, que poderiam abrir novos mercados. O mercado de amidos vem crescendo e se aperfeiçoando nos últimos anos, levando à busca de produtos com características específicas que atendam as exigências da indústria. A produção de amidos modificados é uma alternativa que vem sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar uma ou mais limitações dos amidos nativos e assim aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais (APLEVICZ & DEMIATE, 2007). O mercado brasileiro de fécula de mandioca é dominado pela fécula nativa com 54% da produção, seguido da fécula modificada com 20,8% (VILPOUX, 2003).

O amido de mandioca é facilmente extraído, já que as raízes contêm pequenas quantidades de proteínas, gorduras e outros componentes, sendo considerado puro e de cor branca. O conteúdo de lipídeos no amido de mandioca é pequeno (< 0,1 %), com isso o amido e seus derivados não apresentam sabor e aroma de cereais, o que é desejável para muitos produtos alimentícios (DEMIATE *et al*., 2005).

2.2.1 Grânulos de amido

O amido é o único polissacarídeo produzido em pequenos agregados individuais, denominados grânulos (ALVES *et al*., 2012). A variação no tamanho dos grânulos de amido (1 e 100 µm), distribuição de tamanho, composição e forma (circular, elíptica, ovalada, lenticular ou poligonal) (Figura 2) refletem da origem botânica (Tabela 1) e podem afetar o comportamento físico-químico, reológico, textural e morfológico de novos produtos (LINDEBOOM *et al*., 2004; ACOSTA *et al*., 2006; AO & JANE, 2007).

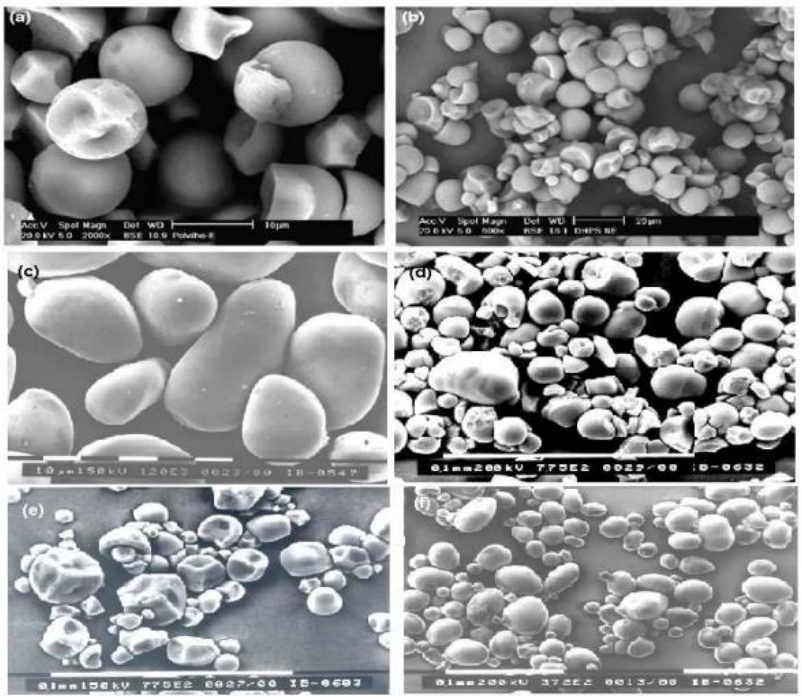


Figura 2 – Formas dos grânulos de diferentes tipos de amido: (a) mandioca, (b) milho, (c) araruta, (d) mandioquinha-salsa, (e) batata doce e (f) batata

Fonte: mandioca e milho (com aumento de 2000 e 500x, respectivamente) Schmitz *et al.* (2006), com modificações e araruta (com aumento de 1440x), mandioquinha–salsa, batata doce e batata (não especificado aumento) Leonel (2007), com modificações.

Tabela 1 – Características dos grânulos de alguns amidos

Amido	Tamanho do grânulo (µm)	Formato do grânulo
Cereais		
Milho	5-25	Redondo, poligonal
Trigo	2-38	Redondo, lenticular
Aveia	5-15	Redondo
Cevada	2-5	Redondo, lenticular
Sorgo	4-24	Redondo, poligonal
Millet	4-12	Redondo, poligonal
Centeio	12-40	Lenticular
Arroz	3-8	Poligonal
Raízes e Tubérculos		
Batata	15-100	Volumoso, oval
Batata doce	2-42	Redondo, oval e poligonal
Mandioca	5-35	Redondo-oval, truncado

Fonte: Hoover (2001)

A pasta de amido de tubérculos e raízes apresenta géis mais fracos e pouco consistentes, porém são de alta viscosidade, translúcidos, longos, coesivos, fibrosos e de baixa tendência para retrogradar pelo seu baixo conteúdo de amilose (aproximadamente 17%) e de lipídeos (FRANCO *et al*., 2001).

O grânulo de amido é constituído de moléculas de amilose e amilopectina associadas entre si por pontes de hidrogênio, formando áreas cristalinas radialmente ordenadas. Entre essas áreas cristalinas existem regiões amorfas, nas quais as moléculas não têm uma orientação particular e estas áreas mantêm a estrutura do grânulo e controlam o comportamento do amido em água, fazendo com que o grânulo de amido absorva uma quantidade limitada de água, embora seja constituído de polímeros solúveis ou parcialmente solúveis neste líquido (MATSUGUMA, 2009).

A funcionalidade dos amidos está diretamente relacionada a essas duas macromoléculas e a sua organização física dentro da estrutura granular (BELLO-PÉREZ, 2006a). Ambas frações apresentam a fórmula $(C_6H_{10}O_5)n$, de peso molecular elevado e geralmente, os amidos contém 20% de uma fração solúvel em água (amilose) e 80% de uma fração insolúvel em água (amilopectina), elas são constituídas por unidades de D- glicose, diferindo em tamanho e estrutura molecular. Quando são tratadas com ácido ou por ação enzimática, as frações do amido hidrolisam-se lentamente originando dextrina, maltose, açúcares simples ou monômeros de glicose (FERREIRA *et al*., 2005; LEONEL & CEREDA, 2002).

O grânulo de amido geralmente apresenta baixos teores de cinzas, proteínas, lipídios e fibras. A quantidade destes constituintes depende da composição da planta e do método de

extração e quanto menor o teor dessas substâncias, melhor a qualidade e pureza do amido (ROCHA *et al*., 2008).

2.2.1.1 Amilose e amilopectina

A amilose (Figura 3b) é um polímero com estrutura essencialmente linear que contém até 6.000 unidades de α-D-glicoses (Figura 3a) unidas por ligações glicosídicas α-1,4, com um pequeno número de ramificações (0,3 a 0,5% do total das ligações), sendo considerada a principal responsável pelo processo de retrogradação do amido. Ela possui a tendência de formar hélice e girar, mesmo através de várias camadas de amilopectina (FENNEMA, 2000; FRANCO *et al*., 2001).

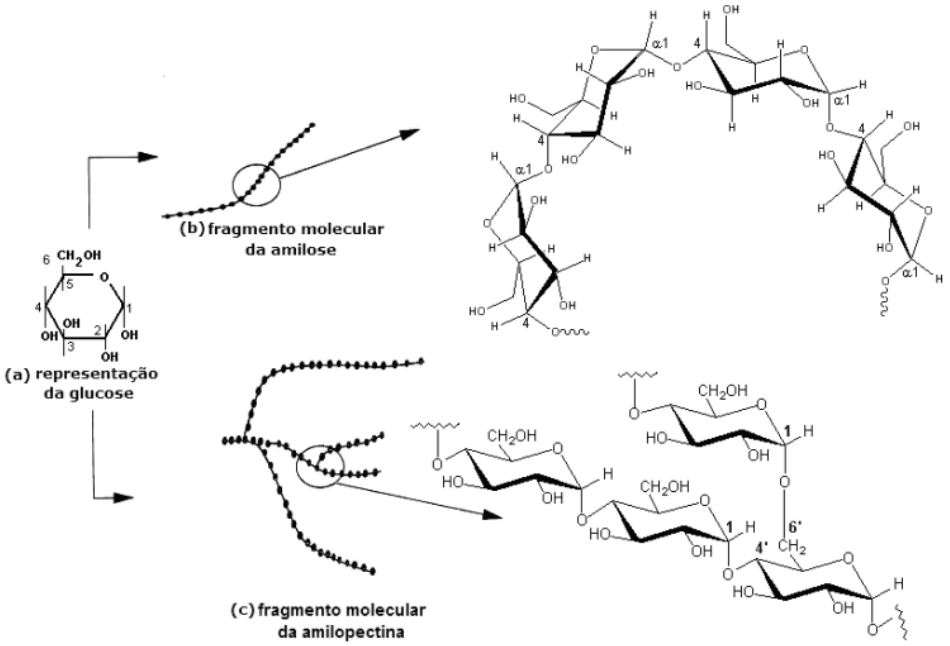


Figura 3 – (a) Representação planar da molécula de α-D-glucose, (b) representação esquemática da estrutura de um fragmento da amilose e (c) representação esquemática da estrutura de um fragmento da amilopectina.
Fonte: Taggart (2004)

O conteúdo de amilose influencia as propriedades nutricionais e tecnológicas, como suceptibilidade à hidrólise enzimática e na gelificação e comportamento da pasta (DENARDIN & SILVA, 2009). Durante o aquecimento do grânulo de amido em meio aquoso, a amilose contribui na viscosidade da fase contínua da dispersão amido-água (FUKUOKA *et al*., 2002; THIRÉ *et al*., 2003).

A amilopectina (Figura 3c) tem uma estrutura altamente ramificada, de cadeias curtas, possuindo cerca de 1000 unidades de α-D-glicose unidas por ligações α (1-4) e com 5

a 6% de ligações α (1-6) nas ramificações (FENNEMA, 2000; FRANCO *et al*., 2001). Estas ramificações possuem dupla hélice e o comprimento das cadeias varia com a origem do amido e a espécie, porém é comum apresentarem entre 20 e 30 unidades de glicose (FRANCO *et al*., 2001; CEREDA *et al*., 2001; BELLO-PÉREZ *et al*., 2006b). O peso molecular é cerca de 1000 vezes o peso molecular da amilose.

A unidade de glicose terminal da cadeia polimérica tem um grupo aldeído latente (-$HOCH_2$), e é conhecido como grupo redutor ou extremidade redutora do amido (VANDEPUTTE & DELCOUR, 2004; LAJOLO & MENEZES, 2006). As diferenças entre as moléculas de amilose e amilopectina podem ser evidenciadas através da massa molar, grau de polimerização e outras propriedades físico-químicas.

A amilopectina é menos propensa à retrogradação do que a amilose, tende a ser solúvel, formando soluções que não gelificam sob condições extremas de altas concentrações e baixas temperaturas (ARIAS, 2000). Ela absorve muita água durante a cocção do amido e é a grande responsável pelo inchamento do grânulo. Portanto, amidos ricos em amilopectina são mais solúveis em água a 95 ºC do que os que contêm muita amilose.

Os teores de amilose e amilopectina podem variar de acordo com a fonte de amido (Tabela 2), nas quantidades relativas, tamanho, forma e modo de associação no grânulo, o que determina a extensão e o tipo de estrutura cristalina, além de afetar nas propriedades funcionais do amido (WEBER *et al*., 2009). A fécula de mandioca apresenta aproximadamente 18% de amilose e 82% de amilopectina (CEREDA *et al*., 2001).

Tabela 2 - Conteúdo de amilose e amilopectina de alguns amidos

Amido	Amilose (%)	Amilopectina (%)
Milho dentado	25	75
Milho ceroso	<1	>99
Mandioca	17	83
Batata	20	80
Milho com alto teor de amilose	55-70 (maior)	45-30 (menor)
Trigo	25	75
Arroz	19	81

Fonte: Thomas & Atwell (1999)

2.3 PROPRIEDADES DO AMIDO

Na indústria de alimentos nacional e na internacional, o amido é utilizado como ingrediente para facilitar o processamento, fornecer textura, servir como espessante, fornecer sólidos em suspensão ou proteger os alimentos durante o processamento. Pode ser utilizado na sua forma natural ou, por intermédio de processamentos adicionais, dar origem a produtos

como amidos modificados, xaropes de glicose, maltose ou frutose e maltodextrinas, entre outros (FRANCO *et al*., 2001).

Segundo Ao e Jane (2007), as características e as propriedades físico-químicas do amido nativo são dependentes da espécie e/ou das variedades de origem. Charles *et al*. (2005) analisaram e observaram o amido de cinco cultivares de mandioca em relação ao tamanho dos grânulos de amido, os quais variaram entre 12,9 e 17,2 µm e as temperaturas de gelatinização. Na forma não modificada, os amidos têm uso limitado na indústria alimentícia, o amido modificado incrementa ou inibe suas características originais, tais como promover espessamento, melhorar retenção, aumentar estabilidade, melhorar sensação ao paladar e brilho, gelificar, dispersar ou conferir opacidade. A viscosidade final dos amidos nativos é extremamente difícil de controlar a nível industrial porque a temperatura não pode ser ajustada com a velocidade suficiente para evitar problema de insuficiência ou excesso de cozimento (FANI, 2009).

O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) é um derivado apenas da fécula de mandioca e é considerado um amido modificado por oxidação que permite adquirir a propriedade de expansão que outros amidos nativos não apresentam, sendo usado na fabricação de biscoitos de polvilho e pão de queijo (FANI, 2010). O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) é o amido modificado mais consumido no Brasil.

2.3.1 Inchamento e solubilidade do amido

Estas características variam de acordo com a fonte do amido, fornecendo evidências da interação entre as cadeias nos domínios amorfos e cristalinos dos polissacarídeos. A extensão destas interações é influenciada pela proporção amilose, amilopectina e pelas características dessas moléculas (distribuição e peso molecular, grau e comprimento de ramificações e conformação) (SINGH *et al*., 2003). A amilopectina contribui para o inchamento do grânulo, enquanto a amilose e os lipídios o inibem (ROCHA *et al*., 2008).

Com a entrada de água, grande parte da amilose deixa os grânulos e contribui para o índice de solubilização. A tendência para a saída da amilose está na dependência da conformação do grânulo e no envolvimento desta com as regiões amorfas, constituídas principalmente pela amilopectina. Assim, a avaliação do poder de inchamento e do índice de solubilização contribui para estimar o tipo de organização existente no interior dos grânulos de amido (MARCON *et al*., 2007).

O poder de inchamento é uma medida para determinar a capacidade de hidratação dos grânulos segundo o peso do grânulo intumescido (inchado) e da água oclusa (MARCON *et al*., 2007).

Os grânulos de amido intactos não são solúveis em água fria, mas eles podem reter pequenas quantidades quando colocados em água fria, ocasionando um pequeno inchamento, de forma reversível. Entretanto, quando o amido é aquecido em excesso de água, acima da temperatura de empastamento, a estrutura cristalina é rompida pelo relaxamento das ligações de hidrogênio e as moléculas de água interagem com os grupos hidroxilas da amilose e da amilopectina, causando um aumento do tamanho dos grânulos e também ocorre solubilização parcial (HOOVER, 2001).

2.3.2 Gelatinização do amido

Nas aplicações de amido no processamento de alimentos é muito comum que seja suspenso em água e submetido ao aquecimento (DAIUTO, 2005). As mudanças que ocorrem nos grânulos de amido durante a gelatinização e retrogradação são os principais determinantes do comportamento de pasta desses amidos, que têm sido medidas principalmente pela viscosidade aparente durante o aquecimento e resfriamento de dispersões de amido (HENRIQUE *et al.*, 2008).

A gelatinização do amido é o colapso do arranjo molecular, onde o grânulo sofre mudanças irreversíveis em suas propriedades de modo que ao intumescer ocorre a fusão da cristalinidade nativa, perda de birrefringência e solubilização. O ponto de gelatinização inicial e a proporção sobre o qual ocorre é influenciado pela concentração de amido, método de observação, tipo de grânulo e a fonte botânica (SINGH *et al*., 2003). Dependendo do tipo de amido (natural ou modificado), do pH da suspensão aquosa e da programação de aquecimento, vários perfis de gelatinização e empastamento podem ser gerados (WHISTLER & BEMILLER, 1997).

Segundo Ávila *et al*. (2012), as propriedades térmicas do amido durante o período de gelatinização são determinantes para que a funcionalidade do mesmo seja conhecida. Durante o aquecimento, as ligações mais fracas de pontes de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina são quebradas proporcionando a absorção de água e consequentemente o aumento do volume do grão de amido. Este processo chega ao fim com o rompimento da estrutura granular, inchamento, hidratação e a solubilização molecular do amido (DENARDIN & SILVA, 2009). Para quebrar a estrutura granular, é necessário o

fornecimento de energia e o tipo e a quantidade de energia, assim como a presença de outros ingredientes, especialmente a água, determinará a intensidade do rompimento da estrutura granular. O grau de rompimento da estrutura granular influencia na qualidade do produto alimentar final (SASAKI *et al*., 2000).

Outra propriedade relacionada à gelatinização é a retrogradação, que é uma importante propriedade funcional em alimentos que contêm amido e este atributo envolve a associação intermolecular da amilose, após ter ocorrido o empastamento, resultando em um gel firme devido à formação de zonas cristalinas durante o armazenamento (DAIUTO, 2005). A liberação de água ou sinerese, que ocorre após o resfriamento da pasta, em consequência da retrogradação, é uma propriedade indesejável principalmente para produtos prontos como pudins, flans, entre outros (MATSUGUMA *et al*., 2009).

Acredita-se que a amilose é o único componente do amido que intervém na retrogradação, excluindo a contribuição da amilopectina. No entanto, estudos mais recentes mostram que sob determinadas condições experimentais, a retrogradação da amilopectina não pode ser excluída do total da fração do amido retrogradado (JAILLAIS, 2005). Em amidos de genótipos não mutantes, a amilose é responsável por mudanças no gel do amido em menos de 24 horas e a amilopectina é responsável pelas mudanças estruturais e reológicas na pasta de amido em períodos mais longos. A quantidade de água no gel e a temperatura de estocagem podem afetar a velocidade e a extensão da retrogradação (LOBO & SILVA, 2003).

De modo geral, as raízes e tubérculos apresentam amidos com menor proporção de amilose do que a encontrada nos cereais regulares ou não cerosos. Consequentemente, os géis formados não se tornam rígidos com o avanço do resfriamento (retrogradação). No entanto, outros fatores como temperatura, tamanho, concentração dos grânulos e a presença de componentes químicos como lipídeos, podem influenciar o comportamento geral do amido (DENARDIN & SILVA, 2009).

2.4 AMIDOS MODIFICADOS

Amidos nativos não podem ser usados para preparação de todos os tipos de produtos. As mudanças estruturais, como a retrogradação, de temperatura durante processos tecnológicos e a estocagem do produto final afetam negativamente a qualidade de alguns produtos com o tempo conduzindo à baixa estabilidade e à pobre resistência à tensão de cisalhamento, pH e pressão (SIKORA *et al*., 2004).

O mercado de amidos vem crescendo e se aperfeiçoando nos últimos anos, levando à busca de produtos com características específicas que atendam às exigências da indústria. A produção de amidos modificados é uma alternativa que está sendo desenvolvida há algum tempo com o objetivo de superar as limitações dos amidos nativos, e assim, como aumentar a utilidade deste polímero nas aplicações industriais (SILVA *et al*., 2006).

As razões que levam à modificação são: modificar as características de cozimento (gomificação); diminuir a retrogradação e a tendência das pastas em formarem géis; aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e descongelamento, a transparência das pastas ou géis e a adesividade; melhorar a textura das pastas ou géis e a formação de filmes e adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante (SILVA *et al*., 2006).

O Brasil tem expressiva produção de amido modificado, segundo dados da Associação Brasileira de Amido de Mandioca (ABAM), o país exportou aproximadamente 35 mil toneladas de amido modificado (ABAM, 2010).

Para obter propriedades diferentes do amido natural, a estrutura química do amido pode ser modificada por métodos químicos, empregando reagentes específicos (ácido acético glacial, anidrido acético, hipoclorito de sódio, permanganato de potássio, ácido lático e ácido cítrico) para alterar a estrutura das macromoléculas componentes do amido; por métodos físicos, como tratamento térmico, exposição à radiações ou métodos enzimáticos (GONÇALVES *et al*., 2009).

A etapa de secagem sob luz solar promove a degradação oxidativa do amido de mandioca quebrado pela acidificação provocando alterações na estrutura molecular dos mesmos resultando em propriedades funcionais tais como maior solubilidade em água, capacidade de formação de pastas fluidas com alto teor de sólidos, com elevada transparência, viscosidade relativamente baixa, maior resistência à retrogradação e cria soluções coloidais de estabilidade realçada (SIKORA *et al*., 2004).

2.5 DETERMINAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE PASTA DOS AMIDOS

As mudanças que ocorrem nos grânulos do amido durante a gelatinização e retrogradação são parâmetros que determinam o comportamento de pasta. Essas medidas são acompanhadas pelas mudanças de viscosidade, temperatura e suspensões de amido (MOORTHY, 2004).

As curvas de viscosidade permitem determinar a temperatura de formação de pasta, resistência à ação mecânica dos grânulos inchados, viscosidade máxima e a temperatura na qual ocorre a influência do resfriamento sobre a viscosidade (WANG & WANG, 2003).

Os grânulos do amido de mandioca sofrem grande inchamento na presença de água e em temperaturas mais baixas, porém as forças associativas tornam-se frágeis, sob agitação mecânica, apresenta um pico de viscosidade, seguido de uma acentuada queda durante o aquecimento (HENRIQUE *et al*., 2008).

O aquecimento do amido em excesso de água ocasiona a perda da estrutura cristalina, produz inchamento dos grânulos e solubilização parcial dos polímeros estimulando o aparecimento das propriedades viscoelásticas do amido. Dependendo da severidade das condições do tratamento térmico (tempo, temperatura), pressão, cisalhamento, teor de umidade e presença de outros constituintes, a fase de separação da amilose e amilopectina pode iniciar ainda durante o processamento, resultando em um composto heterogêneo (DAIUTO, 2005).

2.5.1 Analisador Rápido de Viscosidade (RVA)

O RVA é um viscosímetro rotacional muito utilizado para a avaliação da qualidade de amidos e farinhas em muitos países (HENRIQUE *et al*., 2008). O perfil de empastamento de amidos obtidos pelo RVA inclui pico de viscosidade, tempo para atingir esse pico, quebra, viscosidade final e temperatura de pasta.

No RVA, durante a fase inicial de aquecimento de uma suspensão aquosa de amido, é registrado um aumento na viscosidade quando os grânulos começam a inchar. Neste ponto, polímeros com baixo peso molecular, moléculas de amilose, começam a ser lixiviadas dos grânulos. Durante a fase de temperatura constante (95ºC), os grânulos quebram e a solubilização dos polímeros continua interferindo na viscosidade. Durante a fase de resfriamento, polímeros de amilose e amilopectina solubilizados começam a se reassociar e outro aumento na viscosidade é registrado, conhecido como tendência a retrogradação.

2.6 O POLVILHO

O polvilho ou fécula de mandioca é classificado em doce e azedo segundo o teor de acidez. Para o produto fermentado, a acidez deve ser no máximo de 5 mL de NaOH N/100g,

para o não-fermentado de 1 mL de NaOH N/100g, as outras características continuam idênticas (BRASIL, 1978).

De acordo com a Instrução Normativa nº 23 de 14 de dezembro de 2005 - Normas de Classificação de Produtos Amiláceos – no Brasil, o amido de raízes e tubérculos recebe a denominação de fécula e quando extraído da mandioca e seco ao sol, sem fermentação é conhecido como polvilho doce que é utilizado como matéria prima para a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) e de inúmeros outros produtos (BRASIL, 2005).

Frequentemente, são encontradas diferenças em relação a estes valores, isto ocorre pelo fato do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) ser produzido por fermentação natural, sem condições de controle, o que dificulta a uniformidade do produto. Em partidas de lotes da mesma origem, ocorrem problemas de controle de higiene que interferem no produto final (ARIAS, 2000).

2.6.1 O polvilho doce

O processo da produção consiste de lavagem e descascamento das raízes, ralação para desintegração das células, liberação dos grânulos de amido, separação das fibras e do material solúvel, e finalmente secagem. O bagaço acumulado é eliminado e a fécula é separada (SOUZA & BRAGANÇA, 2000).

A produção ocorre em empresas artesanais, de pequeno porte e de grande investimento, nas quais pode ser observado que o tempo de processamento, desde a recepção da matéria-prima na moega (peça de madeira) até o armazenamento do produto seco (DEMIATE *et al*., 2003).

2.6.2 O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

É obtido pela fermentação de polvilho doce ou da fécula recuperada do líquido de prensagem da massa ralada, como subproduto da fabricação de farinha de mandioca e de raspas. O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) tem se destacado como uma alternativa de baixo custo à produção de amidos modificados, por aproveitar parte da estrutura da farinheira e de não exigir investimentos muito elevados (MAEDA & CEREDA, 2001).

Durante a fermentação do amido de mandioca desenvolve-se uma variada microbiota, responsável pela produção de enzimas amilolíticas e de ácidos orgânicos que podem ser responsáveis pelas propriedades funcionais do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho

azedo). A principal diferença entre a fécula fermentada e a fécula nativa de mandioca, reside na propriedade de expansão. Durante a fermentação, o grânulo sofre modificações pelos ácidos produzidos, aumentando a capacidade de se solubilizar e intumescer em água (MAEDA & CEREDA, 2001). A água, que o grânulo pode absorver e reter, está relacionada com o poder expansão da massa do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) ao forno aumentando a sua qualidade (MACHADO *et al*., 2012).

2.6.2.1 Tecnologia de fabricação de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Para a fabricação de polvilho de qualidade é necessário observar os procedimentos recomendados para o processamento de alimentos: localização adequada da unidade de processamento; utilização de medidas rigorosas e higiene dos trabalhadores na atividade; limpeza diária das instalações e equipamentos; matéria-prima de boa qualidade; tecnologia de processamento apropriada; embalagem e armazenagem adequadas (SOUZA & BRAGANÇA, 2000).

Os equipamentos necessários para a fabricação do polvilho incluem: lavador / descascador, ralador, tanque para lavagem da massa, tanques para decantação do polvilho, jiraus para secagem do polvilho, estrado para classificação e empacotamento, cubas plásticas, e balança mecânica (FANI, 2010).

A fabricação de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) tradicional foi descrita por Cereda *et al*. (2000), compreendendo a extração da fécula das raízes de mandioca e sua fermentação natural (Figura 4a). Outros autores descrevem também a fermentação da fécula (polvilho doce) comercial pela adição de água (Figura 4b).

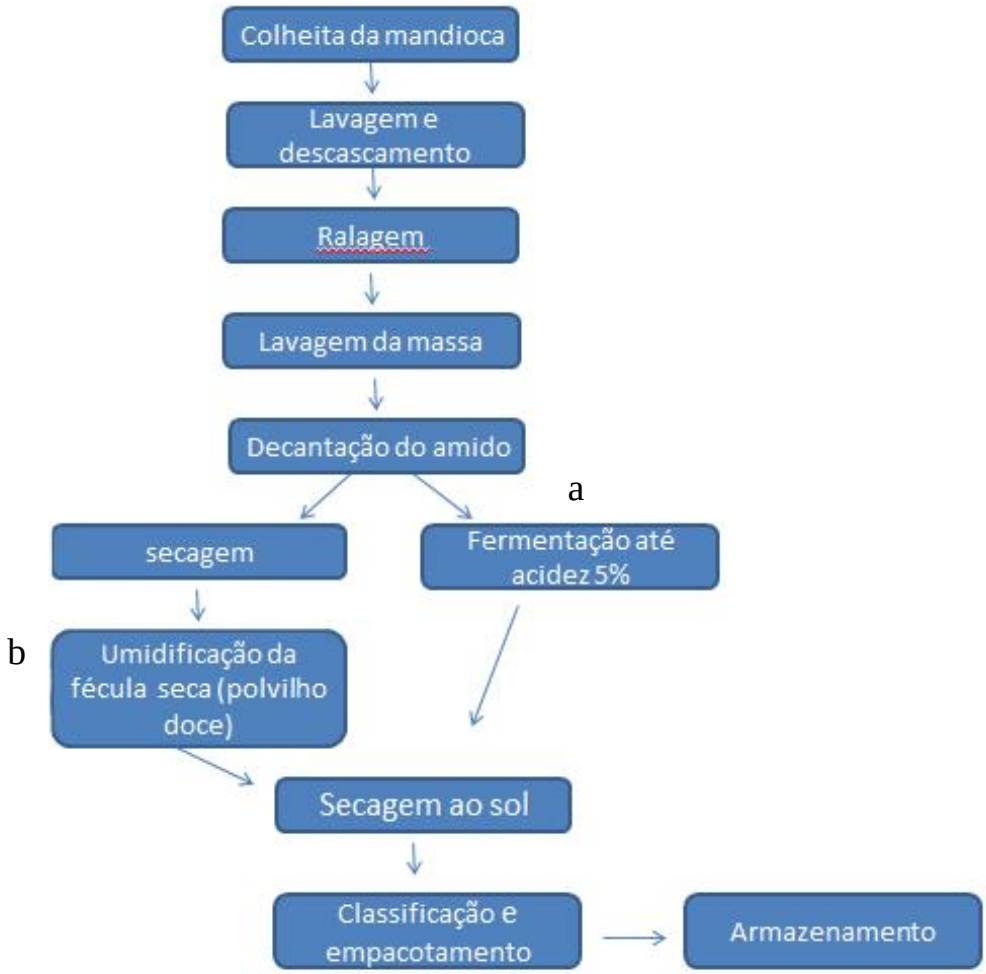


Figura 4 – Processamento de produção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por fermentação direta da massa ralada da mandioca (a) e adicionando água ao polvilho doce (b). Fonte: Fani (2010) com modificações.

De forma geral, o fluxograma de obtenção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) consiste em: colheita das raízes, lavagem e descascamento, ralagem para a extração do "leite de amido" (suspensão de amido em água, conforme denominado pelas empresas), o mesmo é separado do bagaço por peneiras planas vibratórias ou cônicas rotativas, sob água corrente. O bagaço (polpa ou massa) acumulado é eliminado e o amido é arrastado pela água onde será separado por decantação em tanques de alvenaria ou chicanas (labirintos) revestidos de cerâmica ou com divisórias de madeira. O amido obtido é transferido para tanques de fermentação que podem ser desde cochos de madeira a tanques de alvenaria, revestidos ou não com cerâmica, cobertos ou descobertos (MARCON *et al*., 2009).

O amido deve permanecer nos tanques de fermentação sob uma camada de água em torno de 5 a 20 cm e por um intervalo de tempo que varia de acordo com as condições climáticas, de 20 até 60 dias. O processo é concluído, empiricamente, com o aparecimento de

espuma na superfície e bolhas persistentes que se formam no interior da massa e desprendimento de forte odor característico. A secagem é feita ao sol, colocando a massa sobre jiraus de bambu e o período de secagem varia de acordo com as condições climáticas (DEMIATE *et al*., 2000).

2.6.2.2 Processo fermentativo do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Produtos fermentados são utilizados pelo homem desde épocas remotas, como forma de preservação de alimentos e também pelos atributos sensoriais (CAPLICE & FITZGERALD, 2000). Até hoje, alguns destes processos são conduzidos de forma bastante rudimentar. No caso da fermentação da mandioca, reduz a toxicidade do substrato quanto ao cianeto, torna a polpa mais macia, resulta em um sabor e aroma típico e dá novas características, sendo diferentes do amido nativo de mandioca (KIMARYO *et al*., 2000; CAPLICE & FITZGERALD, 2000; COULIN, 2003).

A fermentação da mandioca consiste em uma etapa inicial onde microrganismos aeróbios, facultativos e anaeróbios (bactérias produtoras de ácido lático e leveduras fermentativas), presentes na mandioca, se desenvolvem e a produção de ácido lático diminui o pH e inibe o crescimento indesejável de bactérias Gram (-) e esporuladas. Na fermentação secundária, as leveduras fermentativas, que são ácido-tolerantes, utilizam todo o carboidrato fermentável residual seguido de uma etapa pós-fermentativa, onde o crescimento microbiano (bolores e leveduras oxidativas) pode ocorrer na superfície do produto fermentado (PELCZAR JUNIOR *et al*.,1996).

As BAL são capazes de controlar os microrganismos específicos ou a sucessão de microrganismos que determinam a microflora dos alimentos, base para o desenvolvimento de culturas starter, também conhecidas como culturas iniciadoras, as quais são muito desejáveis (CAPLICE & FITZGERALD, 2000).

2.6.2.3 Propriedade de expansão do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Esta propriedade pode ser justificada pela fermentação e exposição à luz ultravioleta (DIAS *et al*., 2007). Machado *et al*. (2007) compararam vários métodos de secagem do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) e concluíram que as alterações nas propriedades tecnológicas do amido podem ser obtidas por processos físicos, tais como experimento térmico ou exposição a radiações. A radiação ultravioleta demonstrou ser um

catalisador da etapa de secagem, além de demonstrar maior capacidade de absorção de água e maior resistência, apresentou maiores picos no perfil do poder de inchamento do produto.

Pesquisas realizadas no amido de mandioca fermentado e seco ao sol durante o forneamento indicaram que oxidação do amido, promovida pela radiação UV proveniente da luz solar e na presença de ácidos orgânicos, é um dos responsáveis por este fenômeno (DIAS *et al.*, 2011).

2.6.2.4 Secagem Artificial

A secagem ao sol ocasiona uma série de transtornos, desde elevada contaminação por poeira até a falta de padrão de lotes, enquanto que a secagem artificial poderia regularizar estes problemas e tornar o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) um produto comercialmente confiável, sem contaminação, mas o poder de expansão se encontra diminuído, sugerindo que a radiação solar é responsável por esta característica.

A maioria dos trabalhos, sobre a modificação de amido pela irradiação UV, emprega uma fonte artificial (UVA, UVB ou UVC) sobre os amidos acidificados artificialmente, avaliando sua qualidade em relação às propriedades de expansão (MACHADO *et al*., 2012).

O amido nativo de mandioca seco ao sol e o amido fermentado seco em estufa apresentam uma baixa propriedade de expansão. No entanto, o amido fermentado de mandioca e o amido de mandioca tratado com ácidos orgânicos apresentaram propriedade de expansão quando secos ao sol ou com lâmpadas de luz ultravioleta, sugerindo que a propriedade de expansão resulta de alguma modificação do amido causada pela luz ultravioleta (do sol ou das lâmpadas) na presença de ácidos orgânicos (DIAS *et al*., 2007).

2.7 PAPEL DOS MICRORGANISMOS DURANTE A PRODUÇÃO DO POLVILHO FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)

Os microrganismos envolvidos neste tipo de fermentação, em sua maioria são BAL, seguidas de leveduras, as quais se desenvolvem a partir dos metabólitos amilolíticos das BAL (WOSIACKI & CEREDA, 2002). As diversas alterações que ocorrem na fécula da mandioca durante a fermentação são atribuídas ao desenvolvimento de uma microbiota variada proveniente da matéria-prima, água e meio ambiente, uma vez que o único substrato empregado restringe-se a uma suspensão de amido granular em água (SILVEIRA *et al*., 2000).

A fermentação natural é feita por uma microbiota mista, que aumenta a acidez titulável durante o processo. A predominância de microrganismos ocorre naturalmente durante o processo e foi descrito a prevalência de BAL. Os principais micro-organismos envolvidos na fermentação de mandioca são as BAL, com prevalência do gênero *Lactobacillus*, seguido por leveduras, como *Pichia* sp. e *Galactomyces geothricum* (LACERDA *et al*., 2005).

2.7.1. Bactérias ácido-láticas (BAL)

O grupo das bactérias ácido-láticas (BAL) é o principal representante dos probióticos em alimentos, pertencentes ao filo Firmicutes, classe Bacilli. O grupo das BAL compreende 11 gêneros de bactérias Gram positivo: *Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Vagococcus* e *Weissella* (MOGENSEN *et al*., 2003).

São Gram-positivos, geralmente imóveis, não produzem esporos, não produzem a enzima catalase, são anaeróbios aerotolerantes, fastidiosos, ácido-tolerantes, estritamente fermentadores, sendo o ácido lático, o principal produto final da fermentação do açúcar.

Em geral, estas bactérias são mesófilas, mas podem crescer em baixas temperaturas como 10°C, ou altas como 45°C, em situações específicas; são pouco proteolíticas e lipolíticas e requerem aminoácidos, vitaminas do complexo B e bases púricas e pirimídicas para o crescimento (KUBO *et al*., 1992). Geralmente, membros do grupo estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos como vegetais, leites, carnes, e alguns compõem a microbiota normal como cavidade oral, trato intestinal e vaginal de mamíferos (LEITE *et al*., 2012).

Elas são caracterizadas principalmente pela sua habilidade em formar vários isômeros de ácido lático durante fermentação da glicose e pode ser extraído de produtos fermentados e analisado quanto a sua habilidade em girar a luz polarizada. Estão agrupadas em homofermentativas ou heterofermentativas de acordo com o produto final da sua fermentação. As homofermentativas produzem ácido lático como principal produto da fermentação da glicose, apresentando a enzima aldolase, que fermenta glicose diretamente a ácido láctico, incluindo o gênero *Streptococcus* (produz L(+) lactato) e *Pediococcus* (produz DL lactato). As heterofermentativas produzem outros produtos além do ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético e etanol, utilizando a via alternativa da pentose monofosfato, convertendo as hexoses em pentoses pela enzima fosfocetolase, produzindo no processo aldeídos e diacetil,

substâncias altamente desejáveis para formação de aromas; dentro desta fase estão o gênero *Leuconostoc* e um subgrupo do gênero *Lactobacillus*, a Betabactéria (CARR *et al*., 2002).

A ação antagonista de espécies de BAL contra microrganismos indesejáveis em alimentos é descrita em leite e queijos, onde inibe alguns patógenos como *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp., *Salmonella* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e bactérias do grupo coliforme (URAZ *et al*., 2001; ALEXANDRE, 2002; CARIDI, 2003).

2.7.1.1 Gênero *Lactobacillus* sp.

É o gênero mais amplo do grupo de BAL, incluindo cerca de 160 espécies e 27 sub-espécies (EUZÉBY, 2009); é muito heterogêneo, abrangendo espécies com grande variedade de propriedades fenotípicas, bioquímicas e fisiológicas, não são móveis em sua grande maioria, catalase e oxidase negativas, não reduzem nitrato, não produzem indol ou H_2S e nem formam esporos. Podem ser encontrados em diversos produtos alimentícios devido ao seu potencial probiótico (KONEMAN *et al*., 2005).

A heterogeneidade é refletida pela taxa de porcentagem do conteúdo de guanina e citosina (GC) do DNA das espécies incluídas neste gênero. Três subgrupos de classificação dos lactobacilos foram criados baseando-se nas características fisiológicas de diferentes espécies, relacionadas com a presença ou ausência de enzimas essenciais no metabolismo homo ou heterofermentativo do açúcar (LEITE *et al*., 2012).

Este gênero exerce papel crucial na produção de alimentos fermentados, como vegetais, carnes e produtos lácteos. Nas últimas décadas vem sendo amplamente aplicados na indústria de alimentos, como cultura iniciadora (starter) e cultura adjunta (incluindo probióticos), aumentando o interesse no estudo de suas funções e metabolismo. Geralmente, são os mais ácido-tolerantes do grupo das BAL e, portanto, estão ativos no final de muitos processos fermentativos espontâneos, como fermentação de silagens e vegetais (LEITE *et al*., 2012).

2.7.1.2 Gênero *Lactococcus* sp.

Este gênero apresenta-se como células gram-positivas esféricas ou ovoides de 0,5 – 1,2 x 0,5 – 1,5 µm, ocorrendo em pares ou pequenas cadeias em meio líquido, são imóveis e não produzem a enzima catalase (RATTRAY & O´CONNELL, 2011). São anaeróbicos

facultativos, oxidase negativa, não formam endósporos e crescem geralmente entre 10 °C e 30 °C (HUTKINS, 2006).

É comumente encontrado em superfícies de plantas, peles de animas e em leite; são homofermentativos, com exceção da subespécie *lactis* que utiliza o citrato, recentemente reconhecida como *L. lactis* (BESHKOVA *et al*., 2002).

O gênero inclui 6 espécies (EUZÉBY, 2008), a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris* são as duas subespécies mais utilizadas como cultura *starter* na indústria de produtos lácteos, principalmente na fabricação de queijos (RATTRAY & O´CONNELL, 2011; CASALTA & MONTEL, 2008).

Nos últimos anos, estudos mostraram que esse microrganismo é capaz de melhorar o equilíbrio da microbiota intestinal de hospedeiro animal, sendo utilizado como microrganismo probiótico. O principal papel do *Lactococcus* sp. na fermentação de alimentos é a acidificação (produção de ácido lático L^+). Este gênero também contribui para o desenvolvimento da textura, devido à produção de exopolissacarídeos, ou para o *flavor* devido à produção de compostos aromáticos (álcoois, cetonas e aldeídos) ou pelos metabólitos gerados pela utilização do citrato, aminoácidos e lipídeos. Também podem ser utilizados para conservação, devido a sua habilidade em produzir ácidos orgânicos e bacteriocinas, sendo a nisina a mais caracterizada e reconhecida (RATTRAY & O´CONNELL, 2011).

2.7.1.3 Gênero *Leuconostoc* sp.

É pertencente à família Streptococcaceae, são cocos gram-positivos, microaerofílica e não hemolítico, crescendo em pares ou em cadeias, anaeróbicos facultativos, que não produzem a enzima catalase. Morfologicamente, são similares aos *Streptococcus* sp., entretanto são heterofermentativos (OGIER *et al*., 2008).

Estes microrganismos são geralmente encontrados em plantas e a partir deste habitat natural, disseminaram-se para vários nichos, incluindo leite cru e produtos lácteos refrigerados, exercendo papel importante na indústria e processos de fermentação de alimentos como linguiças, vegetais, cereais e produtos lácteos (MARTÍNEZ- PAJAREZ *et al*., 2012).

Eles estão naturalmente presentes na obtenção de produtos lácteos, variedade de queijos, bebidas fermentadas e são amplamente utilizados como starters. Além disso, também possuem um papel essencial na formação da textura e aroma dos produtos lácteos. Algumas linhagens produzem dextrana quando cultivados em sacarose (RODRIGUES *et al*., 2005),

participando na produção de oligossacarídeos, que influenciam na textura, além da aplicação funcional como prebiótico. Alguns estudos mostraram que este gênero é capaz de produzir bacteriocinas em produtos lácteos (RODRIGUES *et al*., 2005). As bacteriocinas são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antibiótica, produzidas por determinadas linhagens de bactérias lácticas que se caracterizam por apresentarem em espectro de ação restrito aos microrganismos gram-positivos (MORENO *et al*., 2008).

2.7.1.4 Gênero *Enterococcus* sp.

Está amplamente presente na natureza, são bactérias homofermentativas, gram positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, cocos anaeróbios facultativos, pouco acidificantes e que podem ocorrer isoladamente, em pares ou em cadeias. São resistentes a situações extremas de pH e temperatura (QUIÑONES PÉREZ *et al*., 2011).

Bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp. apresentam um papel importante na produção de vários alimentos fermentados tradicionais na Europa (FRANZ *et al*., 2003), como a produção de vários queijos tradicionais de países do Mediterrâneo provocando a maturação desses queijos, provavelmente através da proteólise, lipólise e quebra do citrato, contribuindo para a textura, sabor e *flavor* característicos (FERREIRA, 2012; MORENO *et al*., 2006). Essas bactérias também podem estar presentes em outros tipos de alimentos fermentados, como linguiças e azeitonas (HUGAS *et al*., 2003).

Algumas bactérias do gênero *Enterococcus* estão sendo usadas como probióticos em alguns países (FRANZ *et al*., 2003), tais como o *E. faecium* e o *E. faecalis*. No Brasil, a ANVISA já inclui o *E. faecium* na lista dos microrganismos probióticos. Desde fevereiro de 2004, 10 preparações, contendo 9 cepas diferentes de *E. faecium*, estão autorizadas como aditivos em alimentos na União Européia (MORENO *et al*., 2006).

2.7.2 Leveduras

São fungos unicelulares, da classe hemiascomicetos, frequentemente associados às indústrias de processamento de alimentos e bebidas (SILVA *et al*., 2009). Embora a maioria das leveduras reproduzam-se apenas como células individuais, algumas podem formar filamentos, sob certas condições. Os fungos podem ter duas formas, uma sexual (teleomorfo), que é considerada perfeita, e uma assexual (anamorfo), que é considerada imperfeita (SILVA *et al*., 2009).

Vários estudos revelam a presença do gênero *Candida* na fermentação de mandioca, algumas espécies do gênero *Candida* foram isoladas da fermentação de mandioca para produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), *Candida rugosa*, *C. humilis* e *C. ethanolica* (LACERDA *et al*., 2005), e de gari, *C. guilliermondii*, *C. maris* e *C. glabrata* (OGUNTOYINBO, 2008). Esta última também foi isolada do lafun, produto obtido da fermentação da mandioca consumido na Nigéria, juntamente com *Pichia scutulata*, *Kluyveromyces marxianus*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia kudriavzevii* e *Trichosporon asahii* (PADANOU *et al*., 2009).

2.7.3 Associação entre Bactérias do ácido lático e leveduras

Estudos relatam que a associação entre BAL e leveduras pode contribuir para a melhoria das características organolépticas do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (PARAMITHIOTIS *et al*., 2006; MIAMBI *et al*., 2003). As BAL produzem uma condição ácida que, apesar de inibir o crescimento de alguns microorganismos, favorece o crescimento de leveduras. Por outro lado, as leveduras fornecem fatores de crescimento para as BAL. Além disso, algumas BAL são produtoras de α-amilase que, ao hidrolisarem a molécula de amido formam derivados utilizáveis pelas leveduras.

Algumas BAL e leveduras associadas em alimentos fermentados são capazes de degradar fatores antinutricionais, como ácido fítico e compostos fenólicos. A incorporação destes microrganismos como culturas iniciadoras pode, no entanto, servir para melhorar ou aumentar o valor nutricional dos alimentos. Além disso, culturas selecionadas servem para aumentar os benefícios gerais da fermentação espontânea, tais como o aumento da digestão de proteínas e a biodisponibilidade de nutrientes, e contribuem mais especificamente para o enriquecimento biológico através da biossíntese de vitaminas e aminoácidos essenciais (HOLZAPFEL, 2002).

Mugula *et al*. (2003), ao estudar o uso de BAL e leveduras como culturas iniciadoras para o preparo de togwa, um alimento fermentado da Tanzânia, feito a partir de milho e sorgo, observaram que as BAL mostraram habilidade de fermentar a massa e aumentar a acidez. Como culturas puras, as leveduras mostraram baixa atividade com 12 horas de fermentação, mas diminuíram levemente o pH e aumentaram a acidez do meio em 24 horas.

A grande variação e a complexidade da microbiota durante a fermentação espontânea de mandioca são apontadas como os principais fatores responsáveis pela pouca homogeneidade e baixa qualidade dos produtos comercializados, sendo a utilização de

linhagens selecionadas uma importante alternativa para estes processos fermentativos. A fermentação conduzida por linhagens iniciadoras apresenta menor variação no conteúdo de compostos químicos, menor tempo de fermentação e, por consequência, maior rendimento e qualidade (AIDOO *et al*., 2006).

2.8 MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DE DIVERSIDADES MICROBIANAS

2.8.1 Utilização da biologia molecular para determinação da microbiota do polvilho azedo e outros produtos fermentados derivados da mandioca

A microbiota de fermentações tradicionais tem sido muito estudada, mas não de forma sistemática por falta de informações sobre as condições de fermentação e a identificação das espécies, que é muitas vezes baseada apenas em critérios fisiológicos, conhecidas por serem insuficientes para a identificação de BAL (VOGELMANN *et al*., 2009).

A abordagem molecular permite que as bactérias possam ser identificadas a partir das sequências dos seus genes, por meio da amplificação, via PCR (Polimerase Chain Reaction). A amplificação dos genes de determinadas espécies, oriundas de uma amostra proveniente de um ecossistema complexo, como o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), incluindo aquelas que ainda não são cultiváveis, requer iniciadores que complementem sequências altamente conservadas. Por outro lado, a diferenciação entre as espécies, a partir dessas sequências, requer que a região amplificada tenha regiões variáveis que são específicas para cada espécie (KALRA *et al*., 2007).

Ben Omar *et al*. (2000) conseguiram identificar e discriminar estirpes de BAL isoladas a partir do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) ao estudarem a diversidade molecular durante a fermentação da mandioca para a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). As técnicas de monitoramento aplicadas foram "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD), hibridização usando sondas filogenéticas de RNA e sequenciamento parcial da subunidade 16S do RNA. Os resultados revelaram uma alta riqueza de espécies, incluindo *Lactobacillus manihotivorans, L. plantarum, L. casei, L. hilgardii, L. bucheneri, L. fermentum, Ln. mesenteroides* e o gênero *Pediococcus*. As espécies predominantes foram *L. plantarum* e *L. manihotivorans.*

Foi descrito que durante a fermentação de mandioca para a produção de gari na África do Sul, Benim, Quênia e Alemanha foram caracterizados 375 BAL por testes fenotípicos e genotípicos. Os grupos isolados em ordem decrescente de predominância foram: bastonetes

heterofermentativos facultativos, principalmente cepas do grupo *L. plantarum* (54,4 %); bastonetes heterofermentativos obrigatórios, pertencentes ao gênero *Lactobacillus* ou *Weissella* (14 %); cocos heterofermentativos, pertencentes aos gêneros *Weissella* ou *Leuconostoc* (13,9 %); cocos homofermentativos (13,3 %) e bastonetes homofermentativos obrigatórios (KOSTINEK *et al*., 2007).

A adaptabilidade de BAL e leveduras em amido fermentado preparada a partir de cereais, pseudocereais e mandioca foi investigada por VOGELMANN *et al*. (2009). Por comparação dos padrões de RAPD dos isolados obtidos da fermentação foi possível rastrear a origem das BAL e leveduras predominantes na microbiota. Guyot *et al*. (2003) foram bem sucedidos em seus estudos, ao caracterizar e diferenciar linhagens de *L. manihotivorans* isoladas de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) usando a técnica da análise de RFLP .

O processo fermentativo para a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) ainda é pouco estudado, mesmo ganhando destaque na elaboração de produtos de panificação com reduzido teor ou ausência de glúten. Desta forma, a análise da microbiota predominante na fermentação de mandioca, bem como o isolamento e a pesquisa de culturas predominantes contribuem significativamente para o conhecimento e otimização do processo de produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). Isso porque podem levar à redução do tempo de fermentação, à obtenção de um polvilho padronizado e de maior qualidade, facilitar a determinação do ponto final da fermentação, além de aumentar a lucratividade do produtor.

2.8.2 PCR

A técnica de PCR consiste de uma reação de polimerização em cadeia para amplificação de sequência de DNA por uma reação enzimática utilizando *primers* iniciadores (COSER *et al*., 2008). Sendo assim, através da PCR, pode-se obter *in vitro* um aumento da quantidade de uma determinada sequência de DNA, permitindo uma serie de aplicações nas mais diferentes áreas da ciência. Em microrganismos, a PCR vem sendo aplicada na determinação de grupos taxonômicos (REIS JUNIOR *et al*., 2002).

2.8.3 Estudo da diversidade microbiana por meio da análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)

Apesar da rapidez e facilidade para identificação das bactérias por sequenciamento, o custo para a operacionalização desta tecnologia é um fator limitante para muitos laboratórios. Como alternativa, foi desenvolvida a PCR - ARDRA (Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado), que é mais trabalhosa e econômica.

A técnica conhecida como ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)* explora o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar as sequências do rDNA de microrganismos, seguida pela digestão com enzimas de restrição para determinar a diversidade e identificar/classificar os isolados. Esta técnica se baseia nas enzimas selecionadas por sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e o grau de conservação dos sítios de restrição do rRNA que reflete padrões filogenéticos (REIS JÚNIOR *et al*., 2004).

O perfil gerado por ARDRA é distinto entre os grupos, podendo se diferenciar dentro de um mesmo grupo (DUBERNET *et al*. 2002; COLLADO & HERNÁNDEZ, 2007). Quando utilizada para diferentes bactérias, esta metodologia combina facilidade, rapidez, especificidade e sensibilidade, se mostrando bastante eficiente na diferenciação das espécies dos gêneros *Lactobacillus, Streptococcus* e *Bifidobacterium* (MITEVA *et al*., 2001; COLLADO & HERNÁNDEZ, 2007). A metodologia da ARDRA é usada para a identificação de LAB ao nível de espécie. Além disso, a maior parte dos gêneros co-isolados com *Lactobacillus* pôde ser identificada com precisão através da ARDRA da 16S-23S rRNA (MOREIRA *et al*., 2005).

O gênero *Lactobacillus* apresenta um perfil de amplificação da região 16S- 23S. Segundo Moreira *et al*. (2005), o padrão de amplificação e o perfil de digestão permite a identificação de diferentes espécies de *Lactobacillus*, o que indica ser uma metodologia fácil e rápida para identificação de bactérias lácticas.

No caso da análise da microdiversidade em procariotos, que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S rDNA. Essa região intergênica apresenta maior variabilidade, não só na sua composição de bases, como também no seu tamanho, ao ser comparada às regiões gênicas 16S ou 23S, eles geram padrões de bandeamentos mais simples, dependendo das enzimas de restrição utilizadas (ROSADO *et al*., 1999.)

2.8.4 RAPD

Esta técnica consiste na amplificação do DNA utilizando um iniciador randômico geralmente composto de 10 nucleotídeos à baixa temperatura de anelamento (36°C), sem conhecimento prévio da sequência a ser amplificada e pode ser aplicado para qualquer espécie a partir do DNA purificado. Os produtos são diretamente analisados em um gel de agarose, e o perfil eletroforético gerado pode servir para diferenciar e caracterizar microrganismos (MARTÍN *et al*., 2010; DELFEDERICO *et al.*, 2006; GOLOWCZYC *et al*., 2008). Porém, a reação é muito sensível às condições de amplificação, qualidade e concentração de DNA, os quais influem na reprodutibilidade do método (MARTÍN *et al*., 2010; URRAZA, 2000). Esta amplificação revela polimorfismos em toda a extensão do genoma e são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genomas em relação à ausência deste mesmo fragmento em outro.

Fenótipos moleculares gerados por RAPD podem servir para diagnosticar diferentes níveis taxonômicos e os produtos de amplificação podem ser classificados em dois grupos: variáveis (polimórficos) e constantes (não- polimórficos) (ANCHORENA-MATIENZO, 2002).

Em leveduras, RAPD foi utilizado para a caracterização de produtos de fusão de protoplastos e seus segregantes, detectando-se uma banda cromossomal nos produtos de fusão, presentes nas linhagens parentais e segregantes (ANCHORENA-MATIENZO, 2002).

2.9 COMPOSTOS VOLÁTEIS

A aceitação dos alimentos está diretamente relacionada ao seu sabor relacionado às sensações que o gosto e o aroma provocam. A sensação de gosto é atribuída à presença dos compostos não voláteis nos alimentos (tais como açúcares, sais, ácido, limonina) determinando as 4 sensações básicas descritas como doce, salgado, azedo e amargo. Já os compostos voláteis, são responsáveis pela sensação do aroma, que é bem mais complexa, pois o olfato humano pode discriminar entre milhares de compostos voláteis, de diferentes classes químicas e termolábeis (FRANCO & JANZANTTI, 2004; THOMAZINI & FRANCO, 2000).

O aroma característico dos alimentos é geralmente o resultado de dezenas ou centenas de compostos voláteis, encontrados em nível de traços. Mesmo os compostos voláteis presentes em concentrações muito baixas, em nanograma ou picograma, influenciam na formação do aroma característico do alimento. Porém em alguns alimentos, existem os compostos voláteis considerados de impacto, que sozinhos são capazes de “lembrar” o aroma

do alimento, enquanto os demais compostos voláteis são denominados contribuintes, que juntos formam o aroma pleno do alimento (GARRUTI *et al*.,2003).

As BAL acidificam o meio de fermentação melhorando o aroma dos alimentos (ácido acético e lático) (ATRIH *et al*., 2001; MESSENS & DE VUYST, 2002; NARDI *et al*., 2005). De acordo com Kimaryo *et al*. (2000), os microrganismos do processo de fermentação, podem contribuir com as características sensoriais de alimentos fermentados.

É importante destacar que o teor e a composição química dos compostos voláteis de uma mesma espécie vegetal podem variar significativamente em qualidade e quantidade de acordo com as diferenças geográficas, em função do clima, da composição do solo, fase do ciclo vegetativo, sazonalidade, entre outros (WANG *et al*., 2009; SOUSA GALVÃO *et al*., 2011).

2.9.1 Isolamento dos compostos voláteis

A pesquisa de compostos voláteis é analisada pela técnica de cromatografia gasosa, onde ocorre a separação, quantificação e identificação dos analitos. Na pesquisa com compostos voláteis, é importante o isolamento das substâncias voláteis da matriz com a intenção de extinguir interferências ajustando também a concentração.

Para ser avaliada, uma mínima manipulação do alimento é necessária para não causar mudanças na composição original dos compostos voláteis e a presença de compostos não voláteis ou artefatos gera um isolado não representativo do verdadeiro aroma percebido pelo olfato, o que afeta a pesquisa do sabor (THOMAZINI & FRANCO, 2000; GARRUTI *et al*., 2003). A etapa do isolamento dos compostos é considerada crítica e as técnicas mais indicadas são aquelas que compreendem uma única etapa, a separação dos compostos voláteis dos não voláteis e sua concentração (FRANCO & JANZANTTI, 2004).

As técnicas de isolamento utilizadas para alimentos baseiam-se na análise total ou na análise do *headspace* (ROMEU-NADAL *et al*., 2004). A primeira consiste na análise de todos os componentes voláteis do alimento usando a extração líquido-líquido, extração em fase sólida e extração por arraste a vapor, técnicas de grande aplicabilidade (REINECCIUS, 2006) e a análise pelo *headspace* analisa os compostos voláteis da fase gasosa em equilíbrio com a fase líquida ou sólida do alimento em um sistema fechado à determinada temperatura (THOMAZINI & FRANCO, 2000; FRANCO & JANZANTTI, 2004).

2.9.1.2 Extração por *headspace*

O aroma é mais bem analisado pela composição dos voláteis do *headspace* (FRANCO & JANZANTTI, 2004). A principal característica é a possibilidade da determinação direta de componentes voláteis da amostra, uma vez que a introdução da amostra no cromatógrafo a gás ocorre sem pré-tratamento ou com reduzido manuseio da amostra (SOARES *et al*., 2007). Além disso, a extração por headspace apresenta outras vantagens em relação aos métodos que utilizam solventes, tais como clorofórmio, éter de petróleo e hexano, com destaque à reduzida massa para extração (VARMING *et al*., 2004; KAFKAS *et al*., 2005; HELENO *et al*., 2010).

A análise do *headspace* pode ser feita pelo método estático ou dinâmico. O *headspace* estático é a análise direta dos compostos voláteis que apresentam maior pressão de vapor em um sistema fechado e permite a detecção de poucos compostos voláteis (THOMAZINI & FRANCO, 2000; FRANCO & JANZANTTI, 2004). O *headspace* dinâmico é uma técnica que envolve a passagem dos compostos voláteis do alimento através de um polímero poroso (Tenax, Chromosorb, Porapak, entre outros), com o auxílio de um sistema a vácuo ou pela passagem de um gás inerte. Os compostos voláteis retidos no polímero podem ser eluídos com solvente ou desorvidos diretamente no injetor do cromatógrafo permitindo a realização de análise qualitativa, quantitativa e sensorial dos compostos voláteis responsáveis pelo aroma do alimento (MIYAZAWA & OSMAN, 2001).

2.9.2 Identificação de voláteis em fermentação

Franco e Janzantti (2004) reportaram a existência de duas abordagens para o isolamento dos compostos voláteis de um alimento, a análise total, que compreende a análise de todos os compostos voláteis presentes na matriz do alimento, e a análise do *headspace*, que envolve apenas a análise dos componentes voláteis presentes na fase gasosa em equilíbrio com a amostra (líquida ou sólida), representando mais fielmente o que é percebido pelo olfato.

Atualmente é muito utilizada a técnica de espectrometria de massas acoplada ao CG, muito utilizada para identificar os elementos presentes na amostra, caracterizando as moléculas pela relação massa/carga (m/z) de seus íons, podendo até mesmo discriminar a massa dos isótopos da molécula de interesse (HOLLER *et al*., 2009).

As características dos espectros de massas são usadas na identificação de uma grande variedade de compostos orgânicos, nas quais as relações massa/carga obtidas podem ser transformadas em informação estrutural a partir de estudos sobre mecanismos de

fragmentação dos compostos e também podem ser comparadas a espectros padrão, armazenadas na memória do computador (FRANCO & JANZANTTI, 2004).

2.10 ÁCIDOS ORGÂNICOS

As aplicações dos ácidos orgânicos são diversas na indústria de alimentos, nas áreas química e veterinária. Na indústria de alimentos, agem como aromatizantes e conservadores retardando a degradação enzimática e agem diretamente como fortes inibidores do crescimento microbiano na preservação de alimentos, grãos e rações (RICKE, 2003), na sanitização da carne (AL-TARAZI & ALSHAWABKEH, 2003) e como aditivo promotor de crescimento na ração em substituição aos antibióticos (GARCIA *et al*., 2000). Além disso, podem atuar como agentes que se ligam a metais formando os quelatos metálicos, os quais previnem ou reduzem a oxidação de metais (RICKE, 2003).

Como agentes antimicrobianos naturais, a ação conservadora dos ácidos orgânicos resulta da acidificação (decorrente da fermentação), atuando sobre a força próton motriz (FPM) dos microrganismos, que controla a síntese de ATP e o acúmulo de íons e outros metabólitos no interior das células e com o seu colapso ocorre a paralisação de todas as reações que requerem energia, levando à morte celular (MCAULIFFE *et al*., 2001).

2.10.1 Ácidos orgânicos na fermentação de amido de mandioca

O processo fermentativo do amido de mandioca foi estudado por Demiate *et al*. (1999), onde analisaram diferentes amostras de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). Os autores avaliaram 29 amostras de amido de mandioca fermentado das regiões Sul e Sudeste adquiridos diretamente das fábricas ou do comércio, das 8 amostras do estado do Paraná, somente uma não apresentou ácido butírico na sua composição; das 11 amostras de Santa Catarina, seis apresentaram os ácidos típicos do amido de mandioca fermentado (ácidos lático, acético, butírico e propiônico) e 5 apresentaram ácido lático e acético ou somente ácido lático; das 6 amostras de Minas Gerais, 5 apresentaram ácido lático e acético e, somente uma apresentou ácido butírico em sua composição, demonstrando grande heterogeneidade no perfil de ácidos orgânicos obtidos na fermentação do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

Reginatto *et al*. (2009) realizaram modificações no meio de fermentação do amido através da adição de glicose como fonte de carbono e de cloreto de amônio como fonte de

nitrogênio para verificar e efeito desses sobre a produção de ácidos orgânicos e as características do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). Foi verificado que a adição de nitrogênio promoveu o aumento da concentração de ácidos orgânicos nas águas de fermentação, especialmente os de cadeia mais longa, como o propiônico. A adição de cloreto de amônio 0,1% (p/v) no meio fermentativo propiciou um incremento em torno de 50%, na produção de ácidos orgânicos na água de fermentação sem alterar a característica de expansão do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

Mestres e Rouau (1997), ao analisarem amostras produzidas na Colômbia, encontraram aproximadamente 0,6 g de ácido láctico por 100 g de amido. Escobar e Molinari (1990) detectaram ácidos láctico, acético e butírico e encontraram uma correlação positiva entre o teor de ácido, a expansão e capacidade de ligação de água. A correlação positiva é que o teor de ácido orgânico produzido durante a fermentação, contribuirá na maior capacidade de expansão e de ligação de água dentro do grânulo de amido. Quanto maior a hidratação, melhor a capacidade de expansão.

2.11 RELAXAÇÃO MOLECULAR

A relaxometria é uma técnica para a caracterização dos domínios da cadeia polimérica (KIMMICH *et al*., 2005). A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é capaz de analisar amostras empregando equipamentos de alta e baixa resolução, avaliando as amostras em seus estados físicos e a análise de diferentes núcleos, possibilita ainda a utilização de um conjunto de técnicas não destrutivas que informam tanto sobre a estrutura química quanto a dinâmica molecular.

A RMN é uma espectroscopia que analisa o comportamento do *spin* nuclear perante a ação de um campo magnético externo e forte que permite analisar diferentes núcleos de uma amostra, empregando uma sequência de pulsos específica. Equipamentos de baixa resolução em baixo campo vêm sendo utilizados, com êxito, para informar sobre a morfologia, a interface química e dinâmica do nanocompósito, assim como a interação entre os componentes do material, forma de dispersão, homogeneidade e tipo de reação química (TAVARES & SILVA, 2011; SCHLEMMER *et al*., 2010).

De acordo com essas características da RMN, as análises do núcleo de hidrogênio são fundamentais para o estudo de diferentes sistemas por meio da análise da dinâmica molecular (MAUNU, 2002; ABBASI *et al*., 2011). As modificações que ocorrem no grânulo de amido podem ser verificadas por RMN, já que os métodos de relaxamento são sensíveis às mudanças

naturais que ocorrem no interior dos grânulos (TANG *et al*., 2000; TANG *et al*., 2001). Podemos, portanto, utilizar a RMN para comparar a propriedades organizacionais de diferentes amidos, tais como mobilidade e gelatinização (CHATAKANONDA *et al*., 2003).

3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, um grande número de indivíduos, em muitas sociedades ocidentais, adota uma dieta livre de glúten, evitando trigo, centeio e cevada. Embora existam pelo menos três condições clínicas reconhecidas e relacionadas com o glúten - doença celíaca, alergia ao trigo e sensibilidade ao glúten (mas não-celíacos) - a maioria das pessoas que adotaram uma dieta livre de glúten, não tem aconselhamento clínico para tal escolha.

O mercado de produtos sem glúten tem crescido rapidamente, abrindo oportunidades para o desenvolvimento de novas tecnologias que utilizam ingredientes sem glúten como alternativa para a fabricação de produtos de panificação. O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) pode ser usado como um adjuvante para a fabricação de pão, ou como o principal ingrediente para pães sem glúten.

Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) é o produto resultante de fermentação seguida de secagem ao sol e tem sido utilizado para a produção de tipos especiais de pães e biscoitos sem glúten, que estão se tornando muito populares em alguns países da América do Sul.

A fermentação natural de mandioca é um processo comumente realizado em pequenas fábricas (fecularias) no interior do país e é predominantemente realizada por bactérias ácido-láticas e leveduras. A fermentação é realizada por um período de cerca de 30-40 dias e o produto obtido é seco ao sol durante um período, que dependendo da estação do ano e das condições climáticas, gera produtos sem uniformidade e homogeneidade.

A mandioca é fonte de alimentos e calorias da dieta para grandes populações de países tropicais da Ásia, África e América Latina. No Brasil, a produção de mandioca está em progressão e estima-se que nos próximos 30 anos, a produção atinja 106 milhões de toneladas.

O amido de mandioca tem diversas aplicações na indústria, como em alimentos, papel, e adesivos; no entanto, uma pequena porção de amido é utilizada em seu estado nativo, a maior parte é modificada por agentes químicos ou físicos.

É comum ocorrer variações na qualidade do produto final a partir de diferentes produtores e até mesmo a partir da mesma matéria-prima no mesmo produtor, uma vez que não há parâmetros de controle aplicados ao processo. Tendo em vista a necessidade de padronização e melhoria do processo de fabricação brasileira, o conhecimento e caracterização do produto ao longo do processo de fabricação poderá ser útil, para o

planejamento e obtenção de produtos de melhor qualidade tecnológica para atender ao desenvolvimento de novos produtos à base de amido de mandioca.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar o polvilho doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) produzido em uma polvilharia do Nordeste do Brasil, identificando os microrganismos responsáveis pela sua fabricação e avaliando as características físico-químicas visando aplicações tecnológicas do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) obtido e modificações durante o processo de produção, tendo em vista a necessidade de padronização e melhoria do processo de fabricação brasileira, pois o conhecimento e caracterização do processo de fabricação e do produto final podem servir de base para o planejamento e obtenção de produtos controlados, superiores aos produzidos atualmente.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as bactérias e leveduras da microbiota da fermentação natural do polvilho doce por técnicas moleculares baseadas em PCR, como RAPD-PCR e ITS-PCR, e sequenciamento parcial do gene *rrs* e região ITS
- Identificar as bactérias e leveduras da microbiota do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por técnicas moleculares baseadas em PCR, como RAPD-PCR e ITS-PCR, e sequenciamento parcial do gene *rrs* e região ITS
- Determinar as características físico-químicas das amostras de polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) tais como acidez titulável, pH, umidade, identificação compostos voláteis e ácidos orgânicos produzidos pela fermentação e tempo de relaxação molecular, utilizando técnicas de titulação com NaOH 0,1N, potenciometria, secagem em estufa, CG/MS, HPLC e RMN de baixo campo
- Determinar as propriedades de pasta do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) produzido comparando ao polvilho doce, através da determinação dos parâmetros temperatura de pasta, viscosidade máxima, viscosidade mínima a quente, quebra de viscosidade, viscosidade final, tendência à retrogradação e tempo para atingir a viscosidade máxima
- Identificar pontos de melhoria do processo de produção que poderiam ser controlados de modo a padronizar a produção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho

azedo), garantindo as únicas e específicas propriedades tecnológicas que somente o produto final obtido da mandioca é capaz de apresentar.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 POLVILHO FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivada no estado do Paraná, localizado na região sul do Brasil, foi utilizada em uma polvilharia de pequena escala, localizada na cidade de Vitória da Conquista – BA, no Nordeste brasileiro para a obtenção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). A mandioca foi lavada, descascada e lavada pela segunda vez para a retirada de sujeiras. Posteriormente, a mandioca foi ralada e a massa obtida foi lavada novamente e coada em tecidos de malha fina até que a água de lavagem ficasse com uma coloração transparente. O extrato úmido de amido obtido foi seco ao sol por 12 h.

O extrato de amido seco ao sol foi colocado em tanques de polietileno com 1,63 m de altura, com 5000 litros de capacidade, cobertos com uma camada de água com cerca de 20 cm e permitiu a fermentação natural por 30 dias à temperatura ambiente (cerca de 18 °C no inverno). Após este período de 30 dias, o polvilho fermentado foi colocado em lona preta de polietileno de alta densidade (PEAD) e seco ao sol por 12 h. O polvilho foi coletado no primeiro dia de fermentação (*t=1*) e após trinta dias de fermentação (*t=30*) dias de fermentação juntamente com o produto final, o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), para análises posteriores.

5.2 CONTAGEM DOS MICRORGANISMOS

A contagem da microbiota foi realizada no início da fermentação (*t=1*), após 30 dias de fermentação (*t=30*) e no produto final, polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). Para a contagem e identificação das bactérias ácido-láticas, placas com os meios ágar M17 (HIMEDIA, Mumbai, Índia) foram incubadas a 30 ºC por 48 h, ágar lactobacilli MRS (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) a 37 ºC por 4 dias sob jarras de anaerobiose Gaspak (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) e ágar base azida sangue (Becton, Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) a 37 ºC por 4 dias. Para a contagem e isolamento das leveduras, o ágar extrato de malte (HIMEDIA, Mumbai, Índia) e YPD 2% (2% de peptona, 1% de extrato de levedo e 2% de glicose) foram utilizados, incubados a 25 º C por 7 dias. As colônias com morfologias distintas foram selecionadas aleatoriamente e as culturas foram estocadas no caldo correspondente do isolamento descrito acima contendo 20% de glicerol, até análise subsequente.

5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS MICRORGANISMOS

Moldes de DNA foram obtidos como descrito por Sambrook e Russel (2001) e quantificados com o kit Qubit dsDNA HS (Invitrogen™, Grand Island, New York, USA). A amplificação parcial dos fragmentos do gene *rrs*, utilizando o par de *primers* 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) e 1512R (5´-ACGGCTACCTTGTTACGACT-3´), descritos por Wang *et al*. (2006), foi realizada utilizando Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Grand Island, New York, USA) em um termociclador de DNA (MyCyclerTM140 , Bio-rad, Hercules, CA, USA).

Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *ApaI*, *XhoI* (Promega, Madison, USA) e *DdeI* (Fermentas, São Paulo, Brasil). Foi utilizada 1U das enzimas *ApaI*, *XhoI* e *DdeI*, 2 µL do tampão de cada enzima, 500 ng de produto amplificado em um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 37 °C por 1 h e depois paralisada a 65 °C por 20 min. O perfil dos fragmentos da digestão foi determinado por eletroforese em gel de agarose 1,2 % e a eletroforese foi efetuada em tampão TAE 1X durante 70 min a 100V e 200 mA. Os géis foram corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) diluído a 1:10,000 e documentados sob luz UV utilizando Pro MiniBis (DNR Bio-Imaging Systems, Hamisha, Israel) usando o software GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems, Hamisha, Israel). Perfis representativos de cada espécie observada na amplificação seguida de digestão do DNA ribossomal foram selecionados para o sequenciamento.

Moldes de DNA de levedura foram analisados por RAPD-PCR, utilizando o *primer* EI1 (5’-CTG GCT TGG TGT ATG -3’) (BARROS LOPES, 1996), para verificar diferenças entre as amostras. Foi realizada uma reação com volume final de 20 µL, contendo 4 µL de tampão (10X PCR), 50 mM $MgCl_2$, 10 mM de cada DNTP, 10 pmol do oligonucleotideo: *EI1* (5’-CTG GCT TGG TGT ATG -3’), 100 ng de DNA da amostra e 1,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™, Grand Island, EUA). As condições da reação foram: 92°C por 3 min seguido por 40 ciclos de 92 °C por 1 min; 35 °C por 1 min e 72 °C por 1:30 min e um a etapa de extensão de 72 °C por 10 min e resfriamento a 4°C.

O perfil de bandas foi observado em gel de eletroforese a 1%, posteriormente corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) diluído 1:10,000 e documentado sob luz UV Pro MiniBis (DNR Bio-Imaging Systems, Hamisha, Israel) usando o software GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems, Hamisha, Israel).

Os perfis representativos foram selecionados e amplificados com o par de *primers* ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) e ITS4 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) como descrito por Naumova *et al*. 2005. A amplificação foi dada em uma reação com volume final de 50 µL, contendo 10 µL de tampão (10X PCR), 50 mM $MgCl_2$, 10 mM de cada DNTP, 20 pmol de cada oligonucleotideo: *ITS1* (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) e *ITS4* (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´), 100 ng de DNA da amostra e 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições da reação foram: 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 15 seg; 53,7 °C por 25 seg e 72 °C por 20 seg e uma etapa de extensão de 72 °C por 5 min e resfriamento a 4°C.

O perfil de bandas foi observado em gel de eletroforese 2%, posteriormente corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) diluído 1:10,000 e documentado sob uma luz UV Pro MiniBis usando o software GelCapture (DNR Bio-Imaging Systems).

Os produtos de PCR selecionados, de bactérias e leveduras, foram purificados com o kit PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare Life Science Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). A análise do sequenciamento do gene *rrs* e sua região ITS foi realizado com um sequenciador 3130 (Applied Biosystems Inc., Tokyo, Japan) e, posteriormente, usado para identificação em nível de espécie das bactérias e fungos, respectivamente. As identidades das sequências foram determinadas utilizando o algoritmo BLASTN na base de dados GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

5.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLVILHOS

5.4.1 Avaliação do teor de umidade

O teor de umidade dos polvilhos analisados foi determinado de acordo com o protocolo da American Association of Cereal Chemists Internacional Approved Method 44-15.02 (AACC, 2010).

5.4.2 Teor aparente de amilose e amilopectina

O teor de amilose aparente foi estimado em quadruplicata por colorimetria (iodo) de acordo com o método número 66470 da International Organization for Standardization (ISO, 1987). A absorbância foi medida num espectrofotômetro de DU-730 (Beckman Coulter,

Fullerton, EUA) a 620 nm. A porcentagem do teor de amilopectina foi estimada por diferença (teor percentual de amilopectina = 100 - teor percentual de amilose aparente).

5.4.3 Determinação de acidez total titulável e pH

A acidez total titulável e pH foram determinadas de acordo com os métodos 016/IV e 017/IV, respectivamente, do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), utilizando um potenciômetro calibrado.

5.4.4 Determinação do teor de ácidos orgânicos

O teor de ácidos orgânicos dos polvilhos foi determinado como descrito por Leite *et al*. (2013). Sucintamente, 25 mL de H_2SO_4 (45 mmol.L^{-1}) foram adicionados a 5 g de polvilho e homogeneizados por 1 h em um agitador rotatório a 250 rpm. O sobrenadante resultante a partir da centrifugação a 6000*x* g foi filtrado através de filtros de 0,45 µm (Millipore Corp, Billerica, USA). As amostras filtradas foram injetadas (50 µL) em um sistema de HPLC (Shimadzu Corp, Tokyo, Japan) equipado com uma coluna de fermentação HPX - 87H Aminex (150 x 7,8 mm ID, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA), protegida por uma coluna guarda (30 x 4,6 mm I.D; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA). A fase móvel (isocrática) foi de H_2SO_4 3 mM em um fluxo de 0,7 mL.min^{-1} a 65 °C. Os ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico, succínico, butírico e propiônico) foram quantificados usando um detector de arranjo de diodos modelo SPD-M20A (Shimadzu Corp, Tokyo, Japan) monitorados com absorbância a 210 nm. Os cromatogramas a partir do HPLC e a quantificação dos compostos foram obtidos utilizando LC Solution software (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). As curvas padrão, baseadas nas áreas de pico, foram calculadas para a concentração individual dos ácidos orgânicos (Supelco Analytical, Sigma, St Louis, MO, USA) determinados, que cobrem uma ampla gama de concentrações, por comparação com soluções padrão. Padrões (Supleco Analytical, Sigma, St Louis, MO, USA) foram preparados em água deionizada filtrada através de filtros de 0,45 µm (Millipore Corp.). As análises foram realizadas em triplicata.

5.4.5 Determinação de compostos voláteis

Os compostos voláteis presentes no *headspace* das amostras foram extraídos utilizando a técnica de micro-extração em fase sólida (SPME) por 30 min a temperatura

ambiente, utilizando a fibra trifásica 50/30 µm DVB/CAR/PDMS. A análise foi realizada em um cromatógrafo gasoso Agilent GC 6890 acoplado ao detector de espectrômetro de massas Agilent 5973N (CG/EM) e uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 mm e.f., J&W Scientific, Folson, CA). O hélio foi utilizado como gás transportador a uma taxa de vazão de 1,0 mL/min. A temperatura do forno foi programada de 50 a 250 °C a 5 °C/min. A temperatura do injector foi mantida a 260 °C. O detector de massa foi operado em um modo de ionização eletrônica (70 eV) 210 de 3,15 scan/s com uma gama de 30 a 550 u. A linha de transferência foi mantida a 250 °C, a fonte de íon 211 a 230 °C e um analisador a 150 °C. Os compostos foram identificados de acordo com a biblioteca do espectrômetro de massas Wiley (Enchanced Data Analysis- CG-EM Data Analysis, New York, USA).

5.4.6 Determinação do tempo de relaxação *spin-rede*

As análises foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de RMN de baixo campo magnético (RMN-BC) Maran Ultra-23 (Oxford Instruments, Tokyo, Japan), operando à frequência de 23,4 MHz (para o núcleo de hidrogênio) e equipado com uma sonda de 18 mm, com variação de temperatura. O tempo de relaxação spin-rede do hidrogênio foi determinado diretamente pela sequência tradicional de pulsos inversão-recuperação (intervalo de reciclo 180 º - τ – 90 º- aquisição). O pulso de 90 º, 4,6 µs, foi calibrado automaticamente pelo software do equipamento. A amplitude do FID foi coletado por vinte τ pontos de dados, variando de 0,1 a 5000 ms, com 4 medidas para cada ponto com um intervalo de reciclagem de 5 s. Os valores de relaxação (análise em triplicata) e as intensidades relativas foram obtidos pelo *fitting* dos dados exponenciais com ajuda do *software* WinFit (Versão 2.4.0.0).

5.5 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO POLVILHO DOCE (*t=1*) E FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)

5.5.1 Propriedades de pasta

As propriedades de pasta dos polvilhos foram determinadas utilizando um viscosímetro Rapid Visco Analyser 4500 (Perten Instruments, Hägersten, Suécia), conforme método 162 da International Association for Cereal Science and Technology (ICC, 1996). Foram pesados 2,5 g de polvilhos e dissolvidos em 25 mL de água destilada (volume corrigido considerando 14% de teor de umidade no polvilho) e os parâmetros avaliados foram

temperatura de pasta, viscosidade máxima, tempo para viscosidade máxima, quebra de viscosidade, viscosidade mínima, viscosidade final a 50ºC e tendência à retrogradação. As análises foram realizadas em triplicata e os valores médios e desvios padrão foram calculados.

5.5.2 Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)

As análises de IAA e ISA foram realizadas em triplicata, seguindo metodologia proposta por Anderson *et al*. (1969).

5.5.3 Poder de expansão

O poder de expansão foi determinado como descrito por Demiate *et al*. (2000) com modificações. A homogeneização manual de 24 g de polvilho foi realizada em 20 g de água em ebulição. Quatro porções de 7 g desta massa foram colocadas em recipientes de alumínio (3,7 cm de diâmetro e 6,8 cm de altura) e pré-aquecidas em um forno elétrico a 150 °C por 18 min. As amostras de polvilho expandido foram pesadas e cobertas com Parafilm M®. O volume aparente foi determinado de acordo com o AACC (2010) International Approved Method 10-05.01. As medições foram realizadas em quadruplicata e a expansão foi determinada através do volume específico avaliado pelo método de deslocamento relação de sementes de painço e expresso em mL. g^{-1} (FAUBION & HOSENEY, 1982). Os volumes específicos das amostras foram utilizados para classificar o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) como pequeno (< 5,0 $mL.g^{-1}$), médio ($5,0 \leq x \leq 10,0$ $mL.g^{-1}$) e grande (>10,0 $mL.g^{-1}$) (DEMIATE *et al*., 2000).

5.6 Análise estatística

Os dados foram expressos como médias ± SD e os valores significativos foram analisados pelo software GraphPad Prism v. 5 (San Diego, CA, EUA). As diferenças entre as médias foram comparadas por análise de variância (ANOVA) com o *post test* de Bonferroni. O nível de significância estatística de 99,9 % (p <0,001) foi considerado em todas as análises.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

6.1.1 Contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras nos polvilhos ao longo da produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

No tempo inicial (*t=1*) e final da fermentação (*t=30*), a contagem de *Lactobacillus* sp. em ágar MRS apresentou valores médios em torno de 8,0 unidades logarítmicas de UFC/g, enquanto que após secagem ao sol para obtenção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), houve uma redução de 1,2 unidades (Tabela 3). Estudos anteriores demonstraram que o gênero *Lactobacillus* sp. é prevalente entre os outros gêneros pertencentes às bactérias ácido- láticas, sendo encontrado em todo o processo de fabrico do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (AMPE *et al*., 2001).

Em relação à contagem para *Streptococcus* sp., realizado em ágar azida, os valores encontrados para o polvilho doce no início e fim da fermentação também foram mais elevados do que no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), reduzindo de 7,8 (*t=30*) para 6,3 unidades logarítimicas de UFC/g (Tabela 3). Por outro lado, não foi possível detectar a presença de *Lactococcus* sp. no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), uma vez que provavelmente o número de microrganismos estava abaixo do limite de detecção da técnica (10^2 UFC/g).

Na contagem de leveduras, para ambos os meios utilizados, no momento inicial (*t=1*) o polvilho doce apresentou um maior número de células do que ao final da fermentação (*t=30*) (Tabela 3). Por outro lado, o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) mostrou um aumento na contagem de leveduras, atingindo valores em torno de 7,5 unidades logarítimicas de UFC/g (Tabela 3). A presença de espécies de leveduras, predominantemente nas fases avançadas do processo, sugeriu uma maior tolerância destes microrganismos ao ácido (HALM *et al*., 2004), o que pode ser considerada uma vantagem tecnológica.

Tabela 3: Contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras (Log10 UFC/g) durante o processamento do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) em diferentes meios de cultivo.

Amostras (tempo de fermentação)	**Bactérias (Log UFC/g)***			**Leveduras (Log UFC/g)***	
	M17	**MRS**	**Azida sangue**	**YPD 2%**	**Extrato de malte**
Polvilho doce (*t=1*) (primeiro dia)	7,6 ± 0,02[b]	8,0 ± 0,03[a]	7,7 ± 0,04[a]	7,9 ± 0,02[a]	7,8 ± 0,01[a]
Polvilho com 30 dias de fermentação (*t=30*)	8,0 ± 0,02[a]	8,2 ± 0[a]	7,8 ±0,04[a]	6,0 ± 0,02[c]	6,2 ± 0,02[b]
Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)	< 2[c]	6,8 ± 0,02[b]	6,3 ±0,04[b]	7,5 ± 0,01[b]	7,6 ± 0,06[a]

*Os valores estão expressos como Média ± Desvio Padrão.
(a-c) Letras minúsculas comparam médias, na mesma coluna, entre os diferentes tempos para o mesmo meio de cultura. Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (p <0,001), de acordo com o teste de Bonferroni Posttests.

As leveduras são consideradas como os microrganismos mais envolvidos na fermentação de mandioca, depois das BAL. Lacerda *et al*. (2005) estudaram a microbiota durante a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), coletado em duas fábricas no estado de Minas Gerais, e verificaram que a fermentação espontânea envolve espécies de bactérias ácido láticas em maior número e leveduras em números relativamente baixos, sendo resultados diferentes aos apresentados neste estudo, que mostraram maior número de leveduras em relação às de bactérias ácido-láticas no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

6.1.2 Identificação molecular de bactérias e leveduras isoladas

Para identificar as bactérias (Tabela 4) presentes nos diferentes meios de cultura (MRS, M17 e azida sangue), colônias com morfologias distintas foram selecionadas aleatoriamente ao longo do processo de obtenção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). A partir dos referidos meios, foram isoladas 131 colônias de bactérias, as quais foram em seguida caracterizadas por ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) (Figura 5). Dezoito perfis distintos (13,7 %) foram encontrados e os isolados foram identificados por sequenciamento parcial do gene *rrs*. *Lactobacillus* sp. (42 %), *Lactobacillus plantarum* (14,5 %), *Leuconostoc citreum* (5,3 %), *Lactococcus* sp. (12,2%), *Enterococcus* sp. (15,3 %) e *Bacillus* sp. (10,7 %) foram identificados por homologia (98-100%) de acordo com a base de dados GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Tabela 4. Identificação das bactérias no início da fermentação (*t=1*), último dia de fermentação (*t=30*) e produto fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por sequenciamento do gene *rrs*

Amostra	Identificação por sequenciamento do gene *rrs*	Número de bactérias com o mesmo perfil de restrição	Porcentagem em relação ao total de isolados
Polvilho doce (*t=1*) (primeiro dia)	*Lactobacillus* sp.	5	3,8
	Lactobacillus plantarum	16	12,2
	Leuconostoc citreum	2	1,5
	Lactococcus sp.	5	3,8
	Enterococcus sp.	1	0,8
Polvilho com 30 dias de fermentação (*t=30*)	*Lactobacillus* sp.	31	23,7
	Lactobacillus plantarum	3	2,3
	Leuconostoc citreum	2	1,5
	Lactococcus sp.	11	8,4
	Enterococcus sp.	19	14,5
	Bacillus sp.	14	10,7
Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)	*Lactobacillus* sp.	19	14,5
	Leuconostoc citreum	3	2,3
TOTAL		**131**	**100**

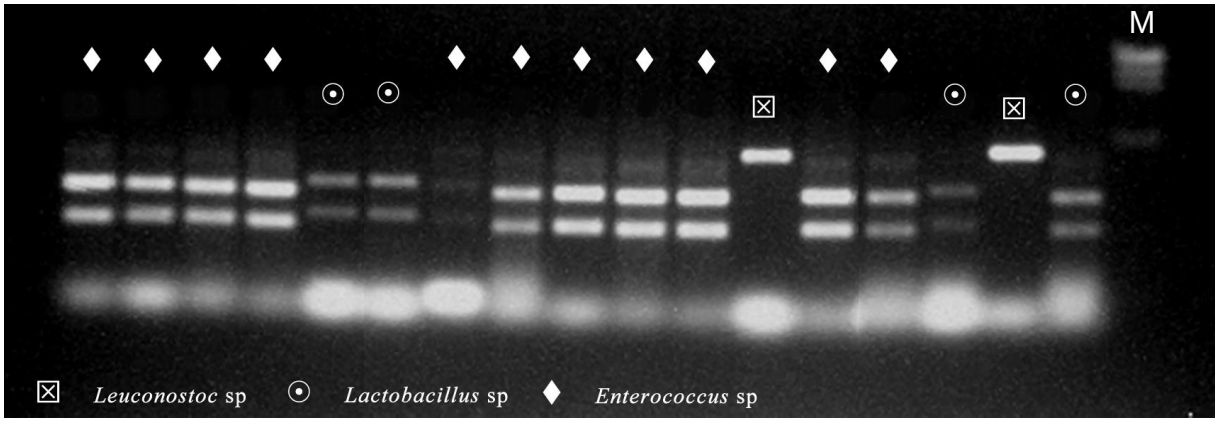


Figura 5. Exemplo de gel para análise de perfis de restrição dos fragmentos do gene *rrs* de bactérias ácido-láticas isoladas no último dia de fermentação (t=30), em meio de cultivo azida sangue. M= marcador de peso molecular DNA de fago lambda digerido com *Hind*III. DNA amplificado e digerido com a enzima *Dde*I (Fermentas, São Paulo, Brasil).

Os resultados apresentados estão de acordo com os encontrados por outros autores em relação à comunidade bacteriana responsável pela fermentação tradicional de amido de mandioca para a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). As BAL contribuem para o desenvolvimento de propriedades características do amido, tais como sabor, aroma, aspecto, textura, vida de prateleira e de segurança (LACERDA *et al*., 2005).

Lacerda *et al*. (2005) verificaram que *L. plantarum* e *L. fermentum* foram as BAL predominantes no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) analisado em duas polvilharias em Conceição dos Ouros (MG). *L. plantarum* e outras bactérias lácticas têm sido relatadas como os microrganismos predominantes na fermentação natural do polvilho e são responsáveis pela acidificação do produto nos tanques durante o processo fermentativo e produzem os ácidos orgânicos e compostos aromáticos (BEN OMAR *et al*., 2000; AMPE *et al*., 2001). Outro grupo de BAL, o gênero *Leuconostoc* sp., tem sido identificado desde o início do processo de fermentação (*t=1*) e são geralmente isolados a partir de vegetais fermentados, incluindo espécies capazes de produzir exopolissacarídeos (EPS). Este grupo tem muitas aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica (KHUE & NGOC, 2013).

Estirpes de *Leuconostoc* sp. crescem de forma associativa com estirpes de *Lactococcus* sp. e podem conferir o aroma e textura do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). O crescimento associativo entre esses dois grupos de bactérias tem sido descrita como uma relação sinérgica funcional (KHUE & NGOC, 2013).

As bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp., foram encontradas apenas em amostras coletadas no final do processo de fermentação (*t=30*). De acordo com a European Food Safety Authority (EFSA, 2014) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013), a presença do gênero *Bacillus* sp., com bactérias Gram-positivas, caracterizado pela capacidade de formação de esporos e normalmente presentes no solo, pode ser um indicador de contaminação da fermentação, devido a condições de higiene inadequadas no processo de produção, o que reforça a necessidade de incluir os conceitos de boas práticas de fabricação (JIMENÉZ *et al*., 2013).

Em relação às leveduras (Tabela 5), um total de 157 colônias de leveduras foram selecionadas aleatoriamente dos meios seletivos utilizados para contagem. Após análise por RAPD-PCR (Figura 6), um total de 19 (12,1 %) perfis representativos foram obtidos, selecionados e identificados pela análise da sequência da região espaçadora interna transcrita do DNA ribossômico (ITS do rDNA). Após o sequenciamento dos perfis representativos, as sequências que apresentaram percentual de identidade 98-100% foram identificadas. *Geotrichum candidum* (10,8 %), *Pichia kudriavzevii* (33,1 %), *Issatchenkia orientalis* (3,2 %), *Clavispora lusitaniae* (6,4%), *Neurospora crassa* (1,9 %), *Neurospora intermedia* (1,9 %), *Rhodotorula mucilaginosa* (2,5 %), *Cryptococcus albidus* (8,3%), *Candida akabenensis* (8,3%), *Candida pararugosa* (6,4%), *Candida rugosa* (4,5 %) e *Geotrichum* sp. (12,7 %) foram identificadas durante a fermentação e no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

Tabela 5. Identificação das leveduras no início da fermentação (*t=1*), último dia de fermentação (*t=30*) e produto fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) por sequenciamento da região espaçadora interna transcrita do DNA ribossômico (ITS do rDNA)

Amostra	Identificação por sequenciamento da região ITS do rDNA	Número de leveduras com mesmo perfil de restrição	Porcentagem em relação ao total de isolados
Polvilho doce (*t=1*)	*Pichia kudriavzevii*	52	33.1
	Issatchenkia orientalis	5	3.2
Polvilho com 30 dias de fermentação (t=30)	*Geotrichum* sp.	20	12.7
	Geotrichum candidum	17	10.8
	Clavispora lusitaniae	10	6.4
	Rhodotorula mucilaginosa	3	1.9
Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)	*Cryptococcus albidus*	13	8.3
	Candida akabanensis	13	8.3
	Candida pararugosa	10	6.4
	Candida rugosa	7	4.5
	Neurospora crassa	3	1.9
	Neurosporo intermedia	3	1.9
	Rhodotorula mucilaginosa	1	0,6
TOTAL		**157**	**100**

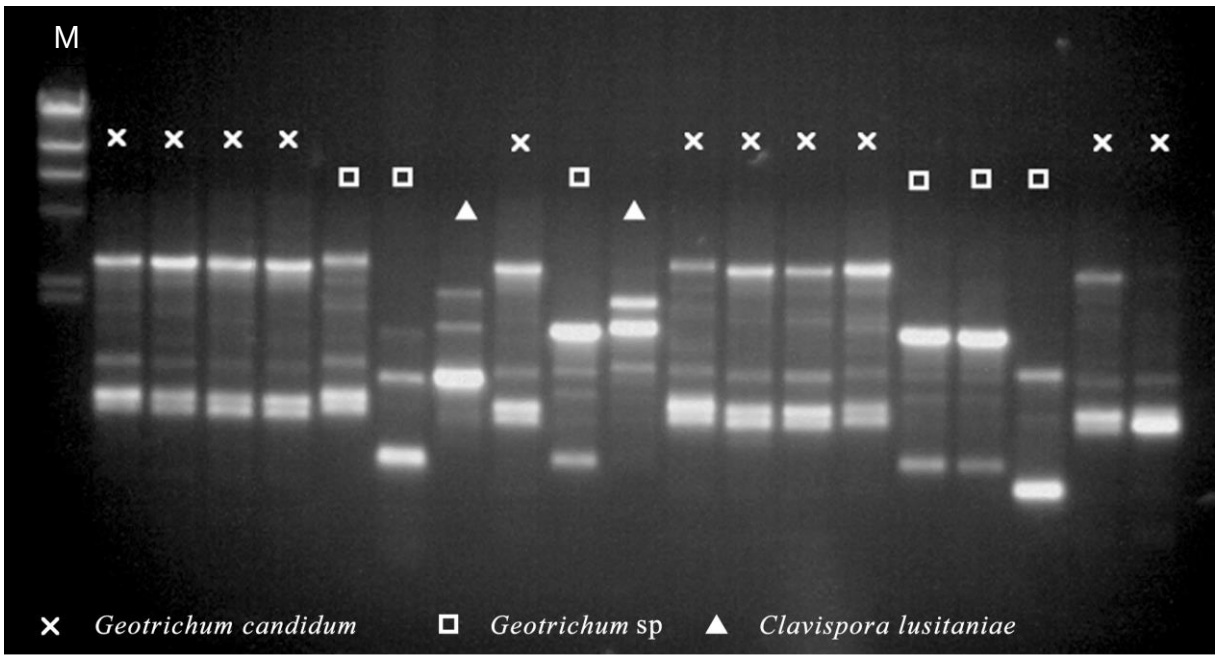


Figura 6. Exemplo de gel para análise dos perfis de amplificação de diferentes espécies de leveduras, no último dia de fermentação (*t*=30), cultivados em meio YPD 2%. M = marcador de peso molecular *lambda* digerido com *Hind*III. DNA amplificado com o primer EI-1.

Vários estudos mostraram a presença do gênero *Candida* sp. na fermentação de mandioca para produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), tais como *C. rugosa*, *C. humilis*, *C. ethanolica*, além dos gêneros *Geotrichum* sp., *Saccharomyces* sp. e *Brettanomyces* sp. (CARVALHO *et al*., 1999; LACERDA *et al*., 2005). Lacerda *et al*. (2005), verificaram que as leveduras mais comuns em polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) foram *Galactomyces geotrichum* e *Issatchenkia* sp., ambas presentes durante todo o processo.

As leveduras, na fermentação da mandioca, podem ser responsáveis pela produção de compostos aromáticos, tais como os terpenóides, que juntamente com os ácidos orgânicos, dão as características finais do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (SILVEIRA *et al*., 2000).

No presente estudo, todas as leveduras encontradas mostraram ter elevada atividade amilolítica, representando uma vantagem na produção do polvilho fermentado e seco ao sol, uma vez que podem hidrolisar parcialmente o amido bruto (RODRIGUEZ-SANOJA *et al*., 2000) para fornecer açúcares tais como glicose ou maltose, que podem ser usados como fonte de energia por outros microrganismos, assim como a produção de enzimas, tais como a linamarase e poligalacturonase, aldeídos e ésteres que conferem um aroma agradável ao produto final (OYEWOLE, 2001).

A proliferação de leveduras em alimentos é favorecida pelo ambiente ácido criado pelas BAL. Simultaneamente, o crescimento das bactérias é estimulado pela presença de leveduras, as quais fornecem fatores de crescimento, tais como, vitaminas e compostos nitrogenados. A associação de BAL e leveduras, durante a fermentação, tem um impacto significante em parâmetros de qualidade dos alimentos como textura, odor e valores nutricionais (BOONNOP *et al*., 2009).

6.2 CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO POLVILHOS

6.2.1 Teor de umidade

As amostras de polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) analisadas apresentaram valores médios de umidade diferentes (p <0,001), 9,9% ± 0,02 e 12,9% ± 0,04, respectivamente.

De acordo com Regulamento Técnico Brasileiro para produtos de amido (BRASIL, 2005), as amostras de polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) não devem apresentar diferença significativa quanto ao teor de umidade. O valor preconizado pela legislação brasileira, para ambos é de no máximo 18 % p/p, justificados para que haja uma boa conservação dos produtos (BRASIL, 2005). A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos por estar relacionada à estabilidade, qualidade e composição do produto final (PARK & ANTONIO, 2006).

As diferenças no teor de umidade resultam do tempo de exposição do polvilho durante a etapa de secagem, das condições climáticas existentes no momento da secagem e do tipo de revestimento utilizado para a exposição dos polvilhos (DINIZ, 2006). Embora o tempo de secagem tenha se estendido por 12 h, a umidade relativa do ar na região é de 60 – 90%, o que pode ter prejudicado a secagem do produto final.

Apesar da diferença no teor de umidade dos produtos, os valores de umidade apresentados demonstraram condições propícias à conservação, pois ambos se enquadraram dentro limite preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2005), semelhante a outros produtos comerciais disponíveis no mercado brasileiro. Um teor de umidade inferior ao que foi encontrado seria desejável para aumentar a vida de prateleira do produto final, já que o processo de secagem do polvilho sob o sol não conseguiu ser completado dentro de 12 h.

Em um estudo realizado com 24 amostras de polvilhos doce coletados nos estados da região sul do país, a umidade média das amostras analisadas foi de 12,3 % (DEMIATE *et al*., 2003). Já para o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), oriundo de outros estudos brasileiros, o teor de umidade encontrado foi de 12 a 14 % em Minas Gerais; 13,6 a 14,3 % em Santa Catarina; 13,6 % no Paraná e Mato Grosso do Sul (MACHADO *et al*., 2010; MAEDA & CEREDA, 2001; PEREIRA, 2001).

Além disso, Marcon *et al*. (2009) verificaram que amostras de polvilho fermentado e seco ao sol comercial (polvilho azedo) tinham um teor de umidade de 14,2 %, enquanto que para amido fermentado em laboratório e seco em estufa e ao sol as umidades foram de 9,5 e 12,5 %, respectivamente, sugerindo que ao secar o polvilho fermentado em estufa, com condições controladas, o teor de umidade obtido é ainda mais baixo, favorecendo a estabilidade e qualidade do produto final. Já no processo de secagem ao sol, o valor mais elevado foi similar ao encontrado no trabalho atual.

6.2.2 Teor de amilose aparente e amilopectina

Não foi verificada diferença significativa (p <0,001) entre as amostras de polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) com relação ao teor de amilose e amilopectina (Tabela 6). O teor de amilose é um importante parâmetro para estudar as mudanças que ocorrem nas propriedades de pasta do amido, as quais podem afetar suas aplicações industriais (ASCHERI *et al*., 2012). As propriedades de pasta e térmicas do amido são negativamente regulamentadas pelo teor de amilose produzido em vegetais amiláceos (LUO *et al*., 2015).

Existe uma expressiva diferença entre os valores de amilose quando se comparam os resultados com outros estudos. Estas diferenças podem ser atribuídas ao emprego de amidos provenientes de outras fontes, bem como diferentes métodos utilizados nas análises de amilose. Um estudo mais cuidadoso e aprofundado demonstrou que o teor de amilose pode variar com as condições de cultivares ou época de plantio das culturas (ALVARADO *et al*., 2013).

Tabela 6. Teor de amilose e amilopectina em polvilho doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Amostra	**Amilose (%)**	**Amilopectina (%)**
Polvilho doce (t=1)	20,4 ± 0,4[a]	79,6 ± 0,4 [a]
Polvilho azedo (fermentado e seco ao sol)	19,9 ± 0,3 [a]	80,1 ± 0,3 [a]

Médias e desvio padrão de análises realizadas em triplicata
Letras iguais em uma mesma coluna não apresentam diferença significativa (p <0,001), de acordo com o teste de Bonferroni

Em estudos realizados com polvilho, teores de amilose encontrados por Gunaratne e Hoover (2002) foi de 19,8 %; por Li e Yeh (2001) de 19,9 %; Leonel *et al*. (2004) de 16,3 % e Takizawa *et al*. (2004) de 18,6 %.

Sarmento *et al*. (2013) analisaram 19 amostras comerciais de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) e uma de polvilho doce. O teor de amilose do polvilho doce foi de 19,2 % e os dos polvilhos fermentado e seco ao sol (polvilhos azedos) variaram de 17,1 a 20,6 %.

As características dos grânulos refletem as propriedades dos amidos. A pasta de amido de tubérculos e raízes apresenta géis mais fracos e pouco consistentes, porém são de alta viscosidade, translúcidos, longos, coesivos, fibrosos (FRANCO *et al*., 2001) e de baixa tendência para retrogradar pelo seu baixo conteúdo de amilose (aproximadamente 17 %) (RAKSHIT, 2004).

Tukomane *et al*., (2007) mostraram que amidos com baixo teor de amilose apresentaram maiores graus de cristalinidade, resultante da redução de regiões amorfas no seus grânulos, e por isto tendem a ter maior pico de viscosidade.

Existe uma correlação positiva entre a retrogradação de pastas de amido de mandioca e amilose. Rodríguez-Sandoval *et al*., (2008) discutiram que este fenômeno é causado pela agregação de amilose, depois do esfriamento das pastas, que atua como um núcleo durante o rearranjo de amilopectina. A amilose tende a se associar novamente, através de ligações de hidrogênio, com outras moléculas de amilose adjacente formando uma estrutura cristalina de dupla hélice quando a solução esfria e permanece intacta durante um longo período de tempo (DENARDIN & SILVA, 2009).

No entanto, Denardin e Silva (2009) relataram que retrogradação é um fenômeno complexo e varia de acordo com vários fatores tais como a temperatura, o pH, a fonte de amido e presença de outros componentes como lipídios, eletrólitos e açúcares. Alguns estudos têm mostrado que, na gelatinização, algumas populações de cadeias de amilopectina podem promover ou inibir a retrogradação da amilopectina devido à maior ou menor formação de duplas hélices durante retrogradação (VANDEPUTTE & DELCOUR, 2004), no entanto, a influência exata da retrogradação da amilose ainda é desconhecida.

6.2.3 Determinação de acidez total titulável e pH dos polvilhos durante a produção de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Foi verificado um aumento na acidez total titulável, de 2,14 ± 0,012 mL de NaOH /100g para 3,24 ± 0,24 mL de NaOH/100g e uma redução do pH de 4,8 ± 0,05 para 3,25 ± 0,03, para o tempo inicial (*t=1*) e final (*t=30*), respectivamente (Tabela 7), enquanto que o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) mostrou uma acidez titulável de 5,25 ± 0,01 mL de NaOH /100g e pH de 3,63 ± 0,015.

Segundo a legislação vigente, a fécula deve ficar no tanque de fermentação até que o produto atinja acidez aproximada de 5 mL de NaOH/100g (BRASIL, 2005). No entanto, na maioria das polvilharias do Brasil, a duração do processo de fermentação não é controlada pela acidez titulável como um parâmetro para a retirada dos produtos dos tanques e interrupção da fermentação, sendo apenas observado o período de 30 dias. Na polvilharia avaliada no presente estudo, não houve controle do ponto final do processo de fermentação, nem com o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), mesmo apresentando uma acidez titulável maior que a recomendada pela legislação (BRASIL, 2005).

Tabela 7. Acidez total titulável ao longo do processo de fermentação polvilho doce (*t=1)*, polvilho após 30 dias de fermentação (*t=30)*, e no produto final (fermentado e seco ao sol) e respectivos desvios padrão (DP)

Tempo de Fermentação (dias)	Acidez total titulável ± DP	pH ± DP
Polvilho doce (*t=1*)	2,14± 0,012[a]	4,87 ± 0,047[a]
Polvilho com 30 dias de fermentação (*t=30*)	3,24 ± 0,24[b]	3,25 ± 0,031[b]
Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)	5,25± 0,012[c]	3,63 ± 0,015[c]

Médias e desvio padrão de análises realizadas em triplicata
Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (p <0,001), de acordo com o teste de Bonferroni

Grande parte dos produtores de pequeno porte estabelece um período em dias, para que a fermentação se complete. Alguns autores fixaram um período de 20 dias, enquanto que outros determinam este período, a partir do aparecimento de bolhas na água sobrenadante, decorrente da produção de CO_2 (MARCON *et al*., 2009).

Na polvilharia avaliada, o momento final da fermentação foi determinado pelo período em dias, dependendo da época do ano. No verão, a fermentação era concluída em torno de 20 dias e no inverno 30 dias. Esta forma de avaliação pode não garantir a concentração desejada dos ácidos orgânicos, compostos voláteis e propriedade de expansão, para o desenvolvimento de um produto final de qualidade, com aroma e sabor típicos. Portanto, o controle da acidez, até atingir 5,0 mL de NaOH/100g, é importante para obtenção do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) com características tecnológicas normalmente esperadas.

Mugula *et al*. (2003), ao estudar o uso de BAL e leveduras como culturas iniciadoras para o preparo de *togwa*, um alimento fermentado da Tanzânia, feito a partir de milho e sorgo, usaram BAL e leveduras como culturas puras e também em associação. Todas as BAL mostraram habilidade de fermentar a massa e aumentar a acidez. Como culturas puras, as leveduras mostraram baixa atividade com 12 h de fermentação, mas o pH foi pouco reduzido e pequeno aumento da acidez do meio após 24 h. Em associação com as BAL, tiveram um efeito modesto na acidez final.

No presente trabalho, a grande quantidade de leveduras presentes no produto final pode demonstrar uma produção de etanol pelas mesmas, ou ainda a presença de outras bactérias, além das BAL, o que poderiam ter contribuído com o aumento da acidez e a redução no valor do pH das amostras ao final da fermentação. A presença do etanol pode ser resultado da fermentação de açúcares a partir de substrato fermentescível e as leveduras são os microrganismos predominantes deste tipo de fermentação (alcoólica) (SUN & CHENG, 2002; BLANDINO *et al*., 2003). Apesar da maioria dos estudos mostrarem que as BAL apresentam maior atividade que os demais microrganismos durante a fermentação para

fabricação do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), o presente trabalho pode sugerir a hipótese de ter ocorrido outro tipo de fermentação, além da lática, já que houve redução da contagem das BAL e aumento das leveduras.

6.2.4 Caracterização dos ácidos orgânicos em polvilhos doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Entre os ácidos orgânicos analisados, apenas os ácidos acético, lático e succínico foram produzidos durante a fermentação e após a secagem do produto fermentado ao sol. Todos eles foram detectados por HPLC (Figura 7), com exceção do ácido acético, o qual foi avaliado por HS-SPMS / CG-qMS. As concentrações de ácido lático encontradas nas amostras de polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), foram de 0,15 $g.L^{-1}$ e 0,96 $g.L^{-1}$, respectivamente. Na amostra de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) também foi observada a presença de ácido succínico na concentração de 0,084 $g.L^{-1}$. O ácido lático e succínico foram detectados por HPLC. O ácido acético compreendeu aproximadamente 51,2% dos compostos voláteis no headspace do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (Tabela 8 e Figura 8B).

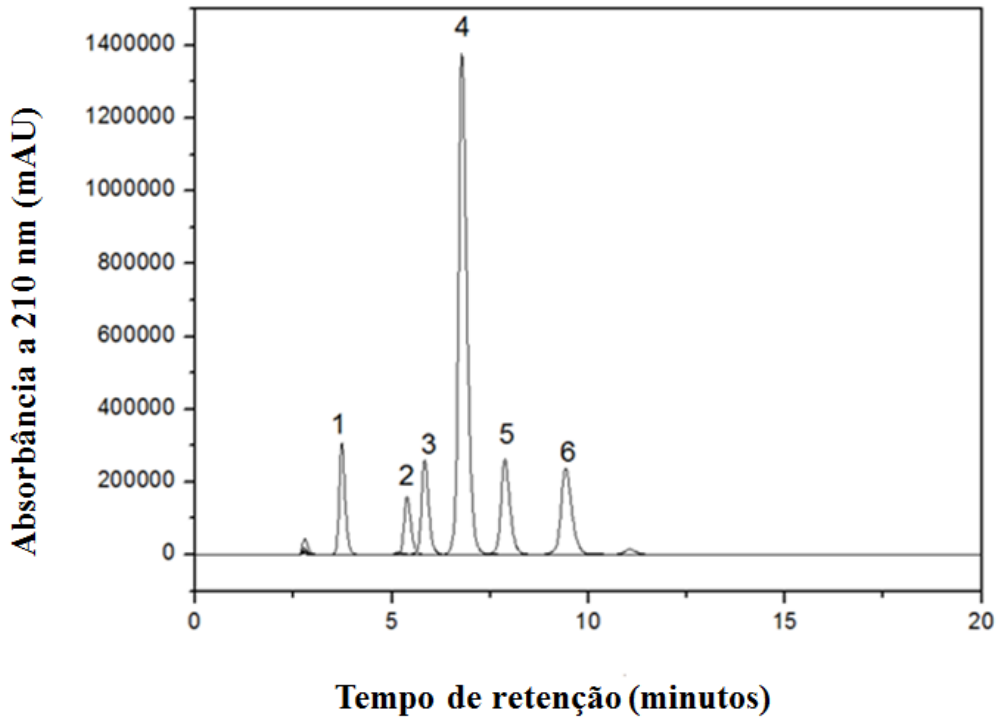


Figura 7. Cromatograma dos padrões de ácidos orgânicos obtido por HPLC. Picos: 1 = ácido cítrico, 2 = ácido succínico, 3 = ácido láctico, 4 = ácido acético, 5 = ácido propiónico e 6 = ácido butírico.

A acidez titulável do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) não poderia ser devida a grupos carboxil resultantes de ácidos residuais devido à degradação de amilose e amilopectina (SILVA *et al*., 2006), uma vez que os ácidos orgânicos de elevado peso molecular não foram detectados, nem os de cadeia curta e ácidos graxos de cadeia longa por HS-SPME / CG-qMS.

Em estudos anteriores, o aumento na acidez total foi atribuído à produção de ácidos orgânicos, principalmente ácido láctico e quantidades substanciais de ácidos acético e butírico (ADEGUNWA *et al*., 2011); o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) pode ter traços de ácido propiônico, sem a presença de ácido butírico ou propiônico (AQUINO *et al*., 2013).

Em regiões com temperaturas médias em torno de 18 °C, a fermentação é lenta, com o predomínio da microbiota lática, principalmente *L. plantarum*, enquanto que nas regiões quentes, com temperaturas em torno de 35 °C, a fermentação é mais rápida e a microbiota butírica é predominante, principalmente *C. butyricum* (LACERDA *et al*., 2005).

Analisados em conjunto, os dados relativos ao pH, acidez titulável, conteúdo de ácido acético, láctico e teor de ácido succínico e baixa temperatura ambiente indica que a fermentação foi interrompida antes da conclusão da fabricação do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). Além disso, *C. butyricum* não foi encontrado entre os microrganismos da microbiota natural.

O ácido succínico é um ácido dicarboxílico produzido como um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) ou como produto principal da fermentação anaeróbica por alguns microrganismos (LEE *et al*., 2000). Várias espécies de leveduras encontradas na microbiota do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) devem contribuir para a produção de ácido succínico durante o metabolismo oxidativo do amido (CHAVES-LOPEZ *et al*., 2014).

6.2.5 Caracterização dos compostos voláteis em polvilhos doce e azedo

Um número superior de compostos voláteis foi encontrado no polvilho doce, quando comparado ao polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (Figura 8, A e B). Isto pode ser devido ao tratamento de secagem ao sol, que pode ter causado a perda de alguns dos compostos voláteis (Tabela 7).

Hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos e compostos terpenóides foram encontrados em maior quantidade em polvilho doce do que no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho

azedo). O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) apresentou ácido acético compreendendo 51,2% (Tabela 8) dos compostos voláteis, e parece proteger contra a contaminação da fermentação por microrganismos deterioradores. Foi observada uma redução da diversidade do perfil de terpenos e hidrocarbonetos aromáticos.

Os terpenóides foram a principal classe representativa nos compostos voláteis em ambos os amidos (Tabela 8). Eles podem ser liberados pelas α-glicosidases de leveduras durante o processo de fermentação, o que contribui para o aroma do produto final (CALLEJA & FALQUÉ, 2005). O limoneno confere sabor e odor fresco, cítrico, agradável e penetrante; o composto β-damascenona garante um acentuado odor de frutas doces e floral; α-ionona, permite odor tropical e cheiro floral que estão presentes em quantidades consideráveis no produto final (COLBERT, 2014), contribuindo para sabores únicos,um aroma e sabor agradável de polvilho fermentado.

Hidrocarbonetos aromáticos tiveram seus teores relativos diminuídos no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), como metilbenzeno, 1-3-dimetilbenzeno-1-3, 1,3,5-trimetilbenzeno, 1,2-diclorobenzeno, 1-metil-3-(1-metiletil)benzeno, 1-metil-2-prop-1-en-2-ylbenzene, 2- (4-metilfenil) propan-2-ol, estireno e benzaldeído foram removidos pela fermentação (Tabela 8).

As bactérias ácido-láticas e leveduras presentes no processo de fermentação do polvilho são capazes de produzir compostos voláteis através do metabolismo primário e secundário (MVOCs). Além disso, a umidade e temperatura influenciam a emissão de MVOCs, e uma fase de crescimento prolongada devido a uma temperatura inferior pode influenciar a produção de certos compostos e estender o tempo de produção máxima (SUNESSON *et al*., 1997). Outros fatores ambientais tais como o pH do substrato, luz e níveis de CO_2 ou O_2, provavelmente, também pode influenciar o padrão MVOC. Além disso, já foi descrito que os compostos de aroma voláteis foram produzidos em amostras fermentadas por *L. plantarum* em co-cultura com *Issatchenkia orientalis*. Na indústria de alimentos, os ácidos orgânicos voláteis são utilizados como flavorizantes, conservantes e inibidores do crescimento microbiano.

Tabela 8. Compostos identificados no *headspace* das amostras de povilho doce (t=1) e azedo (fermentado e seco ao sol), analisadas por CG-qEM via identificação por espectrometria de massas

	Composto	**Número do pico**	**Polvilho doce (*t=1*) Area relativa (%)**	**Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) Relative area (%)**
Ácidos Orgânicos	Acido acético	1	-	51,2
Hidrocarbonetos Alifáticos	*n*-Nonano	2	0,7	2,5
	n-Decano	3	3,5	9,3
	n-Dodecano	4	1,8	6,6
	n-Tridecano	5	0,1	-
	n-Tetradecano	6	0,5	-
	n-Pentadecano	7	0,3	-
	Di- *N*-octil eter	8	0,3	-
	2,5-dimetil-nonano	9	0,6	2,0
	Octacosano	10	-	2,0
	8-metil-heptadecano	11	0,8	-
Cetona	2,6-di-terc-butilciclohexa -2,5-dieno -1,4 -diona	12	0,2	-
Hidrocarbonetos aromáticos e aldeídos	Tolueno	13	1,5	-
	m-Xileno	14	0,3	-
	1,3,5-Trimetilbenzeno	15	1,5	-
	1,2,3-Trimetilbenzeno	16	0,6	1,4
	1,2-Diclorobenzeno	17	0,3	-
	1-Metil-3-(1-metiletil)benzeno	18	15,9	-
	1-Metil-2-prop-1-en-2-ylbenzeno	19	2,2	-
	1-Etil-3-metilbenzeno	20	-	2,1
	1,2,4-Trimetilbenzeno	21	-	3,4
	1-Ethyl-2,3-dimetilbenzeno	22	-	0,7
	2-(4-Metilfenill)propan-2-ol	23	0,7	-
	Estireno	24	1,1	-
	Benzaldeído	25	0,9	-
Terpenos	Sabineno	26	0,4	-
	2-β-Pineno	27	1,0	-
	β-Mirceno	28	3,1	-
	δ-Careno	29	0,2	-
	Llimoneno	30	44,6	8,6
	α-Terpinoleno	31	1,1	-

	p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	32	0,4	-
	α-Terpineol	33	0,7	-
	Dihydrocarvone	34	0,8	-
	Trans-2-caren-4-ol	35	1,3	-
	Carvotanacetone	36	2,2	-
	p-Mentha-1,8-dien-7-al	37	0,3	-
	Carvacrol	38	0,3	-
	Neril acetato	39	1,0	-
	Geranil acetato	40	0,3	-
	α-Bergamoteno	41	1,2	-
	β-Bisaboleno	42	1,2	-
	β-Damascenona	43	-	1,5
	Cariofileno	44	-	6,6
	α-Ionona	45	-	2,1
Álcool	2-Etil-1-hexanol	46	5,1	-
Aldeído	Decanal	47	1,0	-
TOTAL			100,0	100,0

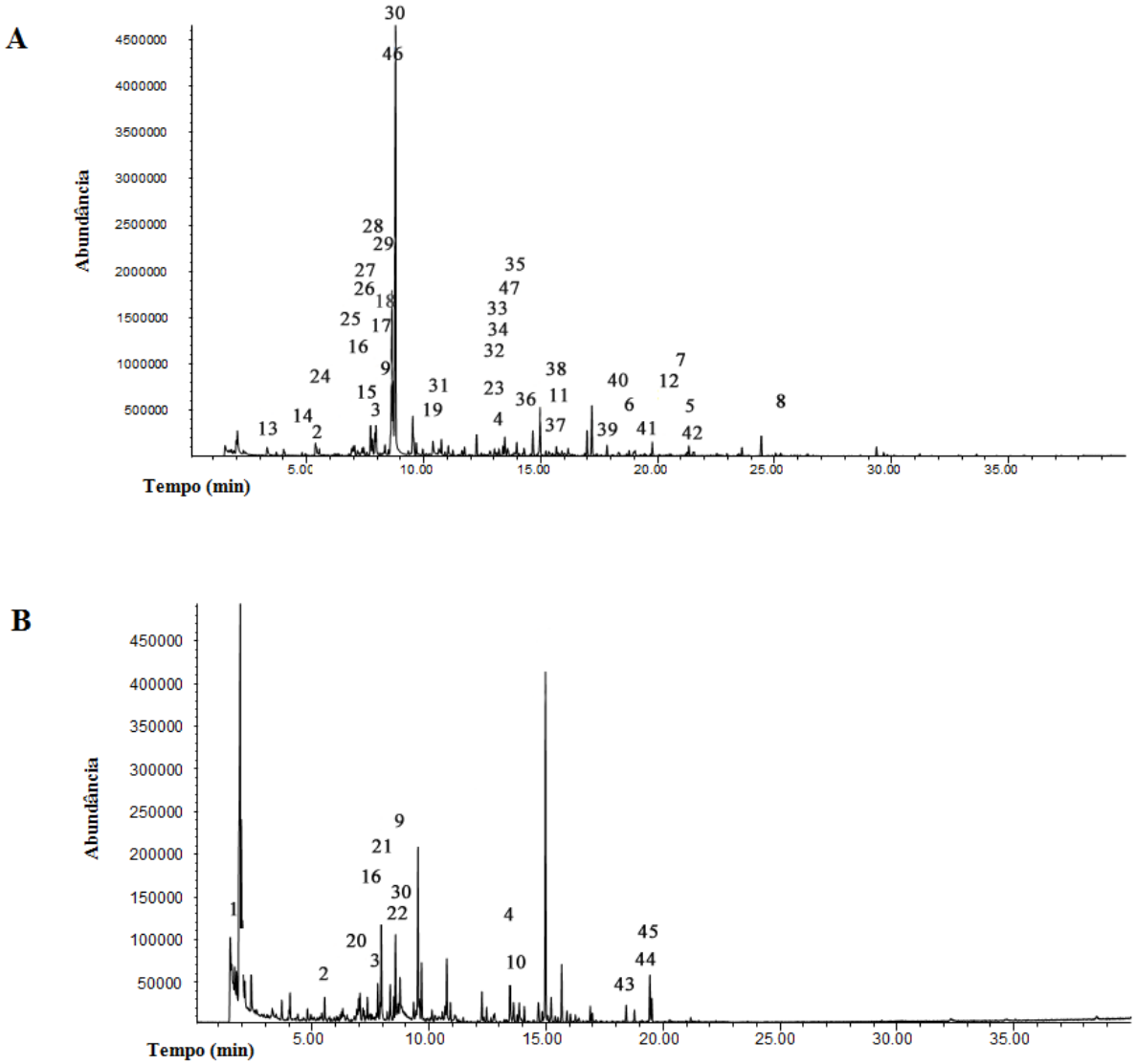


Figura 8. Perfil cromatográfico obtido no *headspace* das amostras (a) polvilho doce (*t=1*) e (b) polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) através da análise por CG-qEM.

Na indústria de alimentos, os ácidos orgânicos voláteis são utilizados como flavorizantes, conservantes e inibidores do crescimento microbiano. Podem ser úteis também como quelantes, reduzindo a oxidação de metais (REGINATTO *et al*., 2009). Os ésteres são geralmente encontrados em pequenas quantidades e muitas vezes difíceis de serem determinados e quantificados, apesar de extremamente potentes quanto à contribuição para o aroma e sabor (FERREIRA *et al*., 2002).

6.2.6 Avaliação da Relaxometria por RMN de ^{1}H em polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

A relaxometria por RMN no estado sólido permitiu o monitoramento das mudanças no polvilho durante a fermentação e no processamento de secagem ao sol, onde o parâmetro de tempo de relaxamento longitudinal (T1H) forneceu informações sobre a dinâmica molecular do polvilho antes e após a fermentação (Figura 9). O parâmetro T1H mostrou uma grande variação nos tempos de relaxação *spin-rede*, de 83,3 para 69,3 ms, para polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), respectivamente. O menor tempo de relaxação *spin-rede* T_1H (p <0,001) sugere que o produto fermentado e seco ao sol é mais propenso para expansão, uma vez que existe uma população de átomos de hidrogênio em um regime de menor confinamento (ou maior mobilidade) e uma maior heterogeneidade no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (BRITO & TAVARES, 2013), como demonstrado pela largura das bases de ambos os domínios e a intensidade de pico que alteraram durante o processamento (Figura 9).

As medidas de tempo de relaxação longitudinal (T1H) obtidas forneceram informações quanto à dinâmica molecular dos componentes dos polvilhos. O T1 mede o tempo de relaxação do componente da magnetização paralela ao campo magnético externo, sendo este tempo sensível a movimentos rápidos (BATHISTA, 2005).

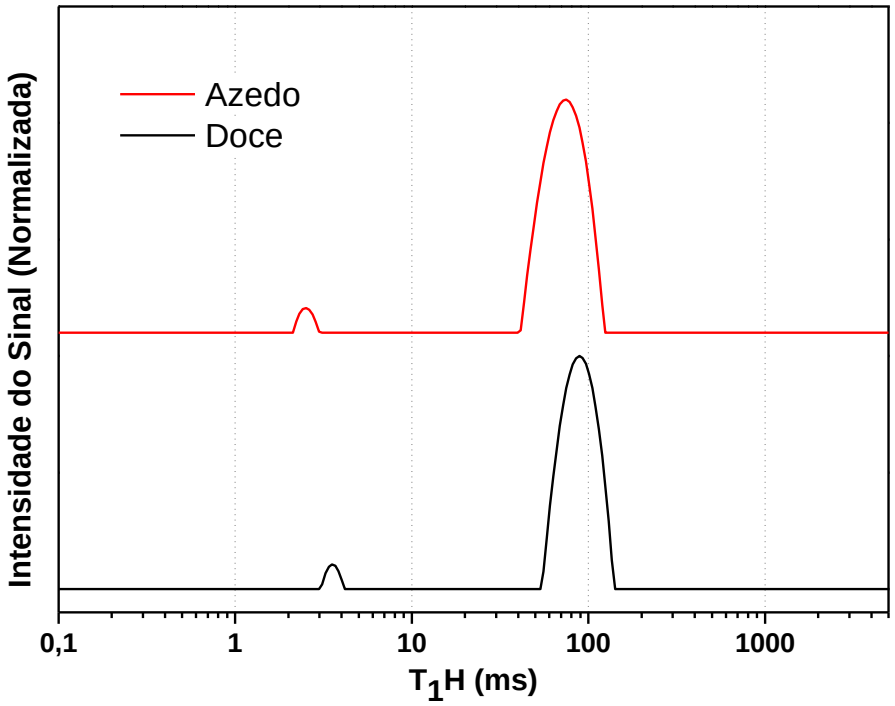


Figura 9. Curvas de distribuição de domínios para os polvilhos doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) obtidas por RMN-BC.

6.3 APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DO POLVILHO DOCE E POLVILHO FERMENTADO E SECO AO SOL (POLVILHO AZEDO)

6.3.1 Propriedade de pasta

O processo de fermentação alterou significativamente (p <0,001) o perfil de viscosidade do polvilho (Tabela 9). A curva de viscosidade representa o comportamento durante o aquecimento e permite avaliar as características da pasta formada, devido às modificações estruturais das moléculas de amido (MARTINS *et al*., 2009).

As pastas de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) mostraram-se menos viscosas a alta temperatura (menor pico de viscosidade), com menor estabilidade à agitação (maior quebra de viscosidade) e menor tendência à retrogradação que o polvilho doce (Tabela 8). Esta alteração na propriedade de pasta do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) tem sido observada em outros estudos (ADEGUNWA, 2011; DEMIATE *et al*., 2000; MARCON *et al*., 2007). Modificações fotoquímicas e enzimáticas ocorrem durante a fabricação de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (MARCON *et al.*, 2007). Moléculas de amido (amilose e amilopectina) nas regiões amorfas dos grânulos foram parcialmente despolimerizadas pelas enzimas amilolíticas e ácidos orgânicos produzidos por microrganismos do ambiente natural e por irradiação UV (principalmente a irradiação de UVB e UVC) durante a secagem ao sol (MARCON *et al*., 2007, VATANASUCHART *et al*., 2005). Além da despolimerização, moléculas de amido presente como carbonil e grupos carboxilatos, indicam que a oxidação dos grupos hidroxil de amilose e amilopectina é observada, em um mecanismo envolvendo radicais livres (DEMIATE *et al*., 2000).

Tabela 9. Características tecnológicas (viscosidade) dos polvilhos doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Parâmetros	Polvilho doce (*t=1*)	Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)
RVA		
Temperatura de pasta (ºC)	68,6 ± 0,1^{ns}	70,2± 0,1^{ns}
Viscosidade máxima (cP)	3399,7±37,5^{a}	2597,3±29,1^{b}
Tempo de viscosidade máxima (min)	3,7 ± 0^{ns}	3,7 ± 0^{ns}
Viscosidade mínima (cP)	1480± 44,6^{a}	447,33±11^{b}
Quebra de viscosidade (cP)	1919,7± 59,9^{b}	2150 ± 18,1^{a}
Viscosidade final a 50ºC (cP)	2070±21,65^{a}	669,7±2,9^{b}
Tendência à retrogradação (cP)	590 ± 37,3^{a}	222,3±8,7^{b}

ns= não significativo; Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ao nível de *p* <0,001 pelo teste de Bonferroni

A organização do grânulo, enfraquecida causada por despolimerização oxidativa durante a fermentação do polvilho, faz com que os grânulos de amido mostrem um pequeno inchaço e, portanto, apresentam menor pico de viscosidade. A organização dos grânulos mais enfraquecida também faz com que os grânulos de amido se desintegrem rapidamente, o que leva a uma maior quebra de viscosidade. Depois de ser despolimerizado oxidativamente, a amilose e amilopectina apresentam pesos moleculares mais baixos, havendo uma menor tendência à retrogradação (PUTRI *et al*., 2012).

Na Figura 10 pode ser observada a diminuição da viscosidade máxima nas amostras de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) (2.597,3 ± 29,1), em relação ao polvilho doce (3.399,7 ± 37,5). Isto ocorre devido às alterações causadas pelos ácidos nos grânulos de amido durante a fermentação, resultando em grânulos danificados (PEREIRA, 2001).

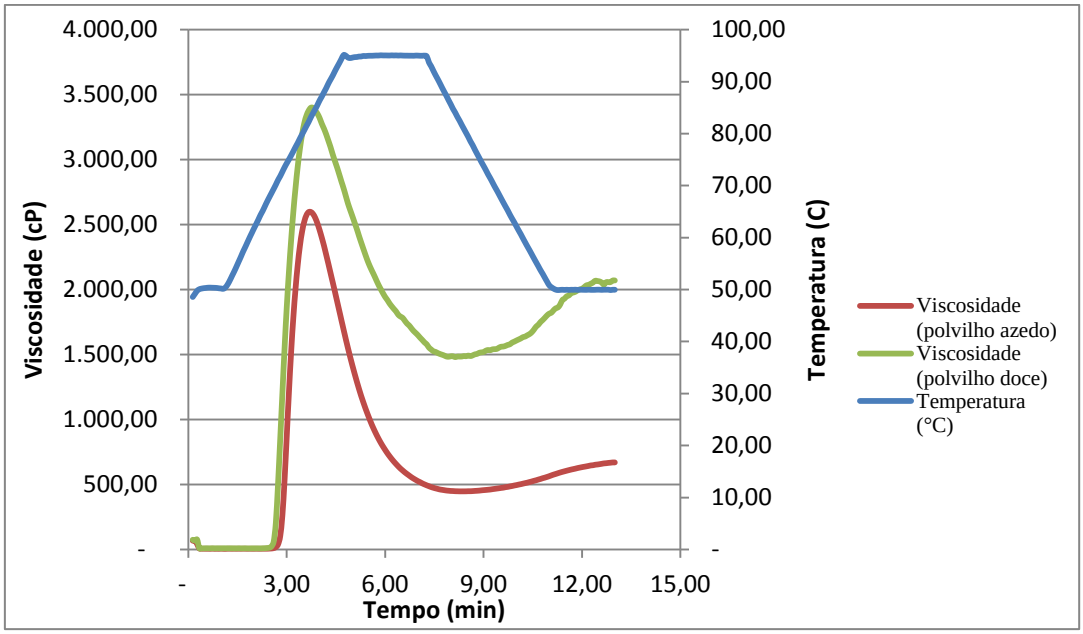


Figura 10. Viscoamilograma (RVA) em centipoise (cp) de polvilho doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), em função do tempo (min).

A viscosidade máxima é importante na avaliação de qualidade do polvilho, uma vez que a fluidez pode interferir nos equipamentos a serem utilizados e dimensionados numa linha de produção, até na formulação do produto a ser fabricado. Alguns estudos com análise de viscosidade cinemática em RVA apontam os valores de viscosidade máxima ao redor de 225 RVU (2700 cp) para polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) e, próximos a 380 RVU (4560 cp) para o polvilho doce (SANTISOPASRI *et al.*, 2001).Os resultados encontrados no presente estudo estão abaixo dos encontrados na literatura possivelmente devido ao elevado teores de acidez obtido ao final do processamento. De fato, a viscosidade máxima do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) é mais baixa que a do polvilho doce, e durante toda a análise a pasta de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) se mantêm menos viscosa, apresentando menor estabilidade à agitação e menor capacidade de retrogradação ou geleificação. A quebra de viscosidade, ou *breakdown* é resultado da diferença entre a viscosidade máxima a quente e a viscosidade mínima da pasta. Esta propriedade permite avaliar a estabilidade do amido em altas temperaturas, cujos grânulos se rompem sob agitação mecânica e está diretamente relacionada com a viscosidade máxima (DINIZ, 2006).

A viscosidade final é uma característica que vai depender das modificações que ocorrem nas estruturas do grânulo de amido e das moléculas durante o processamento. A tendência à retrogradação mede a diferença entre a viscosidade final e o menor valor de

viscosidade após o pico. Esta propriedade permite avaliar o comportamento da pasta durante o resfriamento.

A fécula de mandioca é muito utilizada para a produção dos amidos modificados (RIBEIRO & SERAVALLI, 2004). Segundo Whistler e Bemiller (1997), as indústrias recorrem à utilização desses amidos devido às suas características, como: modificar as características de cozimento, resistir à retrogradação, reduzir a tendência das pastas em formarem géis, aumentar a estabilidade das pastas ao resfriamento e congelamento, aumentar a transparência das pastas ou géis, melhorar a textura das pastas ou géis, melhorar a formação de filmes, aumentar a adesividade, adicionar grupamentos hidrofóbicos e introduzir poder emulsificante.

6.3.2 Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA)

O polvilho doce e polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) apresentaram valores semelhantes quanto ao índice de absorção de água e solubilidade em água, indicando que não houve efeitos à fermentação e secagem ao sol (Tabela 10).

Tabela 10. Índice de absorção de água (IAA) e índice de solubilidade em água (ISA) dos polvilhos doce (*t=1*) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

Amostra	Índice de absorção de água (%)	Índice de solubilidade em água (%)
Polvilho doce (*t=1*)	2,0 ±0,05^{ns}	0,2±0,02^{a}
Polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)	2,1±0,04^{ns}	0,6±0,11^{b}

Médias e desvio padrão de análises feitas em triplicata
Letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (p <0,001), de acordo com o teste de Bonferroni
ns = não significativo

O índice de absorção de água está relacionado com o grau de intumescimento ou gelatinização do amido, porque somente grânulos de amido gelatinizados conseguem absorver água em temperatura ambiente, aumentando a viscosidade (SILVA *et al*., 2011). Como o IAA foi realizado a 30 ºC, os polvilhos doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) não estavam inchados, porque eles não atingiram o mínimo de energia necessário para o processo de gelificação (Tabela 9). A despolimerização oxidativa no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) não foi eficiente o suficiente para motivar a solubilidade dos grânulos de amido em água fria, e nem permitiu a aproximação ao seu estado de pré-gelatinização, uma vez que os grânulos de amido apenas pré-gelatinizados podem absorver água à temperatura ambiente, aumentando a viscosidade do amido (SILVA *et al*., 2011).

O índice de absorção de água (IAA) é um parâmetro que mede o grau total de degradação do grânulo de amido. Entre as mudanças observadas durante o processo de fermentação de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), é esperado um aumento na solubilidade do amido (MARCON *et al*., 2007). No presente trabalho, o ISA obteve uma variação de 0,2 % ±0,02 para 0,6 % ±0,11, considerado um aumento significativo na solubilidade do amido no polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo).

Variações na qualidade do produto final de um mesmo produtor são frequentes, devido à falta de parâmetros de controle no processamento do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo). Portanto, a busca de melhorias no processo tecnológico para obter um produto final com melhor qualidade e padronização é um grande desafio para o setor. Geralmente, o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) apresenta maior valor de ISA do que os respectivos amidos nativos. Foi demonstrado em estudos que o polvilho doce apresenta solubilidade mais baixa do que o polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), devido à presença de amilose não solubilizada na região cristalina do grânulo nativo, enquanto que a amilose do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) já foi parcialmente libertada (MARCON *et al*., 2009; GOMES *et al*., 2005).

6.3.3 Propriedade de expansão

A capacidade de fabrico de pão para ambos os polvilhos é representada pelos valores de expansão da massa indicadas na Tabela 11. Houve um aumento significativo de 3,2 vezes na expansão da massa após a fermentação e tratamento de secagem ao sol, embora a produção de ácidos orgânicos durante a fermentação tenha sido discreta, como discutidas anteriormente, mas ainda suficiente para promover alterações físicas nos grânulos, aumentando a sua capacidade de inchar e solubilizar em água (DIAS *et al*., 2011).

Tabela 11. Poder de expansão dos polvilhos doce (t=1) e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo)

Polvilho	Expansão do volume (mL . g^{-1})
Doce (*t=1*)	$1,4 \pm 0,4^{a}$
Azedo **(**fermentado e seco ao sol)	$4,5 \pm 0,4^{b}$

Médias e desvio padrão de análises feitas em triplicata
As letras diferentes em uma mesma coluna diferem significativamente (p <0,001), de acordo com o teste de Bonferroni

No polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) foram formados ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático (DIAS *et al*., 2011) e a produção destes ácidos está relacionada com a propriedade de expansão desse amido (DEMIATE & CEREDA, 2000).

A hidrólise das ligações glicosídicas na região amorfa dos grânulos por ácidos, enzimas e irradiação UV resultou em aumento da mobilidade e uma maior heterogeneidade das moléculas de hidrogénio (análise relaxometria), que provavelmente resulta no desenvolvimento da propriedade de expansão.

Ao comparar os volumes específicos obtidos para os índices de expansão da massa estabelecidos por Demiate *et al*., (2000), pode-se observar que ambos os polvilhos mostraram baixos índices de expansão da massa, inferiores a 5 $mL.g^{-1}$ (Tabela 11). No entanto, os valores de expansão da massa aqui apresentados são semelhantes aos observados para as variedades genéticas distintas de mandioca (ALVARADO *et al*., 2013). Uma expansão da massa superior poderia ser obtido, um volume específico entre 5 e 10 mL g^{-1}, poderia ser atingido após 83 dias de fermentação (AQUINO *et al*., 2013).

A expansão da massa do polvilho pode ser devido à sua elevada capacidade de inchamento e a solubilidade resultante da degradação molecular, após a acidificação e irradiação (BERTOLINI *et al*., 2000). A maximização da expansão pode depender do grau de polimerização do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), número de grupos carboxil e hidroxil, pH, densidade dos grânulos e outros parâmetros que mostram correlação significativa, positivo ou negativo, com a expansão da massa e as suas características após o assamento, assim como no seu armazenamento depois do assamento (MARCON *et al*., 2009).

Apesar de não ser totalmente estabelecido, o mecanismo de expansão do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) pode ser semelhante ao dos produtos extrusados, em que a força motriz seria a evaporação da água e a expansão das células seria essencialmente governada pela viscosidade da massa (BERTOLINI *et al*., 2000). A despolimerização parcial do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) durante a fermentação e secagem ao sol forneceu pequenos fragmentos lineares e facilitou o desenvolvimento de uma estrutura de matriz amorfa de massa de amido (VATANASUCHART *et al*., 2005), reduzindo a viscosidade da massa durante a expansão, auxiliando na expansão da bolha. No entanto, outros fenômenos além da despolimerização poderiam melhorar a expansão da massa em diferentes estágios de assamento, incluindo as transferências de massa, tais como CO_2 ou deslocamento de água a partir da matriz circundante à expansão bolhas, inércia e tensão superficial (ALVARADO *et al*., 2013).

7 CONCLUSÕES FINAIS

- Foi detectada a presença de BAL e leveduras no processo de fermentação da mandioca incluindo *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pichia* sp., *Issatchenkia* sp., *Geotrichum* sp., *Clavispora* sp., *Rhodotorula* sp. e *Neurospora* sp;
- Houve contaminação por *Bacillus* sp. no final do processo de fermentação, o que mostra a necessidade de melhoria e implementação das boas práticas de fabricação no processo de obtenção deste produto;
- A fermentação natural induziu alteração nas propriedades físico-químicas e tecnológicas, resultando em uma fécula modificada como maior expansão que a nativa;
- Os ácidos produzidos foram ácido lático, acético e succínico, reduzindo pH e consequente aumento na acidez titulável após 30 dias de fermentação;
- Os valores de acidez total titulável e pH indicam que a fermentação deveria ter duração superior a 30 dias, considerando as mesmas condições de clima (temperatura e umidade do ar) para formação de maior quantidade de ácidos orgânicos, compostos voláteis e propriedades tecnológicas que garantissem qualidade ideal de expansão ao produto final;
- Hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e terpenóides foram encontrados em maior quantidade em polvilho doce. O polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) apresentou ácido acético compreendendo 51,2 % do composto volátil;
- Os valores de umidade apresentaram diferença entre o polvilho doce e fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), mas encontraram-se dentro das normas estabelecidas pela legislação brasileira;
- O processo de fermentação alterou significativamente o perfil de viscosidade do polvilho (maior *breakdown*) e menor tendência à retrogradação (menor *setback*);
- A expansão do polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo) foi significativamente maior que do polvilho doce. Os resultados de relaxometria mostraram maior mobilidade molecular das amostras de polvilho fermentado e seco ao sol (polvilho azedo), o que também comprova a maior capacidade de expansão;

REFERÊNCIAS

AACC International. (2010). Approved methods of analysis: Methods 10-05.01 and 44-15.02 (11th (On-Line) ed.). St. Paul, MN, USA.

ABAM. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE AMIDO DE MANDIOCA. Exportação: amidos modificados. 2010. Disponível em: <http://www.abam.com.br/includes/index.php?link_include=menu2/exportacao_amido.php&menu=2&item=4>. Acesso em: 20 nov. 2014.

ABBASI, A. Z. et al. Magnectic capsules for NMR imaging: effect of magnetic nanoparticles spatial distribuition and aggregation. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 14, p. 6257-6264, 2011.

ACOSTA, H. A. et al. Surface morphology of sour cassava and native potato thermoplastic starches by optical and atomic force microscopy. **Información Tecnológica**, v. 17, n.3, p. 63-70, 2006.

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

AIDOO, K. E.; NOUT, M. J. R.; SARKAR, K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n. 1, p. 30-39, 2006.

ALEXANDRE, D.P. et al. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de queijo-de-minas artesanal do Serro (MG) frente a microrganismos indicadores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n. 4, p.424-428, 2002.

ALVES, J. M. A. et al. Avaliação de dois clones de mandioca em duas épocas de colheita. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 15-24, 2008.

ALVES, G. S. et al. Material a base de amido de mandioca para manufatura de embalagens de alimentos. **Revista Citino**, v. 2, n. 1, p. 16-24, 2012.

ANCHORENA-MATIENZO, P. **Re-identificação e caracterização genética da levedura IZ-987 utilizando marcadores moleculares**. 2002. 65f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, 2002, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

AMPE, F.; SIRVENT, A; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 1-2, p. 45-54 , 2001.

ANDERSON, R. A., Conway, H. F., Pfeifer, V. F., & Griffin, E. L., Jr. Gelatinization of corn grits by roll- and extrusion-cooking. Cereal Science Today, 14, 47, 1969.

AO, Z.; JANE, J. Characterization and modeling of the A- and B-granule starches of wheat, triticale, and barley. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 1, p. 46 – 55, 2007.

APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Análises físico-químicas de pré-misturas de pães de queijo e produção de pães de queijo com adição de okara. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 5, p. 1416-1422, 2007.

AQUINO, A. C. M. S., Pereira, J. M., Watanable, L. B., & Amante, E. R. Standardization of the sour cassava starch reduces the processing time by fermentation water monitoring. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, p. 1892-1898, 2013.

ARIAS, L.V.B. **Fécula de mandioca e polvilho azedo para fabricação de pão de queijo**. In: Pizzinato, A; ORMESE, R.de C.S.S. Seminário Pão de Queijo: ingredientes, formulação e processo. Campinas: Governo do estado de São Paulo/ Secretaria de Agricultura e Abastecimento/ Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios/ Instituto de Tecnologia de Alimentos/ Centro de Tecnologia de Cereais e Chocolate, 2000, p.1-14.

ASCHERI, D. P. R.; BOÊNO, J. A.; BASSINELLO, P. Z.; ASCHERI, J. L. R. Correlation between grain nutritional content and pasting properties of pre-gelatinized red rice flour. **Revista Ceres**, v. 59, n.1, p. 16-24, 2012.

ATRIH, A. et al., Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-Listeria bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum C19. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1-2, p. 93-104, 2001.

ALVARADO, P. M. et al. Combined effect of fermentation, sun-drying and genotype on bread making ability of sour cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, 98, 1137-1146, 2013.

AL-TARAZI, Y. H.; ALSHAWABKEH, K. Effect of Dietary Formic and Propionic Acids Mixture on Limiting Salmonella pullorum in Layer Chicks. Asian-Aust. **Journal of Animal Science**, v. 16, n. 1, p. 77-82, 2003.

ÁVILA, D. E. R.; ASCHERI, D. I. R; ASCHERI, J. L. R. Caracterização dos rizomas filhos e da fécula do mangarito (Xanthosoma mafaffa Schott) e elaboração de filmes biodegradáveis. **B.CEPPA**, v.30, n.1, p.35-52, 2012.

BARROS LOPES, M., Soden, A., Henschke, P. A., & Langridge, P. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 4514-4520, 1996.

BATALHA, M. O.; BUAINAIN, A. M.; SOUZA FILHO, H. M. **Tecnologia de gestão agricultura familiar**. In: SOUZA FILHO, H. M.; BATALHA, M. O. (Orgs.). Gestão integrada a agricultura familiar. São Carlos: Edufscar, 2005.

BATHISTA, A. L. B. **Princípios Básicos de Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido**. 2005. Disponível em: http://bliblioteca.yolasite.com/resources/Princ%C3%ADpios%20B%C3%A1sicos%20de%20Resson%C3%A2ncia%20Magn%C3%A9tica%20Nuclear%20do%20Estado%20S%C3%B3lido.pdf. Acesso em: 13 jul. 2015.

BELLO-PÉREZ, L. A. et al. Isolation and Characterization of Starch from Seeds of Araucaria brasiliensis: A novel Starch for Application in Food Industry. **Starch/Starke**, v. 58, n. 6, p. 283-291, 2006a.

BELLO-PÉREZ, L.A.; MONTEALVO, M.G.M.; ACEVEDO, E.A. **Almidón: definición, estructura y propriedades**. In: LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. Carbohidratos em alimentos regionales iberoamericano. São Paulo:Edusp, 2006b. cap. 1, p. 17-46.

BEN OMAR, N. et al. Molecular diversity of lactic acid bacteria from cassava sour starch (Colombia). **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 285–291, 2000.

BERTOLINI, A. C.; MESTRES, C.; COLONNA, P. Rheological properties of acidified and UV irradiated starches. **Starch/Stärke**,v.52, n.10, p. 340–344, 2000.

BESHKOVA, D. et al. Pure cultures for making kefir. **Food Microbiology**, v. 19, n. 5, p. 537-544, 2002.

BLANDINO, A. et al. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, v. 36, n. 6, p. 527-543, 2003.

BLAST- BANK LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (2013). Estados Unidos: Disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi.> Acesso em: 12 out. 2013.

BOONNOP, K. et al. Enriching nutritivevalue of cassava root by yeast fermentation. **Scientia Agricola**, v. 66, n. 5, p. 629-633, 2009.

BRASIL. Resolução nº 12/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1978.

BRASIL. Resolução, n. 263 de setembro 2005. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 368-369, 2005.

BRASIL. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: p. 83-98, 2013.

BRITO, L. M.; TAVARES, M. I. B. Development of nanocomposites based on potato starch. **Polímeros**, v. 23, p. 771-777, 2013.

BUTOLO, J.E. **Qualidade de ingredientes na alimentação animal**. Campinas: Agros Comunicação, 2002. 420p.

CALLEJA, A., FALQUÉ, E. Volatile composition of Mencia wines. **Food Chemistry**, v. 90, p. 357–363, 2005.

CHAVES-LÓPEZ, C. et al. Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The Colombian heritage. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, p. 1031–1048, 2014.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, p. 131-149, 2000.

CARIDI, A. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physicochemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. **International Dairy Journal**, v.13, p.191-200, 2003.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v.28, n.4, p.281-370. 2002.

CARVALHO E. P. et al. Determinacion de la flora microbiana de la fécula de yuca fermentada (polvilho azedo) durante las diferentes etapas de processamento. **Alimentaria**, n. 305, p. 97-103, 1999.

CASALTA, E.; MONTEL, M. C. Safety assessment of dairy microorganism: The Lactococcus genus. **International Journal of food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 271-273, 2008.

CEREDA, M.P; et al. **Propriedades gerais do amido**. Campinas: Fundação Cargill, 2001. v. 1, 224 p. (Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas).

CEREDA, M. P. **Propriedades Gerais do Amido.** Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2002. v. 1, 203 p.

CHARLES, A. L. et al. Influence of amylopectin structure and amylose content on the gelling properties of five cultivars of cassava starches. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2717-2725, 2005.

CHATAKANONDA, P.; DICKINSON, L. C; CHINACHOTI, P. Mobility and distribution of water in cassava and potato starches by 1H and 2H NMR. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7445-7449, 2003.

COLBERT, M. Terpene Profile: Limonene. 2014. Disponível em: http://theleafonline.com/c/science/2014/09/terpene-profile-limonene/. Acesso em: 10 jun. 2015.

COLLADO, M. C.; HERNÁNDEZ, M. Identification and differentiation of *Lactobacillus*, *Streptococcus* and *Bifidobacterium* species in fermented milk products with bifidobacteria. **Microbiological Research**, v. 162, n.1, p.86-92, 2007.

COSER, T. B. et al. Evaluation of minimum deterction limit to hepatitis virus (HBV) PCR “nested”. **HCPA**, v. 28, n. 1, p. 5-9, 2008.

COULIN, P. **Optimization of Attiéké fermentation: a traditional cassava dish of regional significance in West África**. NIDECO (Network for International Development and Cooperation). 2003. Disponível em: <http://www.nideco.ethz.ch/pubs/Annual_Report/NIDECO_Portrait_and_Annual_Report_2003.pdf.> Acesso em: 22 jan 2004.

DAIUTO, E.R. **Características de féculas de tuberosas e suas relações com resistências dos géis sob condições de estresse aplicada na industrialização de alimentos**. 2005. 146f. Tese de doutorado em Agronomia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2005.

DELFEDERICO, L. et al. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 1, p. 20-7, 2006.

DEMIATE, I. M. et al. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 19, n. 1, p. 131-135, 1999.

DEMIATE, I. M. et al. Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 149-158, 2000.

DEMIATE, I. M., et al. Características de qualidade de amostras de polvilho doce. **Ciências Agrárias e Engenharia**, 9, 29-34, 2003.

DEMIATE, I. M. et al. Viscographic characteristics of oxidized cassava starches assessed by RVA. **Publicatio UEPG - Ciências Exatas e da Terra**, v. 11, n. 1, p.07-17, 2005.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v.39, n.3, p. 945-954, 2009.

DE VUYST, L.; NEYSENS, P. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p. 43-56, 2005.

DIAS, A. R. G. et al. Oxidação dos amidos de mandioca e de milho comum fermentados: desenvolvimento da propriedade de expansão. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 794-799, 2007.

DIAS, A. R. G. et al. Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidized with sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, 84, 268-275, 2011.

DINIZ, I.P. Caracterização tecnológica do polvilho azedo produzido em diferentes regiões do estado de Minas Gerais. 2006. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

DUBERNET, S.; DESMASURES, N.; GUÉGUEM, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. **FEMS Microbiology Letters**, v. 214, n. 2, p. 271-275, 2002.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products of Substances used in Animal Feed). (2014). **Scientific Opinion on the safety and efficacy of Tovocerin® (Bacillus toyonensis) as a feed additive for rabbits for fattening, chickens for fattening, weaned piglets, pigs for fattening, sows for reproduction, cattle for fattening, and calves for rearing**. EFSA Journal 2014, 12(7): 3766, 17 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3766

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura. **Mandioca**. 2014. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/mandioca-e-fruticultura/cultivos/mandioca.> Acesso em: 16 fev. 2015.

ESCOBAR,C.A.; MOLINARI,J. **Obtención de parâmetros para la evaluación de la calidad de un almidón agrio de yuca.** Universidad del Valle, 1990.

EUZÉBY, J. P. (2008). **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Lactococcus***. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/l/lactococcus.html.> Acesso em 16 mar. 2015.

EUZÉBY, J. P. (2009). **List of Prokaryotic names with standing in nomenclature – Genus *Lactobacillus*.** Disponível em: <http://www.bacterio.net/lactobacillus.html>. Acesso em: 16 de março de 2015.

FANI, M. Amidos: Fontes, Estruturas e Propriedades Funcionais. **Aditivos & Ingredientes**, São Paulo, n. 63, p. 26 – 37, 2009.

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

FAUBION, J. M., & Hoseney, R. C. (1982). High-temperature short time extrusioncooking of wheat starch and flour. I. Effect of moisture and flour type on extrudate properties. **Cereal Chemistry**, 59, 529-533.

FENNEMA, O.R**. Química de los alimentos**. 2ed. Zaragoza: Acribia S.A.Zaragoza, 2000.

FERREIRA, G. B. et al. Caracterização do processo de obtenção de uma aguardente de mandioca. **Brazilian Journal of Food Technology**, 5º SIPAL, mar, 2005. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos//brazilianjournal/ed_especial/02.pdf.> Acesso em: 13 jul. 2015.

FERREIRA, C. L. L. F. (2012). **Prebióticos e probióticos: Atualização e prospecção**. 1Ed. Rio de Janeiro, 248p.

FRANCO, C. M. L. et al. **Propriedades gerais do amido**. Fundação Cargill. Campinas. 2001.

FRANCO, J.; JANZANTTI, N. S. **Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor**. In: FRANCO, M. R. B. (Ed.). Aroma e Sabor de Alimentos: Temas atuais. São Paulo: Editora Varela, 2004. Cap. 1, p. 17-27.

FRANZ, C.M.A.P. et al. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, p. 105-122, 2003.

FUKUDA, C. Seminário "**A Importância Social e Econômica da Mandioca para o Brasil**". Brasília, 2001. Coordenação: Deputado Federal Aldo Rebelo. Disponível em: http://www.camara.gov.br/Internet/wwwdep/gab924/bonifacio/agricultura/SeminarioMandioca.html Acesso em: 23 fev. 2015.

FUKUOKA, M.; OHTA, K. I.; WATANABE, H. Determination of the terminal extent of starch gelatinization in a limited water system by DSC. **Journal of Food Engineering**, v. 53, n. 1, p. 39-42, 2002.

GARCIA, R.G. et al. Ação isolada ou combinada de ácidos orgânicos e promotor de crescimento em rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 2, p. 149-154, 2000.

GARRUTI, D. S. et al. Evaluation of volatile flavor compounds from cashew apple (Anacardium occidentale L.) juice by the OSME gas chromatography-olfactometry technique. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 14, p. 1455-1462, 2003.

GOLOWCZYC, M. A. et al. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 2, p. 211-7, 2008.

GOMES, A. M. M., SILVA, C. E. M., & RICARDO, N. M. P. S. Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 1-6, 2005.

GONÇALVES, F. M. V. et al. Tratamento térmico do amido de batata-doce (Ipomea batatas L.) sob baixa umidade em micro-ondas. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 270-276, 2009.

GROXKO, E. M. SEAB - Secretaria da Agricultura e Abastecimento. **Mandiocultura - Análise da Conjuntura Agropecuária**. 2012. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandiocultura_2012_13.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2014.

GUNARATNE, A.; HOOVER, R. Effect of heat-moisture treatment on the structure and physicochemical properties of tuber and root starches. **Carbohydrate Polymers**, v. 49, n. 4, p. 425-437, 2002.

GUYOT, J. P. et al. Characterization and differentiation of *Lactobacillus manihotivorans* strains isolated from cassava sour starch. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 1-2, p. 187-192, 2003.

GUYOT, J. P.; MORLON-GUYOT, J. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND 32T, an amylolytic *lactobacillus* isolated from sour starch cassava fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 217-225, 2001.

HALM, M. et al. Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. **International Journal Food of Microbiology**, v. 94, p. 97-103, 2004.

HELENO, F. F. et al. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida**. Química Nova**, v. 33, n. 2, p.329-336, 2010.

HENRIQUE, C. M.; CEREDA, M. P.; SARMENTO, S. B. S. Características físicas de filmesbiodegradáveis produzidos a partir de amidos modificados de mandioca. **Ciência e Tecnologia deAlimentos**, v.28, n. 1, p. 231-240, 2008.

HERMOGENES, R. EMBRAPA CERRADO, 2013. **Mandiocultura - Oportunidades de Pequenos Negócios.** http://www.sbmandioca.org/pagina.php?id_menu_int=6&id_texto_int=80. Acesso em 13 jul. 2015.

HOLZAPFEL, W. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. **International Journal of Food Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 197-212, 2002.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, p. 295, 296 e 776.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A Review. **Carbohydrate Polymers**, v. 45, n. 3, p. 253-267, 2001.

HUGAS, M.; GARRIGA, M.; AYMERICH, M.T. Functionality of enterococci in meatproducts. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 223-233, 2003.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods.** Oxford: Blackwell Publishing, 2006. 473p.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR CEREAL SCIENCE AND TECHNOLOGY - ICC. 1996. ICC Standard Methods, Vienna. Disponível em: <https://www.icc.or.at/standard_methods/162.> Acesso em 22 set. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE 2013. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Rio de Janeiro: IBGE, v. 26, n. 3, p. 1-86, 23 maio 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA - IEA. Banco de Dados. São Paulo: IEA. Disponível em: <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/AIA/AIA-22-2013.pdf.> Acesso em: 20 out. 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO. 1987. Norme internationale: Riz-détermination de la teneur em amylose. S. I, 5 p. (ISO 66470). Disponível em: http://www.iso.org/iso/fr/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=13073. Acesso em 24 set. 2014

JAILLAIS, B. et al. Outer product analysis (OPA) using PLS regression to study the retrogradation of starch, **Vibrational Spectroscopy**, v.39, n.1, p.50-58, 2005.

JIMENÉZ, G. et al. Description of Bacillus toyonensis sp. nov., a novel species of the Bacillus cereus group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by

means of ANI calculations. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 383-391, 2013.

KAFKAS, E. et al. Comparison of methodologies for the Identification of aroma compounds in strawberry. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 29, n. 5, p. 383-390, 2005.

KALRA, A. et al. Bacterial vaginosis: cultureand PCR-based characterizations of a complex polymicrobial disease's pathobiology. **Current Infectious Disease Reports**, v. 9, n. 6, p. 485-500, 2007.

KIMARYO, V. M. et al. The use of starter culture in the fermentation of cassava for the production of “Kivunde”, a traditional Tanzanian food product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 2-3, p. 179-190, 2000.

KIMMICH, R. et al. Plymer chain dynamics under nanoscopic confinements. **Magnetic Resonance Imaging**, v. 23, p. 191-196, 2005.

KONEMAN, E. W. et al. **Koneman´s color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 6ed. Lippincott: Williams and Wilkins, 2005, 1736p.

KOPERMSUB, P.; YUNCHALARD, S. Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaasom, a traditional fermented fish product of Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, n. 3, p. 200-204, 2010.

KOSTINEK, M. et al. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, 342-351, 2007.

KHUE, N. T.; NGOC, N. H. Exopolysaccharide in Lactobacillus rhamnosus Pn04 after co-culture with Leuconostoc mesenteroides Vtcc-B-643. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 14-17, 2013.

KUBO, M. et al. Pharmacological study on kefir--a fermented milk product in Caucasus. I. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 112, n. 7, 489-495, 1992.

LACERDA, I.C.A. et al. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 213-219, 2005.

LAJOLO, F.M.; MENEZES, E.W. **Carbohidratos em alimentos regionales Iberoamericanos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2006. 648p.

LEE, P. C. et al. Batch and continuous cultivation of Anaerobiospirillum succiniciproducens for the production of succinic acid from whey. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 23-27, 2000.

LEITE, A. M. O. et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, 96, 4149–4159, 2013.

LEITE, A. M. O. et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v. 31, n.2, p. 215-221, 2012.

LEONEL, M.; CEREDA, M.P. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.

LEONEL, M. Análise da forma e tamanho de grânulos de amidos de diferentes fontesbotânicas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 579-588, 2007.

LEONEL, M.; GARCIA A. C.D. B.; REIS, M.M. Caracterização físico-química e microscópica de amidos de batata-doce, biri, mandioca e taioba e propriedades de expansão após modificação fotoquímica. **Brazilian Journal Food Technology**, v.7, n.2, p.129-137, 2004.

LI, J.; YEH, A. Relationships between thermal, rheological characteristics and swelling power for various starches. **Journal of Food Engineering**, v. 50, p. 141-148, 2001.

LINDEBOOM, N.; CHANG, P.R.; TYLER, R.T. Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: a review**. Starch/Stärke**, v.56, n. 3-4, p.89-99, 2004.

LOBO, A. R.; SILVA, G. M. L. Resistant starch and its physicochemical properties. **Revista de Nutrição**, v.16, n.2, 2003.

LUO, J. et al. Allelic effects on starch structure and properties of six starch biosynthetic genes in a rice recombinant inbred line population. **Rice**, v. 8, p. 1-13, 2015.

MACHADO, A.V, CHAUCA-CANO, M, PEREIRA, J. **Avaliação do escaldamento nas propriedades microscópicas e de cristalinidade do polvilho azedo**. In: SIMPÓSIO LATINOAMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS SLACA, 7., 2007, Campinas. Anais... Campinas: Unicamp, 2007. CD-ROM.

MACHADO, A.V. et al. Efeito do escaldamento nas propriedades microscópias e cristalinidade do polvilho azedo. **Revista verde**, Mossoró, v.5, n.2, p.169-174, 2010.

MACHADO, A. C. S. D. V. et al. Study of the effect of drying using ultravioleta radiation on the technologycal properties of the fermented cassava starch. **Revista E-xacta**, v. 5, n. 1, p. 7-14, 2012.

MAEDA, K. C.; CEREDA, M. P. Avaliação de Duas Metodologias de Expansão ao Forno do Polvilho Azedo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 139-143, 2001.

MARCON, M. J. A. et al. The effect of fermentation on cassava starch microstructure. **Journal of Food Process Engineering**, v. 29, n. 4, p. 362-372, 2006.

MARCON, M. J. A. et al. Effect of the Improved Fermentation on Physicochemical Properties and Sensorial Acceptability of Sour Cassava Starch. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p. 1073-1081, 2007.

MARCON, M. J. A. et al. Expansion Properties of Sour Cassava Starch (Polvilho Azedo): Variables Related to its Practical Application in Bakery. **Starch**, v. 61, n. 12, p. 716 – 726, 2009.

MARTINS, J. C.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Propriedades de pasta de misturas extrusadas de polvilho azedo e farinha de soja integral. In: XIII Congresso Brasileiro de Mandioca. 2009. Disponível em: http://www.cerat.unesp.br/Home/compendio/trabalhos/processos_e_produtos/144%20PROPRIEDADES%20DE%20PASTA%20DE%20MISTURAS%20EXTRUSADAS%20DE%20POLVILHO%20AZEDO%20E%20FARINHA%20DE%20SOJA%20INTEGRAL.pdf> Acesso em: 14 jun. 2015.

MARTÍN, R. et al. **Probióticos: concepto, criterios de selección y seguridad.** In: La leche humana, un alimento vivo: bactérias probióticas en leche humana. (Ed) Granada: Puleva Food, S.L., 2010. cap. 104-121, p.234.

MARTÍNEZ-PAJARES, J. D. et al. Sepsis por *Leuconostoc* sp. en un lactante sano. **Archivos Argentinos de Pediatria**, v.110, n. 2, p. 32-34, 2012.

MATSUGUMA, L. S. et al. Characterization of native and oxidized starches of two varieties of Peruvian carrot (Arracacia xanthorrhiza, B.) from two production areas of Paraná state, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n.3, p. 701-713, 2009.

MAUNU, S. L. NMR studies of wood and wood products. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 40, n. 2, 151-174, 2002.

MCAULIFFE, O.; ROSS, R. P.; COLIN, H. Lantabiotics: structure, biosynthesis and mode of action. **FEMS Microbiol Reviews**, v. 25, n. 3, p. 285-308, 2001.

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, n. 1-2, p. 31-43, 2002.

MESTRES, C.; ROUAU, X. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 74, n. 2, p. 147-55, 1997.

MIAMBI, E.; GUYOT, J. P.; AMPE, F. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 111-120, 2003.

MITEVA, V. et. al. Differentiation of Lactobacillus delbrueckii subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 6, 909-918, 2001.

MIYAZAWA, M.; OSMAN, FITRIYAH. *Headspace* constituents of *Parkia speciosa* seeds. **Natural Product Letters**, v, 15, n. 3, p. 171-176, 2001.

MOGENSEN, G. et al. Food microorganisms - health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. **Bulletin of the International Dairy Federation**, n.377, p.4-9, 2003.

MOREIRA, J.L.S. et al. Identification to the species level of Lactobacillus isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, v.5, 15-25, 2005.

MORENO, M. R. F. et al. The role and application of enterococci in food and health. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 1-24, 2006.

MORENO, I.; LERAYER, A. L. S.; LEITÃO. M. F. F. Bacteriocinas de bactérias lácticas: Utilização em laticínios e fatores que afetam a sua eficiência. Disponível em: < http://www.infobibos.com/Artigos/2008_3/Bacteriocinas/Index.htm> Acesso em: 12 jun. 2015.

MOORTHY, S. N. **Tropical Sources of starch**. In: ELIASSON, A. C. Starch in food: Structure, function and applications CRC Press, Inc., Boca Raton, cap aa, 2004.
MUGULA, J. K.; NARVHUS, J. A.; SORHAUG, T. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of *togwa*, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 83, p. 307-318, 2003.

NARDI, R. M. D. et al. Purification and molecular characterization of antibacterial compounds produced by *Lactobacillus murinus* strain L1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 649-656, 2005.

NAUMOVA, E., Ivannikova, Y., & Naumov, G. Genetic differentiation of the sherry yeasts Saccharomyces cerevisiae. **Applied Biochemistry Microbiology**, 41, 578-582, 2005.

OGIER, J. C. et al. Safety assessment of dairy microorganisms:
the *Leuconostoc* genus. **International Journal of Food Microbiology.** v. 126, n. 3, p. 286-90, 2008.

OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of Candida species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. **Food Control**, v. 19, n. 5, p. 465-469, 2008.

OYEWOLE, O. B. Characterization and significance of yeast involvement in cassava fermentation for *fufu* production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 3, 213-218, 2001.

PADANOU, S. W. et al. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 22-30, 2009.

PANDEY, A. et al. Biotchnological potencial of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Tecnology**, v.74, n.1, p. 69-80, 2000.

PARAMITHIOTIS, S. et al. Interactions between Saccharomyces cerevisiae and lactic acid bacteria in sourdough. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2429–2433, 2006.

PARK, K. J.; ANTONIO, G. C. **Análise de materiais biológicos**. Campinas. Faculdade de engenharia agrícola. UNICAMP, 2006.

PELCZAR JUNIOR.; M.; CHAN E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia- Conceitos e Aplicações.** 2ª Ed. V.2. Editora Makron Books. São Paulo. 1996.

PEREIRA, J. Caracterização química, física, estrutural e sensorial do pão de queijo. 2001. 222 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

PUTRI, W.D.R.; MARSENO, H.D.W.; CAHYANTO, M.N.C. Role of lactic acid bacteria on structural and physicochemical properties of sour cassava starch. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 104-109, 2012.

QUIÑONES-PÉREZ, D. et al. Susceptibilidad antimicrobiana y bases genéticas de la resistencia de cepas de Enterococcus causantes de infecciones en Cuba. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v.30, n. 6, p. 549–54, 2011.

RAKSHIT, S.K. **Recent trends in cassava starch prodution and application.** Tailândia. 2004. Disponível em: <http:// www.agfdt.de/loads/st00/raksit.pdf. Acesso em: 04 de jul. 2015.

RATTRAY, F. P., O'CONNELL, M. J. **Fermented Milks | Kefir**. In: Fukay, J. W. (ed.), 484 Encyclopedia of Dairy Sciences (2th ed). Academic Press , San Diego, USA, p. 518-524, 2011.

REGINATTO, V. et al. Modificação do Processo de Produção de Polvilho Azedo Visando o Aumento na Concentração de Ácidos Orgânicos na Água Residuária. 2º International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, 2009.

REINECCIUS, G. Flavor formation in fruits and vegetables. In: REINECCIUS, G. **Flavor chemistry and technology**. 2. ed. Boa Roton: Taylor & Francis, 2006. Cap. 4, p. 73-101.

REIS, M.M.; FERREIRA, M.M.C.; SARMENTO, S.B.S. A multi-way analysis ofstarch cassava properties**. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 64, p.123– 135, 2002.

REIS JUNIOR, F. B. et al.Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo. 2002. Disponível em: file:///C:/Users/karin_000/Downloads/Uso-de-Ferramentas-Moleculares-em-Estudos-da-Diversidade-de-Microrganismos-do-Solo.pdf. Acesso em: 17 jul 2015.

REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de Azospirillum amazonense associados a Brachiaria sp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, n. 1, p. 103-113, 2004.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher. Instituto de Mauá de Tecnologia, 2004,183p.

RICKE, S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632-639, 2003.

ROCHA, T. S.; DEMIATE, I. M.; FRANCO, C. M. L. Caracteríticas estruturais e físico-químicas de amidos de mandioquinha-salsa (*Arracacia xanthorriza*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 620-628, 2008.

RODRIGUES, K. L. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005.

RODRÍGUEZ-SANDOVAL, E. Starch Retrogradation in cassava flour from cooked parenchyma. **Starch/Stärke**, v. 60, p. 174-180, 2008.

RODRIGUEZ-SANOJA, R. et al. Comparative characterization of complete and truncated forms of Lactobacillus amylovorus α-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3350-3356, 2000.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. **A moderna microbiologia do solo: Aplicação de técnicas de biologia molecular**. In: SIQUEIRA, J. et al. Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas. (Ed.). Viçosa: SBCS, 1999, p. 429-448.

SALLA, D. A. et al. Análise energética de systemas de produção de etanol de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). 2010. Disponível em: <http://mundodacana.blogspot.com.br/2010/08/analise-energetica-de-sistemas-de.html.> Acesso em 15 jul. 2015.

SAMBROOK, J., & RUSSEL, D. W. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Chapter 5).

SANTISOPASRI, V. et al. Impact of water stress on yield and quality of cassava starch. **Industrial Crops and Products an International Journal**, v. 13, p. 115-129, 2001.

SARMENTO, S. B. S.; LUZ, G. M.; ROMO, I. C. F.; JUNIOR, M. D. M. Características físico-químicas e funcionais de amostras comerciais de polvilho azedo. 21º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP. 21 de outubro de 2013.

SASAKI, T.; YASUI, T.; MATSUKI, J. Effect of amylose content on gelatinization, retrogradation, and pasting properties of starch from waxy and nonwaxy wheat and their F1 seeds. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 58-63, 2000.

SCHLEMMER, D. SALES, M. J. A. Preparação, caracterização e degradação de Blendas PS/TPS Usando Glicerol e Óleo de Buriti como Plastificantes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 20, n. 1, p. 6-13, 2010.

SCHWAN, R. F. et al. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 6, p. 966-972, 2007.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Estudo de mercado sobre a mandioca (farinha e fécula)**. 2008. Disponível em:

<http://201.2.114.147/bds/BDS.nsf/2AA42520A9A66B5783257405004FCB94/$File/01.relatorio_MANDIOCA.pdf.> Acesso em: 10 jul. 2015.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Panorama do mercado da mandioca**. 2014. Disponível em: http://www.sebrae2014.com.br/Sebrae/Sebrae%202014/Boletins/2014_07_14_BO_Agroneg%C3%B3cio_Panorama_do_mercado_da_mandioca.pdf Acesso em: 24 mar. 2015.

SCHMITZ, C. S. et al. Cassava starch functional properties by etherification-hydroxypropylation. **International Journal of food Science and Technology**, v. 41, p. 681-687, 2006.

SIKORA, M. et al. Use of modified starches as thickeners of cocoa syrups. **Food Science and Technology International**, v. 10, n. 5, p. 347-354, 2004.

SILVA, G. O. et al. Physicochemical characteristics of modified food starches commercialized in Brazil. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 188-197, 2006.

SILVA, K. R. et al. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 316-325, 2009.

SILVA, P. A. et al. Development and characterization of an extruded breakfast cereal from cassava enriched with milk whey protein concentrate. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, p. 260-266, 2011.

SILVEIRA, I. A. et al. Aspectos gerais e microbiológicos da fermentação de fécula de mandioca para a produção de polvilho azedo. **Higiene Alimentar**. v. 14, p. 26-31, 2000.

SINGH, N. et al. Morphological, Thermal and Reological Properties of Starches from Different Botanical Sources. **Food Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 219-231, 2003.

SOARES, F. D. et al. Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. **Food Chemistry**, v. 100, n. 1, p.15-21, 2007.

SOUSA GALVAO, M. et al. Volatile compounds and descriptive odor attributes in umbu (Spondias tuberosa) fruits during maturation. **Food Research International**, Barking, England, v. 44, n.7, p. 1919-1926, 2011.

SOUZA, C.; BRAGANÇA, M. L. **Processamento Artesanal da Mandioca: fabricação da farinha de mandioca**. Belo Horizonte. EMATER/MG, agosto/2000. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/doc%5Csite%5Cserevicoseprodutos%5Clivraria%5CAgroind%C3%BAstria%5Cprocessamento%20artesanal%20da%20mandioca%20-%20fabrica%C3%A7%C3%A3o%20do%20polvilho.pdf.> Acesso em: 23 out. 2014.

SPERRY, S. **Fábricas artesanais: estratégia da agricultura familiar a ser interpretada e explorada com maior eficiência**. Planaltina-DF. EMBRAPA CERRADOS, 2002. Disponível em: <http://bbeletronica.cpac.embrapa.br/2002/doc/doc_60.pdf.> Acesso em: 13 jul. 2015.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for etanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1-11, 2002.

SUNESSON, A. L. et al. Influence of temperature, oxygen and carbon dioxide levels on the production of volatile metabolites from Streptomyces albidoflavus cultivated on gypsum board and tryptone glucose extract agar. **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 41, p. 393-413, 1997.

TAGGART, P. **Starch as an ingredient: manufacture and application**. In: ELIASSON, A. C. Starch in food: Structure, function and application CRC Press, Inc., Boca Raton, cap. 12, 2004.

TAKIZAWA, F. F. et al. Characterization of tropical starches modified with potassium permanganate and lactic acid. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n. 6, p. 921-931, 2004.

TANG, H.R.; GODWARD, J.; HILLS, B. P. (2000). The distribution of water in native starch granules - A multinuclear NMR study. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 375-387, 2000.

TANG, H.R., BRUN, A., HILLS, B. P. A proton NMR relaxation study of the gelatinisation and acid hydrolysis of native potato starch. Carbohydrate Polymers, v. 46, n. 1,p. 7-18, 2001.

TAVARES, M. I. B. & SILVA, A. L. B. B. **Introdução à relaxação magnética nuclear**. NC: LULU Inc, 2010. 109p. 01 ed. 2011. v. 01. 85p.

THIRÉ, R. M. S. M.; SIMÃO, R. A.; ANDRADE, C. T. High resolution imaging of the microstructure of maize starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 2, p. 149-158, 2003.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches: practical guides for the food industry**. Minnesota: Eagan Press, 1999. 94 p.

THOMAZINI, M.; FRANCO, M.R.B. Metodologia para análise dos constituintes voláteis do sabor. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 34, n. 1, p. 52-59, 2000.

TUKOMANE, T. et al. Preparation and characterization of annealed- enzymatically hydrolyzed tapioca starch and the utilization in tableting. **Starch/Stärke**, v. 59, P. 33-45, 2007.

URAZ, G.; SIMSEK, H.; MARAS, Y. The inhibitory effects of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus helveticus* on *Bacillus* species isolated from raw milk in various salt concentrations. **International Journal of Dairy Technology**, v.54, n. 4, p.146-150, 2001.

URRAZA, P. J. et al. DNA fingerprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Journal of Dairy Research**, v. 67, n. 3, p. 381-392, 2000.

VANDEPUTTE, G. E.; DELCOUR, J. A. From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 3, p. 245-266, 2004.

VARMING, C.; PETERSEN, M. A.; POLL, L. Comparison of isolation methods for the determination of important aroma compounds in black currant (Ribes nigrum L.) juice, using nasal impact frequency profiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1647-1652, 2004.

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

VILPOUX, O. **Produção de farinha d´água no estado do maranhão**. In: CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, v. 3, p. 621–642.

VOGELMANN, S. A. et al. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, n. 3, p. 205-212, 2009.

WANG, X.et al. Diversity of a stable enrichment culture, which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 57, p. 106-115, 2006.

WANG, Y.; WANG, L. Physicochemical properties of commom and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 207-217, 2003.

WANG, Y.; YANG, C.; LI S, Y. Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP–SPME with GC–MS. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 356–364, 2009.

WEBER, F. H.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; CHANG, Y. K. Caracterização físico-química, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.29, n.4, p.748-753, 2009.

WESTBY, A. **Cassava Utilization, Storage and Small-scale Processing**. In: HILLOCKS, R. J. Cassava: Biology, Production and Utilization. (Eds.). New York: CAB International Publishing, 2002. p.481-300.

WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J.N. **Carbohydrate Chemistry for Food Scientists**. Saint Paul, AACC, p.117-151. 1997.

WOSIACKI, G; CEREDA, M. **Valorização dos resíduos do processamento de mandioca**. Publication UEPG - Ciências Exatas e da Terra, v. 8, n. 1, p. 27-43, 2002.

ANEXO A – ARTIGO: Evaluating physicochemical and technological characteristics and microbial community dynamics during the fermentation of cassava starch

Elsevier Editorial System(tm) for Food Chemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluating physicochemical and technological characteristics and microbial community dynamics during the fermentation of cassava starch

Article Type: Research Article (max 7,500 words)

Keywords: DNA sequencing, headspace volatile analysis, organic acids, spin-lattice relaxation, loaf expansion

Corresponding Author: Dr. Vania Margaret Flosi Paschoalin, PhD

Corresponding Author's Institution: Instituo de Quimica - Universidade federal do Rio de Janeiro

First Author: Karine Hojo Rebouças, Msc.

Order of Authors: Karine Hojo Rebouças, Msc.; Laidson Paes Gomes, Msc.; Analy Machado de Oliveira Leite, Ph.D.; Thais M Uekane, Msc.; Claudia Moraes de Rezende, Ph.D.; Maria I B. Tavares, Ph.D.; Eveline L. Almeida, Ph.D.; Eduardo Mere Del Aguila, Ph.D.; Vania Margaret Flosi Paschoalin, PhD

Abstract: The traditional fermentation of cassava starch was investigated by a polyphasic approach combining (i) microbial community identification using conventional and molecular techniques, (ii) analyses of organic acids, volatile compounds, fermentation products and spin-lattice relation time and (iii) evaluation of technological properties, such as pasting properties, water absorption and water solubility indexes. Cassava fermentation was dominated by bacteria and yeasts genera, including Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Enterococcus, Bacillus, Pichia, Issatchenkia, Geotrichum, Clavispora, Rhodotorula and Neurospora. The pH reduction was caused by the production of acetic, lactic and succinic acids. Volatile compounds included organic acids, aliphatic and aromatic hydrocarbons, esters and terpenes, which contribute to the aroma and correspond to 35% of the compounds after fermentation and sun-drying treatment. The expansion ability of the final product was increased as revealed by a shorter spin-lattice relaxation time. The fermented cassava showed increased breakdown, decreased peak viscosity and setback and no gain in water absorption and solubility. The results of this study may be useful to standardize the manufacturing process of cassava starch in Brazil, providing homogeneous and high quality products.

Cover Letter

Rio de Janeiro, July 10th, 2015.

G. G. Birch
Editor-in-chief
Food Chemistry

Dear Sir

Please find enclosed the manuscript entitled **"Evaluating the physicochemical, technonological characteristics and the microbial community dynamics during fermentation of cassava starch".** The authors are Karine H Rebouças, Laidson P Gomes, Analy M O Leite, Thais M Uekane, Claudia M de Rezende, Maria Inês B. Tavares, Eveline L. Almeida, Eduardo M Del Aguila and Vânia Margaret F Paschoalin.

At the present study, the traditional fermentation of cassava starch was investigated by a polyphasic approach combining (i) microbial community identification using enumerations with culture media, RAPD-PCR and ITS-PCR of total community DNA with bacterial and eukaryotic primers and partial sequencing of ribosomal DNA, (ii) analyses of sugars, organic acids, volatile compounds, fermentation products, and spin-lattice relation time by using HPLC, HS-SPME/GC-qMS and LF-NMR; (iii) and evaluation of the technological properties as pasting properties, water absorption and water solubility indexes, using several parameters including the RVA ones.

As the corresponding author, I have obtained the agreement of all co-authors to submit the manuscript to "Food Chemistry".

The data are original and the manuscript is not under consideration for publication anywhere.

We hope that the manuscript will be considered suitable for publication in this reputable journal.

Cordial regards,

Vânia M. Flosi Paschoalin
Instituto de Química -Universidade Federal do Rio de Janeiro
Av. Athos da Silveira Ramos 149 – sala 545
Cidade Universitária 21949-909 – Rio de Janeiro (RJ) - Brazil
e-mail: paschv@iq.ufrj.br
tel: 55 21 3938 7362 fax: 55 21 3938 7266

*Highlights (for review)

Highlights

Microorganisms from natural cassava starch fermentation were identified by molecular techniques

Acetic, lactic and succinic acids were produced during cassava fermentation

The fermented product presented volatile compounds

Sour (sun-dried) cassava starch showed increased expansion ability

Sour cassava starch showed increased breakdown, decreased peak viscosity and setback.

*Manuscript
Click here to view linked References

Evaluating physicochemical and technological characteristics and microbial community dynamics during the fermentation of cassava starch

Karine H Rebouças[1], Laidson P Gomes[1], Analy M O Leite[2], Thais M Uekane[1], Claudia M de Rezende[1], Maria Inês B. Tavares[3], Eveline L. Almeida[4], Eduardo M Del Aguila[1] and Vânia M. Flosi Paschoalin[1*];

[1] Instituto de Química,
[3] Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano
[4]Escola de Química
Avenida Athos da Silveira Ramos, 149. Bloco A, Cidade Universitária - Rio de Janeiro-RJ, 21.941-909, Brazil;
[2]Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Campus Macaé. Rua Aloísio da Silva Gomes, 50 – Granja dos Cavaleiros. Macaé-RJ, 27.930-560, Brazil;

*Corresponding author

Tel +55 21 39387362
Fax +55 21 39387266
E-mail adresses:
karine.reboucas@bonfim.ifbaino.edu.br (K. H. Rebouças), laidsonpaes@gmail.com (L. P. Gomes), analyleite@macae.ufrj.br (A. M. O. Leite), thais.uekane@gmail.com (T. M. Uekane), crezende@iq.ufrj.br (C. M. Resende), mibt@ima.ufrj.br (M. I. B. Tavares), eveline@eq.ufrj.br (E. L. Almeida), emda@iq.ufrj.br (E. M. Del Aguila), pachv@iq.ufrj.br (V. M. F. Paschoalin).

ABSTRACT

The traditional fermentation of cassava starch was investigated by a polyphasic approach combining (i) microbial community identification using conventional and molecular techniques, (ii) analyses of organic acids, volatile compounds, fermentation products and spin-lattice relation time and (iii) evaluation of technological properties, such as pasting properties, water absorption and water solubility indexes. Cassava fermentation was dominated by bacteria and yeasts genera, including *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus, Pichia*, *Issatchenkia*, *Geotrichum, Clavispora*, *Rhodotorula* and *Neurospora.* Acetic, lactic and succinic acids were produced. Volatile compounds included aliphatic and aromatic hydrocarbons, esters and terpenes, which contribute to the aroma and correspond to 23% of the compounds after fermentation and sun-drying treatment. The expansion ability of the final product was increased. The fermented cassava showed increased breakdown, decreased peak viscosity and setback and. The results showed here should be useful to standardize the manufacturing of cassava starch in Brazil, providing homogeneous and high quality products.

Keywords: DNA sequencing, headspace volatile analysis, organic acids, spin-lattice relaxation, loaf expansion

1. Introduction

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), a wood strub belonging to the *Euphorbiaceae* family (spurge), is considered an important source of food and dietary calories for large populations of tropical countries in Asia, Africa and Latin America (Olsen & Schaal, 2001). Originally from Latin America, it is a shrubby plant, made up of a shoot and an underground portion. It is known as "tapioca" in Asian countries, as "mandioca", "aipim", "castelinha" and "macaxeira" in Brazil, as "yuca" in Spanish-speaking countries of Latin America, and as "manioc" in French-speaking countries in Africa (Pandey, Soccol, Nigam, & Soccol, 2000).

In Brazil, cassava production is currently increasing and it is estimated that in the next 30 years the projected production should reach 106 million tons (ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/2013/lspa_201304.pdf).

Cassava starch has various applications in industry, such as in food, paper, and adhesives; however, only a small portion of starch is used in its native state, and mostly it is modified by chemical or physics agents. Cassava fermented and sun-dried starch or sour (sun-dried) cassava starch ("polvilho azedo" in Brazil or "almidón agrio" in Colombia) is used for the production of special types of gluten-free breads and biscuits that are very popular in some countries of South America (Alvarado et al., 2013).

Currently, a large number of individuals in many Western societies adopt a gluten-free diet, avoiding wheat, rye and barley. Although there are at least three clinical gluten-related conditions recognized – celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity – most people change to a gluten-free diet even without any well-defined-medical reason (Lundin, 2014).

The market for gluten-free products has been increasing speedily (Gallagher, Gormley, & Arendt, 2004), opening opportunities for the development of new technologies using gluten-free ingredients as alternative for traditional manufacturing bakery products (Schober, 2009). Sour (sun-dried) cassava starch can be used as an adjuvant for bread making or as the main ingredient for gluten-free breads.

Cassava starch fermentation is a common process conducted in small rural cassava starch factories to improve the textural qualities of the starch (Oluwasola, 2010). Natural fermentation is predominantly associated with the fermentative activities of bacteria and yeasts (Lacerda et al., 2005). Cassava fermentation is carried out in tanks for a period of about 30-40 days. The wet acid starch is then sun-dried for a period, depending on the season, generating a non-uniform product. During fermentation considerable amounts of cyanide are removed and antimicrobial compounds are produced including bacteriocins, organic acids, hydrogen peroxide, and other active, low molecular weight metabolites (Holzapfel, 2002).

Frequent variations occur in the quality of the final product from different producers and even from the same producer using raw material from the same origin. This occurs because there are no control parameters applied in the process. During manufacturing, sour cassava starch can be contaminated by unknown microorganisms, which may change the technological characteristics of the product (Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda, & Wosiacki, 2000).

In the present study, a polyphasic approach was applied to describe dynamic changes in the physical, chemical, microbiological and technological characteristics occurring during the natural fermentation of Brazilian cassava starch in the manufacturing of sour cassava starch. The dynamics of the microbial community involved in spontaneous fermentation was evaluated by conducting enumerations using culture media and molecular identifications

tools, such as RAPD and partial DNA sequencing. Physical and chemical characteristics, including sugar, organic acid, volatile compound contents, fermentation product contents and the spin-lattice relaxation time were determined by HPLC, HS-SPME/GC-qMS and LF-NMR, respectively. Technological properties, RVA average parameters, water absorption index and water solubility index, were also determined.

In view of the need for standardization and improvement of the Brazilian manufacturing process, knowledge and characterization of the manufacturing process and the final product can serve as a basis for planning and obtaining controlled products superior to the ones currently produced. To the best of our knowledge, this is the first time that cassava and sour (sun-dried) cassava starch were evaluated considering their microbiological, physico-chemical and technological properties.

2. Material and methods

2.1. Sour cassava starch (fermented and sun-dried)

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivated in the Paraná state, Southern Brazil, was processed into sour (sun-dried) cassava starch in accordance to the traditional small-scale processing of Northeastern Brazil. The cassava was washed, peeled and washed a second time for dirt removal. Subsequently, they were grated and the obtained mass was washed again and strained in fine mesh fabric until the water leaching from the cassava was transparent. The wet-extracted starch was sun-dried for 12h.

The sun-dried extracted starch was put in 1.63 m height polyethylene tanks with 5,000 liters capacity and covered with a layer of running water of approximately 20 cm and allowed to naturally ferment for 30 days at ambient temperature (around 18°C in winter). After

115 fermentation, the cassava starch was laid on high density polyethylene (HDPE) black canvas
116 and sun-dried for 12h. Cassava starch was sampled at (*t=1*) and (*t=30*) days of fermentation
117 alongside the final product of sour (sun-dried) cassava starch for further analyses.
118
119 *2.2. Microorganism enumeration*
120 Microorganism enumeration was carried out at the beginning of fermentation (*t=1*), after
121 30 days of fermentation (*t=30*) and in the final product, sour (sun-dried) cassava starch. For
122 lactic acid bacteria enumeration and identification, M17 agar plates (HIMEDIA, Mumbai,
123 Índia) were incubated at 30 ºC for 48 h, lactobacilli MRS agar plates (BD, Le Pont de Claix,
124 France) at 37 ºC for 4 days under anaerobic jars using a Gaspak anaerobic generator (Becton
125 Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) and Azide Blood Agar Base (Becton
126 Dickinson and Company, Le Pont de Claix, France) at 37 ºC for 4 days. For yeast
127 enumeration and isolation, malt extract agar (Himedia, Mumbai, India) and YPD 2% (2%
128 peptone, 1% yeast extract and 2% glucose) were used, incubated at 25 º C for 7 days.
129 Colonies with distinct morphologies were selected randomly and the cultures were stored in
130 the corresponding isolation broth described above containing 20% glycerol, until further
131 analyses.
132
133 *2.3. Microorganism molecular identification*
134 DNA templates from bacterial and yeast colonies were obtained as described by
135 Sambrook and Russell (2001) and quantified using the Qubit dsDNA HS kit (Invitrogen™,
136 Grand Island, New York, USA). Partial amplification of the 16S rDNA, using the primer pair
137 27F (5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´) and 1512R (5´-
138 ACGGCTACCTTGTTACGACT-3´), described by Wang et al. (2006), was performed using

Taq DNA polymerase (Invitrogen™, Grand Island, New York, USA) in a DNA thermocycler (MyCycler™, Bio-rad, Hercules, CA, USA).

The amplicons were digested with restriction enzymes *ApaI* and *XhoI* (Promega, Madison, USA) and *DdeI* (Fermentas, São Paulo, Brazil), following the manufacturer's instructions. The digestion profile was resolved by electrophoresis on 1.2% agarose gels, and electrophoresis was carried out in 1X TAE buffer for 70 min at 100V and 200mA. Gels were stained with GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) diluted at 1:10,000 and documented under a MiniBis Pro UV light using the GelCapture software (DNR Bio-Imaging Systems, Hamisha, Israel). Representative profiles of each species observed in the amplified ribosomal DNA restriction analysis were selected for sequencing.

Yeast DNA templates were analyzed by RAPD-PCR using the primer EI1 (5'-CTG GCT TGG TGT ATG -3') (Barros Lopes, Soden, Henschke, & Langridge, 1996).

The band profiles were resolved on 2% gels subsequently stained with GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA) diluted at 1:10,000 and documented as described above.

The representative profiles were selected for sequencing and amplified with the primer pairs ITS1 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) and ITS4 (5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´) as described by Naumova, Ivannikova, & Naumov, 2005.

PCR products from bacteria and yeast were purified by PCR DNA and the use of the Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Science Inc., Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The sequencing analysis of partial 16S rDNA gene and ITS region was accomplished with a 3130 sequencer (Applied Biosystems Inc., Tokyo, Japan) and subsequently used for identification of the bacteria and yeast, respectively. The identities of the sequences were determined by using the BLASTn algorithm at the GenBank database (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome).

164 *2.4. Physicochemical characterization of cassava starch*

165 *2.4.1. Moisture content evaluation*

166 The moisture content of the analyzed starch was determined according to the protocol
167 from the American Association of Cereal Chemists (AACC, 2010) International Approved
168 Method 44-15.02.

169

170 *2.4.2. Amylose and amylopectin content*

171 The apparent amylose content was estimated in quadruplicate by iodine-based
172 colorimetry according to the method number 66470 from the International Organization for
173 Standardization
174 (http://www.iso.org/iso/fr/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=13073).
175 The absorbance was measured on a DU-730 spectrophotometer (Beckman Coulter, Fullerton,
176 USA) at 620nm. The percentage content of amylopectin was estimated by difference
177 (amylopectin percentage content = 100 - apparent amylose percentage content).

178

179 *2.4.3. Determination of titratable acidity and pH*

180 Titratable acidity and pH were determined according to the 016/IV e 017/IV methods,
181 respectively, from the Adolfo Lutz Institute (IAL, 2008) using a calibrated potentiometer.

182

183 *2.4.4. Organic acid content determination*

184 The organic acid content of starch was determined as described by Leite et al. (2013).
185 Briefly, 25 mL of H_2SO_4 45 mmol.L^{-1} were added to 5 g of starch and homogeneized for 1 h
186 on a rotatory shaker at 250 rpm. The supernatant resultant from of a centrifugation at 6,000*x* g
187 was filtered through 0.45 µm filters (Millipore Corp, Billerica, USA). Filtered samples were
188 injected (50 µL) into an HPLC system (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan) equipped with an

189 HPX-87H Aminex fermentation monitoring column (150 × 7.8-mm i.d., Bio-Rad
190 Laboratories Inc, Hercules, USA), protected by a cation H^+ Micro-Guard cartridge (30 × 4.6-
191 mm i.d.; Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, USA). The mobile phase (isocratic) was 3 mM
192 H_2SO_4 at a flow rate of 0.7 $mL.min^{-1}$ at 65ºC. Organic acids (lactic, acetic, citric, succinic,
193 butyric and propionic) were quantified by using a diode array detector model SPD-M20A
194 (Shimadzu Corp, Tokyo, Japan), monitoring the absorbance at 210 nm. Chromatograms from
195 the HPLC and compound quantifications were obtained using the LC Solution software
196 (Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). Standard curves based on peak area were calculated for the
197 individual concentrations of the determined organic acids, covering a broad range of
198 concentrations, by comparison with standard solutions. Standards (Supelco Analytical, Sigma,
199 St Louis, MO, USA) were prepared in deionized water filtered through 0.45-μm filters
200 (Millipore Corp.). The analyses were performed in triplicate.
201
202 *2.4.5 Determination of volatile compounds*
203 The volatile compounds present in the headspace samples were extracted using solid
204 phase micro-extraction (SPME) for 30 min at room temperature using a three-phase fiber
205 50/30μm DVB/CAR/PDMS into an Agilent 6890 gas chromatograph coupled to an Agilent
206 5973 N mass selective detector (GC/MS) and a DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 mm, J & W
207 Scientific, Folsom, CA). Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min. The
208 oven temperature was programmed from 50 to 250 °C at 5 °C/minute. Injector temperature
209 was kept at 260 °C. The mass detector was operated in an electronic ionization mode (70 eV)
210 at 3.15 scan/s with a mass range from 30 to 550u. Transfer line was kept at 250 °C, ion source
211 at 230 °C, and a analyzer at 150 °C. The compounds were identified according to the Wiley
212 mass spectrometer library (Enhanced data analysis software, Agilent, New York, USA).
213

2.4.6. Determination of the spin-lattice relation time

The analyses were performed using a low field NMR spectrometer (LF-NMR) MARAN Ultra-23 (Oxford Instruments, Tokyo, Japan), operating at 23.4 MHz (for hydrogen) and equipped with an 18 mm variable temperature probe. Hydrogen spin-lattice relaxation times were determined directly by the traditional inversion-recovery pulse sequence (recycle delay - 180º - τ – 90º- acquisition). The 90º pulse, 4.6 μs, was calibrated automatically by the instrument software. The amplitude of the FID was sampled for twenty τ data point, ranging from 0.1 to 5,000 ms, with 4 scans each and 5s of recycle delay. The relaxation values (means of triplicate analysis) and relative intensities were obtained by fitting the exponential data with the aid of the WINFIT 2.4.0.0 software supplied from resonance.

2.5. Technological properties of cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch

2.5.1. Pasting properties

The pasting properties of starch were determined using a Rapid Visco Analyzer 4500 viscometer (Perten Instruments, Hägersten, Sweden) according to method No. 162 of the International Association for Cereal Science and Technology (https://www.icc.or.at/standard_methods/162). Starch samples weighing 2.5 g were dissolved in 25 mL distilled water (corrected volume considering 14 % moisture content in flour) and the analyzed parameters were pasting temperature, peak viscosity, peak time, - breakdown, minimum viscosity, final viscosity at 50 ºC and setback. The analyses were performed in triplicate and mean values and standard deviations were calculated.

2.2.5.2. Water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI) determination

The WAI and WSI analyses were performed in triplicate, following the method proposed by Anderson, Conway, Pfeifer, and Griffin (1969).

2.2.5.3. Expansion power

The expansion power was determined as described by Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda, & Wosiacki, 2000), with modifications. Manual homogenization of 24 g of starch was carried out in 20 g of boiling water. Four 7 g portions of this dough were placed in aluminum containers (3.7 cm diameter and 6.8 cm height) and pre-heated in an electric oven at 150 °C for 18 min. The expanded cassava starch samples were weighted and covered with Parafilm M®. The apparent volume was determined according to the AACC International Approved Method 10-05.01. The measurements were conducted in quadruplicate and the expansion was determined as the specific volume evaluated by the displacement method of millet seeds and expressed in $mL.g^{1}$ (Faubion & Hoseney, 1982). The specific volumes were used to classify the sour (fermented and sun-dried) cassava starch into small (<5.0 $mL.g^{-1}$), medium ($5.0 \leq x \leq 10.0$ $mL.g^{-1}$) and large (> 10.0 $mL.g^{-1}$) (Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda, & Wosiacki, 2000).

2.6. Statistical analyses

Data were expressed as means ± SD and the value significances were analyzed by the GraphPad Prism v.5 software package (San Diego, CA, EUA). Differences between means were compared by a one-way analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni post hoc test. A statistical significance level of 99.9% ($p < 0.001$) was considered for all analyses.

3. Results and discussion

262 *3.1.* Microbiological analyses of the spontaneous fermentation of cassava starch

263 At the initial (*t =1*) and final time points of the cassava starch fermentation (*t =30*), the
264 presumptive count of lactobacilli in MRS agar showed values around 8 log units CFU.g^{-1},
265 whereas the final product, after sun-drying treatment, showed a reduction of 1.2 log units
266 (Table 1). Previous studies have shown that the *Lactobacillus* genus is prevalent among the
267 other genera belonging to lactic acid bacteria, being found throughout the manufacturing
268 process of sour (sun-dried) cassava starch (Ampe, Sirvent, & Zakhia, 2001).

269 Regarding the presumptive count for streptococci on azide agar, values for cassava starch
270 at the beginning and end of fermentation were also higher than in the sour (sun-dried) cassava
271 starch, dropping from 7.8 (*t =30*) to 6.3 log units CFU.g^{-1} (Table 1). On the other hand, no
272 *Lactococcus sp.* was detected in sour (fermented and sun-dried) cassava starch, probably
273 because the number of microorganisms was below the limit of detection of the technique (10^2
274 CFU.g^{-1} log).

275 To identify bacteria, all microorganisms s (n=131) isolated from the different batches
276 and media (MRS, M17 and azide blood) were characterized by ARDRA (amplified ribosomal
277 DNA restriction analysis). Eighteen distinct profiles were found and the isolates were
278 identified by partial sequencing of the 16S rDNA. *Lactobacillus* spp. (42%), *Lactobacillus*
279 *plantarum* (14.5%), *Leuconostoc citreum* (5.3%), *Lactococcus* spp. (12.2%), *Enterococcus*
280 spp. (15.3 %) and *Bacillus* spp. (10.7 %) were identified based on homology identity (98-
281 100%) searches at GenBank (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) database.

282 Several studies have shown the involvement of LAB lactic acid bacteria in the
283 spontaneous fermentation of sour cassava starch (Ampe, Sirvent, & Zakhia, 2001). These
284 bacteria contribute to the development of characteristic starch properties, such as taste, aroma,
285 appearance, texture, shelf life and safety (Lacerda et al., 2005).

The involvement of various *Lactobacillus* species, mainly *L. plantarum* and *L. fermentum,* as the predominant species in sour (fermented and sun-dried) cassava starch manufacturing at two industrial plants in Southeastern Brazil has already been suggested Lacerda et al. (2005). *L. plantarum* and other LAB are considered the prevalent microorganisms in the natural fermentation of cassava starch, responsible for the acidification of the product in the tanks during the fermentation process and the production of organic acids and aromatic compounds. Another group of LAB, the *Leuconostoc* genus, has been identified as present since the beginning of the fermentation process ($t = 1$) and are generally isolated from fermented vegetables, including species capable of producing exopolysaccharides (EPS). This group has many applications in the food industry and pharmaceutical field (Khue & Ngoc, 2013).

Leuconostoc strains grow associatively with acid producing *Lactococcus* strains and can confer aroma and texture to sour (fermented) cassava starch. The associative growth between these two bacteria groups has been described as a synergistic functional relationship. (Khue & Ngoc, 2013).

Bacteria belonging to the *Bacillus* genus were found only in samples collected at the end of the fermentation process ($t=30$). According to the European Food Safety Authority and ANVISA, Brazil's National Health Surveillance Agency, the presence of the *Bacillus* genus, Gram-positive, ubiquitous, characterized by spore-forming ability and usually present in soil, can be a contamination indicator of fermentation must by opportunistic bacteria due to inadequate hygiene conditions in the production process, which reinforces the need to include the concepts of good manufacturing practices in flour mills.

The yeast count, for both media used in the initial timepoint ($t=1$) of the cassava starch fermentation showed higher values (about 2 log units) than at the end of the fermentation process ($t = 30$) (Table 1). On the other hand, in the sour (sun-dried) cassava starch showed an

311 increase in yeast counts, reaching values of around 7.5 log units CFU.g^{-1} (Table 1). The
312 presence of yeast species predominantly in the advanced stages of the process suggested a
313 higher acid tolerance of these microorganisms (Halm, Hornbaek, Arneborg, Sefa-Dedeh, &
314 Jespersen, 2004), which can be considered a technological advantage.

315 A total of 157 yeasts isolated and analyzed by RAPD were grouped into 19 distinct
316 profiles. The sequencing of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (rDNA ITS) of
317 the 19 representative yeast RAPD profiles, presented homology 98 -100% to the sequences of
318 the GenBank. *Geotrichum candidum* (10.8%) *Pichia kudriavzevii* (33.1%), *Issatchenkia*
319 *orientalis* (3.2%), *Clavispora lusitaniae* (6.4%), *Neurospora crassa* (1.9%), *Neurospora*
320 *intermedia* (1.9%), *Rhodotorula mucilaginosa* (2.5%), *Cryptococcus albidus* (8.3%), *Candida*
321 *akabenensis* (8.3%), *Candida pararugosa* (6.4%), *Candida rugosa* (4.5%) and *Geotrichum*
322 sp. (12.7%) were identified during both the sour cassava fermentation and sun-drying
323 treatment.

324 *Candida rugosa, C. pararugosa, C. akabenensis, Cryptococcus albidus*, *Neurospora*
325 *crassa* and *N. intermedia* were found in the final product, sour cassava (fermented and sun-
326 dried) starch. Species such as *Pichia kudriavzevii* (33.1%) and *Issatchenkia orientalis* are part
327 of cassava microbiota and *Geotrichum candidum, Clavispora lusitaniae* and *Rhodotorula*
328 *mucilaginosa* were found during cassava fermentation.

329 Lacerda et al. (2005) found that the most common yeast species in sour (fermented and
330 sun-dried) cassava starch when evaluating samples from distinct starches They identified
331 *Galactomyces geotrichum* and a species of *Issatchenkia*, both of which were present
332 throughout the process. Both species occurred at about 5.0 log CFU g^{-1}. The authors also
333 commented that other species appeared only at certain times, especially in the initial phases of
334 the process. However, none of the yeast isolated from the cassava fermentation were able to
335 degrade starch.

In the present study, the identified yeast species have been shown to have high amylolytic activity, thus showing an ecological advantage in fermented sour and sun-dried cassava starch, since they can partially hydrolyze raw starch (Rodriguez-Sanoja et al., 2000) to provide sugars such as glucose or maltose that can be used as an energy source by other microorganisms, as well as producing enzymes such as linamarase and polygalacturonase, and aldehydes and esters that impart a pleasant aroma to the final product (Oyewole, 2001).

3.2. Characterization and comparison of physical and chemical parameters of the fermentation musts

3.2.1. Moisture content

Cassava starch and sour (sun-dried) cassava starch presented significantly different mean moisture values ($p < 0.001$), 9.9% ± 0.02 to 12.9% ± 0.04, respectively.

According to the Brazilian Technical Regulation for starch products (ANVISA - RDC under number 263, 09/22/2005), samples of cassava starch and sour (sun-dried) cassava starch should not present significant differences regarding moisture content. The value recommended by Brazilian legislation, for both, is at most 18% w/w, in order to obtain good product preservation, stability, quality and appropriate composition of the final product.

Although the 12-hour drying period was observed, the relative humidity in the area is 60 - 90%, which may have hampered the drying of the final product. The moisture content of the products are within the limits recommended by the Brazilian legislation (ANVISA - RDC under number 263, 09/22/2005), similar to other commercial products available on the Brazilian market. Lower moisture content would be desirable to increase the shelf life of thefinal product, demonstrating that the process of drying the starch under the sun not be completed within 12h.

3.3.2. Apparent amylose and amylopectin content

No significant difference was observed between the apparent amylose and amylopectin content ($p < 0.001$) between the cassava starch and the sour cassava starch samples (Table 3). Amylose content is an important parameter to study the changes that occur in starch pasting properties, which can affect their industrial applications (Ascheri, Boêno, Bassinello, & Ascheri, 2012). Starch paste and thermal properties are negatively regulated by the amylose ratio produced in starchy vegetables (Luo, Jobling, Millar, Morell, & Li, 2015).

The differences when comparing the results with other studies may be attributed to the use of starches from other sources, as well as the different methods used in the amylose analyses. A more careful and in-depth study demonstrated that amylose content can vary with cultivar conditions or crop planting time (Alvarado et al., 2013).

3.2.3. Determination of titratable acidity and pH of the flours during production

There was an increase in titratable acidity from 2.14 ± 0.01 mL of NaOH / 100g to 3.24 ± 0.24 mL NaOH / 100g and a reduction of pH from 4.8 ± 0.05 to 3.25 ± 0.03 for the initial timepoint (*t=1d*) and final (*t=30d*), respectively, while the final product, sour (sun-dried) cassava starch showed a titratable acidity of 5.25 ± 0.01 mL of NaOH / 100g and a pH of 3.63. According to the current legislation in Brazil (ANVISA – RDC under number 263, 09/22/2005), cassava starch should remain in the fermentation tank until the product reaches an acidity of about 5.0 mL NaOH / 100g. However, in most starch flour in Brazil, the duration of the fermentation process is not controlled by the titratable acidity as a parameter to interrupt fermentation, being only the 30-day fermentation period observed. In the starch evaluated in the present study, there was no control of the endpoint of the fermentation process, with the sour cassava (fermented) starch submitted to sun-drying treatment, even with an acidity higher than recommended by the Brazilian regulatory agency.

3.2.4. Characterization of organic acids and in cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch

Among the organic acids, only acetic, lactic and succinic acids were produced during the fermentation and sun-drying of cassava starch. All of them were detected by HPLC (Fig 1), excepting acetic acid, which was evaluated by HS-SPMS/GC-qMS. The lactic acid concentrations found in the cassava starch and sour (sun-dried) cassava samples were of 0.15 $g.L^{-1}$ and 0.96 g L^{-1}, respectively. Succinic acid was also detected in the sour (sun-dried) cassava starch samples at a concentration of 0.084 $g.L^{-1}$. Lactic and succinic acid were detected by HPLC. Acetic acid comprised approximately 40% of the volatile compounds in the headspace of sour (sun-dried) cassava starch, as seen previously in Table 2 and Fig 2B. The titratable acidity of sour (sun-dried) cassava starch could not be due to carboxyl groups resulting from residual acids due to degradation of amylose and amylopectin (Silva et al., 2006), since high molecular weight organic acids were not detected, neither were short-chain and long-chain fatty acids by HS-SPME/GC-qMS.

Although in previous studies the increase in total acidity was ascribed to the production of organic acids, mainly lactic acid and substantial amounts of acetic and butyric acids (Adegunwa, Sanni, & Maziya-Dixon, 2011). The sour (fermented and sun-dried) cassava starch may have traces of propionic acid, without the butyric or propionic acid presence Aquino et al. (2013).

In regions with average temperatures around 18°C, fermentation is slow, with the predominance of lactic microbiota, mainly *Lactobacillus plantarum*, while in regions withaverage temperatures around 35°C, fermentation is quicker and butyric microbiota is predominant, mostly *Clostridium butyricum* (Lacerda et al., 2005).

Taken together, the data regarding pH, titratable acidity, acetic, lactic and succinic acid content and low room temperature indicate that fermentation was interrupted before completion during sour cassava starch manufacturing. Additionally, no *Clostridium butyricum* was found among the natural microbiota microorganisms.

Succinic acid is a dicarboxylic acid produced as an intermediate of the tricarboxylic acid (TCA) cycle or as the major product of anaerobic fermentation by certain microorganisms (Lee et al., 2000). Several yeast species found in the microbiota of sour cassava fermentation should contribute to succinic acid production during the oxidative metabolism of starch (Chaves-López et al., 2014).

3.2.5. Characterization of volatile compounds and in cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch

A higher number of different volatile compounds were found in the cassava starch in comparison to the sour (fermented and sun-dried) cassava starch (Fig 2, A and B). This may be due to the sun-drying treatment, which may have caused the loss of some of the volatile compounds (Table 2). Aliphatic and aromatic hydrocarbons and terpenoidic compounds were found in a higher amount in cassava starch than in the sour (fermented and sun-dried) cassava starch. Sour (fermented and sun-dried) cassava starch has acetic acid comprising 40% (Table 2) of the volatile compound, and seems to protect the natural fermentation against contamination by spoilage microorganisms. A reduction of the profile diversity of terpenes and aromatic hydrocarbons was observed.

Terpenoids are the main representative class in the volatile compounds in both starches (Table 2). They can be released by yeast α-glycosidases during the fermentation process, contributing to the aroma of the final product (Calleja & Falqué, 2005). Limonene confers a fresh, citrus taste and odor, β-damascenone brings a sweet fruity smell and α-

ionone, a tropical fruity and flowery smell which are all present in considerable amounts in the final product (http://theleafonline.com/c/science/2014/09/terpene-profile-limonene), contributing to unique flavors, such as the pleasant aroma and taste of fermented cassava.

Aromatic hydrocarbons had their relative content decreased in the sour (fermented and sun-dried) cassava starch and some of them like methylbenzene, 1-3-dimethylbenzene, 1,3,5-trimethylbenzene, 1,2-dichlorobenzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)benzene, 1-methyl-2-prop-1-en-2-ylbenzene, 2-(4-methylphenyl)propan-2-ol, styrene and benzaldehyde were removed by fermentation (Table 2).

Lactic acid bacteria and yeast present in cassava starch fermentation are able to produced volatile compounds formed via primary and secondary metabolism (MVOCs). Furthermore, moisture and temperature influence MVOC emission, and a prolonged growth phase due to a lower temperature may influence the production of certain compounds and extend the time for maximum production (Sunesson, Nilsson, Carlson, Blomquist, & Anderson, 1997). Other environmental factors such as substrate pH, light and CO_2 or O_2 levels can probably also influence the MVOC pattern. In the food industry, volatile organic acids are used as flavorings, preservatives and inhibitors of microbial growth.

3.2.5. ^{1}H-NMR relaxometry information of cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch

Solid-state NMR relaxometry allowed for the monitoring of the changes in cassava starch during fermentation and sun-drying processing, where the longitudinal relaxation time (T1H) parameter provided information about the molecular dynamics of the starch before and after fermentation (Fig 3). The T1H parameter showed a great variation in the proton spin-lattice relaxation times, from 83.3 to 69.3 ms, for cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch, respectively. The shortest spin-lattice relaxation time T_1H ($p < 0.001$)

indicates that the fermented and sun-dried product is more inclinable to expansion, since there is a population of hydrogen atoms in a lower confinement (or greater mobility) and greater heterogeneity in sour (fermented and sun-dried) cassava starch (Brito & Tavares, 2013), as demonstrated by the line width and the peak intensity that changed during processing (Fig. 3).

3.4. Technological properties of cassava starch and sour (sun-dried) cassava starch

3.4.1 Pasting properties

The sour (fermented and sun-dried) cassava starch presented a different pasting profile ($p<0.001$) than cassava starch (Table 3). The sour cassava starch pastes presented lower viscosity at high temperature (lower peak viscosity), lower agitation stability (higher breakdown) and lower retrogradion tendency (lower setback) than the cassava starch. This cassava starch pasting profile alteration following fermentation and sun-drying treatment has also been observed in other studies (Adegunwa, 2011; Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda, & Wosiacki, 2000; Marcon et al., 2007). Photochemical and enzymatic modifications occur during cassava starch manufacturing (Marcon et al., 2007). Starch molecules (amylose and amylopectin) in the amorphous regions of the granules were partially depolymerized by the amylolytic enzymes and organic acids produced by microorganisms from the natural environment and by UV irradiation (mainly UVB and UVC irradiation) during sun drying to the size-reduced starch molecules (Marcon et al., 2007, Vatanasuchart et al., 2005). Besides depolymerization, starch molecules present carbonyl and carboxylate groups, which indicate that oxidation of the amylose and amylopectin hydroxyl groups is observed, in a mechanism involving free radicals ((Demiate, Dupuy, Huvenne, Cereda, & Wosiacki, 2000).

The weakened granule organization caused by oxidative depolymerization during sour cassava starch fermentation (Putri et al., 2012) makes the starch granules show little swelling

and, therefore, lower peak viscosity. The more weakened granule organization also causes the starch granules to readily disintegrate, which leads to higher breakdown. After being oxidatively depolymerized, amylose and amylopectin presented lower molecular weights, and a lower retrogradation tendency is observed (lower setback).

3.4.2. Water absorption index (WAI) and water solubility index (WSI)

Cassava starch and sour cassava starch (fermented and sun-dried) showed similar water absorption and water solubility index values, indicating that there were no effects following fermentation and sun drying (Table 3).

The water absorption index (WAI) is related to the degree of starch swelling or gelatinization. As the WAI was performed at 30ºC, starches were not swollen because they did not reach the minimum energy required for the gelation process. Neither the cassava starch nor the sour cassava starch showed significant water uptake at this temperature (Table 3). The oxidative depolymerization of sour cassava starch was not efficient enough to prompt starch granules solubility in cold water, not assisting them to their pre-gelatinization state, since only pre-gelatinized starch granules can absorb water at ambient temperature, increasing starch viscosity (Silva & Assis, 2011).

The water solubility index (WSI) is a parameter that measures the total degree of degradation of the starch granule. Among the changes observed during the fermentation process of sour cassava starch (fermented and sun-dried), an increase in starch solubility is expected (Marcon et al., 2007). Herein, a significant increase in starch solubility was observed for sour cassava starch (fermented and sun-dried). Variations in the quality of the final product of a same producer are frequent due to the lack of control parameters in sour cassava starch processing. Therefore, the search for improvements in the technological process to obtain a final product with better quality and standardization is a major challenge for the

sector. Generally, sour (sun-dried) cassava starch has a higher WSI value than its native starches. Studies have shown that cassava starch shows lower solubility than sour cassava starch, due to the presence of non-solubilized amylose in the crystalline region of the native granule, while the amylose of the fermented starch is already partially released (Gomes, Silva & Ricardo, 2005).

3.4.3. Expansion properties

The bread making ability of both starches is represented by the loaf expansion values displayed in Table 3. There was a significant 3.2 fold increase in loaf expansion after starch fermentation and sun-drying treatment, although the production of organic acids during fermentation was discrete, as discussed previously, but still enough to promote physical changes in the granules, enhancing their ability to swell and solubilize in water (Dias et al., 2011).

The hydrolysis of the glycosidic bonds in the amorphous region of the granules by acids, enzymes and UV irradiation resulted in increased mobility and greater heterogeneity of the hydrogen molecules (relaxometry analysis), which probably results in the development of the expansion property.

When comparing the specific volumes obtained to the loaf expansion indexes established by Nunes and Cereda (1994), it can be observed that both starches showed low loaf expansion indexes, lower than 5 $mL.g^{-1}$ (Table 3). However, the loaf expansion values shown herein are similar to those observed for distinct genetic varieties of cassava (Alvarado et al., 2013). A superior loaf expansion can be obtained, where a specific volume between 5 and 10 mL g^{-1} can be reached after 83 days of fermentation (Aquino et al., 2013).

The loaf expansion of cassava starch may be due to its high swelling capacity and solubility resulting from molecular degradation after acidification and irradiation (Bertolini et al., 2000). Maximizing the expansion can depend on the degree of sour starch polymerization, the number of carboxyl and hydroxyl groups, pH, granule density, and other parameters that show significant correlation, whether positive or negative, with the expansion of the dough and its characteristics after cooking, as well as with its storage after cooking (Marcon et al., 2009).

Although not fully established, the mechanism of sour cassava starch expansion may be similar to the one for extruded products, where the driving force would be water evaporation, and cell expansion would be governed mainly by dough-crust viscosity (Bertolini et al., 2000). Partial depolymerization of sour cassava starch during fermentation and sun-drying, provided small linear fragments and facilitated the development of an amorphous matrix structure of starch dough (Vatanasuchart et al., 2005) reducing dough viscosity during expansion, aiding in the bubble expansion. However, other phenomena besides depolymerization could improve loaf expansion at different baking stages, including mass transfers, such as CO_2 or water displacement from the surrounding matrix to the expanding bubbles, inertia and surface tension (Alvarado et al., 2013).

4. Conclusions

Sour (sun-dried) cassava starch has great potential as a more economical and sustainable alternative to wheat flour in gluten-free bread production around the world. The results showed herein can be applied in order to supply the market with high-quality and homogeneous sour cassava starch.

To control parameters in the manufacturing process it is necessary to increase the efficiency of the sour (sun-dried) cassava starch production process. The fermentation

duration should be controlled by the formation of organic acids and volatile compounds, in order to achieve technological properties, which guarantee optimum quality of expansion of the final product. Furthermore, changes in temperature and relative humidity should be minimized, since they may affect the efficiency of the fermentation process. The aim is to achieve ideal viscosity parameters, since this is the major quality technological importance that defines the acceptance and application of the product in the food industry, mainly associated with the production of cheese bread, where a mixture of cassava starch and sour cassava starch are associated with cured cheese powder, resulting in an appreciated and widely consumed product throughout the country.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and FAPESB (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia). We also thank MSc Andrea Mattos and Dr Patrícia Ribeiro Pereira for fruitful discussions.

References

Adegunwa, M. O., Sanni, L. O., & Maziya-Dixon, B. (2011). Effects of fermentation length and varieties on the pasting properties of sour cassava starch. *African Journal of Biotechnology, 10*, 8428-8433.

Alvarado, P. M., Grosmaire, L., Dufour, D., Toro, A. G., Sánchez, T., Calle F., Santander, M. A., et al. (2013). Combined effect of fermentation, sun-drying and genotype on bread making ability of sour cassava starch. *Carbohydrate Polymers, 98*, 1137-1146.

Ampe, F., Sirvent, A., & Zakhia, N. (2001). Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. *International Journal of Food Microbiology, 65*, 45-54.

Anderson, R. A., Conway, H. F., Pfeifer, V. F., & Griffin, E. L., Jr (1969). Gelatinization of corn grits by roll- and extrusion-cooking. *Cereal Science Today, 14*, 47.

Aquino, A. C. M. S., Pereira, J. M., Watanable, L. B., & Amante, E. R. (2013). Standardization of the sour cassava starch reduces the processing time by fermentation water monitoring. *International Journal of Food Science & Technology*, *48*, 1892-1898.

Ascheri, D. P. R., Boêno, J. A., Bassinello, P. Z., & Ascheri, J. L. R. (2012). Correlation between grain nutritional content and pasting properties of pre-gelatinized red rice flour. *Revista Ceres, 59,* 16-24.

Barros Lopes, M., Soden, A., Henschke, P. A., & Langridge, P. (1996). PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology, 62*, 4514-4520.

Brito, L. M., & Tavares, M. I. B. (2013). Development of nanocomposites based on potato starch. *Polímeros, 23*, 771-777.

Calleja, A., & Falqué, E. (2005). Volatile composition of Mencia wines. *Food Chemistry, 90*, 357–363.

Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The Colombian heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 13*, 1031–1048.

Demiate, I. M., Dupuy, N., Huvenne, J. P., Cereda, M. P. & Wosiacki, G. (2000). Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers, 42,* 149-158.

De Vuyst, L., & Neysens, P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science & Technology, 16*, 43–56.

Dias, A. R. G., Zavareze, E. R., Elias, M. C., Helbig, E., Silva, D. O., & Ciaccoc, C. F. (2011). Pasting, expansion and textural properties of fermented cassava starch oxidized with sodium hypochlorite. *Carbohydrate Polymers, 84*, 268-275.

Fannon, J. E., Gray, J. A., Gunawan, N., Huber, K. C., & BeMiller, J. N. (2003). The channels of starch granules. *Food Science and Biotechnology, 12*, 700-704.

Faubion, J. M., & Hoseney, R. C. (1982). High-temperature short time extrusioncooking of wheat starch and flour. I. Effect of moisture and flour type on extrudate properties. *Cereal Chemistry, 59*, 529-533.

Gallagher, E., Gormley, T. R., Arendt, E. K. (2004). Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends in Food Science & Technology, 15*, 143-152.

Gomes, A. M. M., Silva, C. E. M., & Ricardo, N. M. P. S. (2005). Effects of annealing on the physicochemical properties of fermented cassava starch (polvilho azedo). *Carbohydrate Polymers*, *60*, 1-6.

Halm, M., Hornbaek, T., Arneborg, N., Sefa-Dedeh, S., & Jespersen, L. (2004). Lactic acid tolerance determined by measurement of intracellular pH of single cells of *Candida krusei* and *Saccharomyces cerevisiae* isolated from fermented maize dough. *International Journal Food of Microbiology, 94*, 97-103.

Holzapfel, W. (2002). Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *International Journal Food Microbiology*, *75*, 197-212.

Khue, N. T., & Ngoc, N. H. (2013). Exopolysaccharide in *Lactobacillus rham*nosus Pn04 after co-culture with *Leuconostoc mesenteroides* Vtcc-B-643. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *3*, 14-17.

Lacerda, I. C. A., Miranda, R. L., Borelli, B. M., Nunes, A. C., Nardi, R. M. D., Lachance, M. A., et al. (2005). Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, *105*, 213-219.

Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., Chang, H. N., Lee, W. G., & Kwon, S. (2000). Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for the production of succinic acid from whey. *Applied Environmental Microbiology*, *54*, 23-27.

Leite, A. M. O., Leite, D. C. A., Del Aguila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A. L., et al. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of Dairy Science, 96*, 4149–4159.

Lundin, K. E. A. (2014). Non-celiac gluten sensitivity - why worry? *BMC Medicine, 12*, 86.

Luo, J., Jobling, S. A., Millar, A., Morell, M. K., & Li, Z. (2015). Allelic effects on starch structure and properties of six starch biosynthetic genes in a rice recombinant inbred line population. *Rice*, *8*, 1-13.

Marcon, M. J. A., Vieira, G. C. N., Simas, K. N., Santos, K., Vieira, M. A., Amboni, R. D. M. C., et al. (2007). Effect of the improved fermentation on physicochemical properties and sensorial acceptability of sour cassava starch. *Brazilian Archives of Biology and Technology, 50*, 1073-1081.

Naumova, E., Ivannikova, Y., & Naumov, G. (2005). Genetic differentiation of the sherry yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry Microbiology, 41*, 578-582.

Olsen, K. M., & Schaal, B. A. (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: Further evidence for a southern Amanzonian origin of domestication. *American Journal of Botany, 8,* 131-142.

Oluwasola, O. (2010). Stimulating rural employment and income for cassava (*Manihot* sp.) processing farming households in Oyo State, Nigeria through policy initiatives. *Journal of Development and Agricultural Economics, 2*, 18-25.

Oyewole, O. B. (2001). Characterization and significance of yeast involvement in cassava fermentation for fufu production. *International Journal of Food Microbiology 65*, 213-218.

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., & Soccol, V. T. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: Cassava bagasse. *Bioresource Technology, 74*, 81-87.

Putri, W.D.R., Marseno, H.D.W. & Cahyanto, M.N.C. (2012). Role of lactic acid bacteria on structural and physicochemical properties of sour cassava starch. *APCBEE Procedia*, 2, 104 – 109.

Rodriguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N., & Guyot, J. P. (2000). Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* α-amylase and role of the C-terminal direct repeats in raw-starch binding. *Applied and Environmental Microbiology, 66*, 3350-3356.

Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, (Chapter 5).

Schober, T. J. (2009). Manufacture of gluten-free speciality breads and confectionery products. In E. Gallagher (Ed.), Gluten-free food science and technology (pp. 130–180). Oxford: Wiley-Blackwell.

Silva, P. A., & Assis, G. T. (2011). Development and characterization of an extruded breakfast cereal from cassava enriched with milk whey protein concentrate. *Brazilian Journal of Food Technology, 14*, 260-266.

Silva, G. O., Takizawa, F. F. Pedroso, R. A., Franco, C. M. L., Leonel, M., Sarmento, S. B. S., & Demiate, I. M. (2006). Physicochemical characteristics of modified food starches commercialized in Brazil. *Food Science and Technology, 26*, 188-197.

Sunesson, A. L., Nilsson, C. A., Carlson, R., Blomquist, G., & Andersson, B. (1997). Influence of temperature, oxygen and carbon dioxide levels on the production of volatile metabolites from *Streptomyces albidoflavus* cultivated on gypsum board and tryptone glucose extract agar. *The Annals of Occupational Hygiene, 41*, 393-413.

Vatanasuchart, N. Naivikul, O., Charoenrein, S., Srirot, K. (2005). Molecular properties of cassava starch modified with different UV irradiations to enhance baking expansion. *Carbohydrate Polymers*, 61, 80–87.

Wang, X., Haruta, S., Wang, P., Ishii, M., Igarashi, Y., & Cui, Z. (2006). Diversity of a stable enrichment culture, which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiology Ecology, 57*, 106-115.

Legends

Figure 1. Chromatogram from HPLC of organic acid standards.

Peaks: 1 = citric acid, 2 = succinic acid, 3 = lactic acid, 4 = acetic acid, 5 = propionic acid and 6 = butyric acid.

Fig. 2. Typical HS-SPMS/GC-qMS chromatograms (TIC) of the volatile composition in the headspace of the cassava samples. **A** – cassava starch; **B** – sour (fermented and sun-dried) cassava starch

Fig. 3. Distribution curves of domain relaxation times for cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch obtained by LF-NMR. The intensity values were normalized.

Table(s)

Table 1. Microbial enumeration (log CFU.g^{-1}) of bacteria and yeast during sour cassava (fermented and sun-dried) starch processing on selective culture media

Sample (fermentation time)	Bacteria (Log CFU.g^{-1})*			Yeast (Log CFU.g^{-1})*	
	M17	MRS	Azide blood	YPD 2%	Malt extract
Cassava starch (*t=1*) (1st day)	7.6 ± 0.02^{b}	8.0 ± 0.03^{a}	7.7 ± 0.04^{a}	7.9 ± 0.02^{a}	7.8 ± 0.01^{a}
Sour cassava starch (*t=30*) (30th day)	8.0 ± 0.02^{a}	8.2 ± 0^{a}	7.8 ±0.04^{a}	6.0 ± 0.02^{c}	6.2 ± 0.02^{b}
Sour (sun-dried) cassava starch	< 2^{c}	6.8 ± 0.02^{b}	6.3 ±0.04^{b}	7.5 ± 0.01^{b}	7.6 ± 0.06^{a}

*Values are expressed as mean ± standard deviation.

$^{(a-c)}$ Means with different superscript letters within a column are significantly different ($p < 0.001$), according to the Bonferroni post hoc test.

Table(s)

Table 2

Volatile compounds identified in the "headspace" samples of cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch by HS-SPME/GC-qMS (extraction temperature 25°C; extraction time, 30 min, using three-phase fiber 50/30µm DVB/CAR/PDMS).

	Compound	Peak number	Cassava starch Relative area (%)	Sour (fermented and sun-dried) cassava starch Relative area (%)
Organic Acids	Acetic acid	1	-	51.2
Aliphatic hydrocarbons and ethers	*n*-Nonane	2	0.7	2.5
	n-Decane	3	3.5	9.3
	n-Dodecane	4	1.8	6.6
	n-Tridecane	5	0.1	-
	n-Tetradecane	6	0.5	-
	n-Pentadecane	7	0.3	-
	Di- *N*-octyl ether	8	0.3	-
	Nonane, 2,5-dimethyl-	9	0.6	2.0
	Octacosane	10	-	2.0
	Heptadecane, 8-methyl-	11	0.8	-
Ketone	2,6-ditert-butylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione	12	0.2	-
Aromatic hydrocarbons and aldehydes	Toluene	13	1.5	-
	m-Xylene	14	0.3	-
	1,3,5-Trimethylbenzene	15	1.5	-
	1,2,3-Trimethylbenzene	16	0.6	1.4
	1,2-Dichlorobenzene	17	0.3	-
	1-Methyl-3-(1-methylethyl)benzene	18	15.9	-
	1-Methyl-2-prop-1-en-2-ylbenzene	19	2.2	-
	1-Ethyl-3-methylbenzene	20	-	2.1
	1,2,4-Trimethylbenzene	21	-	3.4
	1-Ethyl-2,3-dimethylbenzene	22	-	0.7
	2-(4-Methylphenyl)propan-2-ol	23	0.7	-
	Styrene	24	1.1	-
	Benzaldehyde	25	0.9	-
Terpenes	Sabinene	26	0.4	-
	2-β-Pinene	27	1.0	-
	β-Myrcene	28	3.1	-
	δ-Carene	29	0.2	-
	Llimonene	30	44.6	8.6
	α-Terpinolene	31	1.1	-
	p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	32	0.4	-
	α-Terpineol	33	0.7	-
	Dihydrocarvone	34	0.8	-
	Trans-2-caren-4-ol	35	1.3	-
	Carvotanacetone	36	2.2	-
	p-Mentha-1,8-dien-7-al	37	0.3	-
	Carvacrol	38	0.3	-
	Neryl acetate	39	1.0	-
	Geranyl acetate	40	0.3	-
	α-Bergamotene	41	1.2	-
	β-Bisabolene	42	1.2	-
	β-Damascenone	43	-	1.5
	Caryophyllene	44	-	6.6
	α-Ionone	45	-	2.1
Alcohol	2-Ethyl-1-hexanol	46	5.1	-
Aldehyde	Decanal	47	1.0	-
TOTAL			100.0	100.0

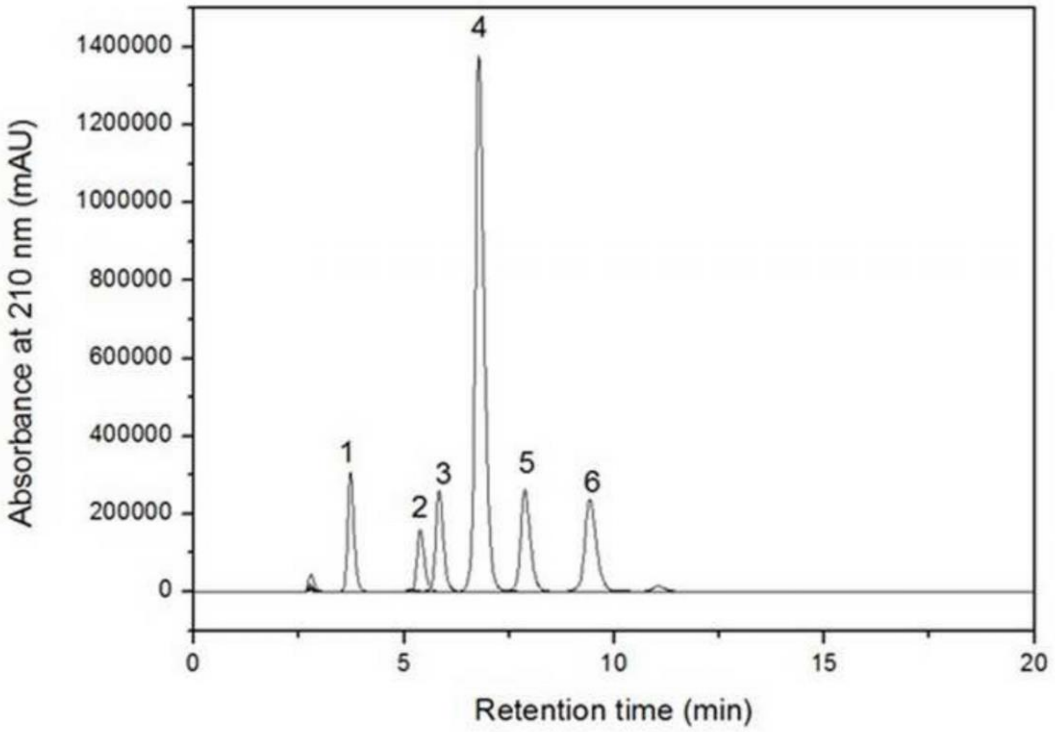
Table(s)

Table 3. Technological characteristics of cassava starch and sour (fermented and sun-dried) cassava starch

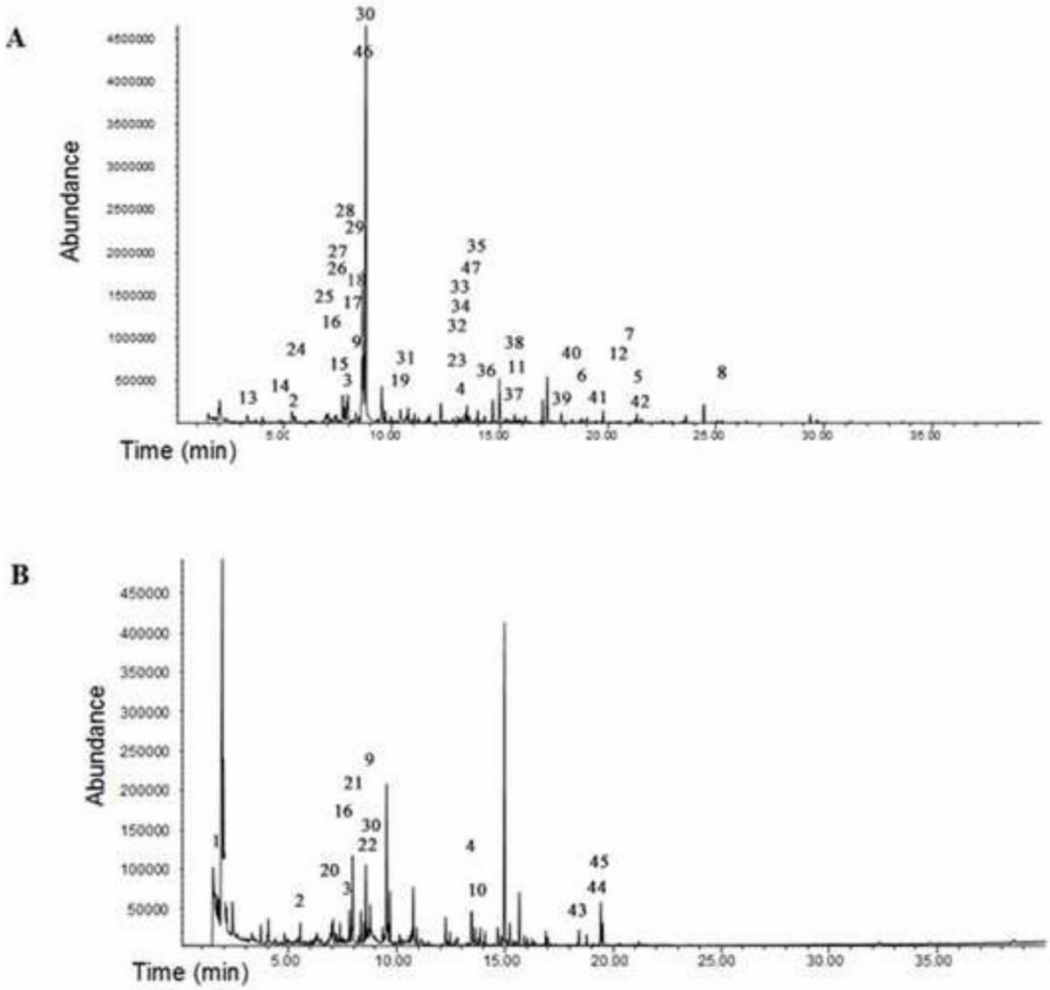
Parameters	Cassava starch	Sour (fermented and sun-dried) cassava starch
Pasting temperature (ºC)*	68.6 ± 0.1^{ns}	70.2 ± 0.1^{ns}
Peak viscosity (cP)*	3399.7 ± 37.5^{b}	2597.3 ± 29.1^{a}
Peak time (min)*	3.7 ± 0^{ns}	3.7 ± 0^{ns}
Minimum viscosity (cP)*	1480 ± 44.6^{b}	447.33 ± 11^{a}
Breakdown (cP)*	1919.7 ± 59.9^{a}	2150.0 ± 18.1^{b}
Final viscosity at 50ºC (cP)*	$2070.0 \pm 2\ 1.7^{b}$	669.7 ± 2.9^{a}
Setback (cP)*	590.0 ± 37.3^{b}	222.3 ± 8.7^{a}
WAI ($g.g^{-1}$)	2.0 ± 0.1^{ns}	2.1 ± 0^{ns}
WSI (%)	0.2 ± 0^{a}	0.6 ± 0.1^{b}
Expansion ($mL.g^{-1}$)	1.4 ± 0.4^{a}	4.5 ± 0.4^{b}
Amylose (%)	20.4 ± 0.4^{ns}	19.9 ± 0.3^{ns}
Amylopectin (%)	79.6 ± 0.4^{ns}	80.1 ± 0.3^{ns}

Means and standard deviation of triplicate measurements.
Different letters within a row are significantly different ($p < 0.001$), according to the Bonferroni post hoc test
ns = not significant
*RVA parameters
WAI = water absorption index
WSI = water solubility index

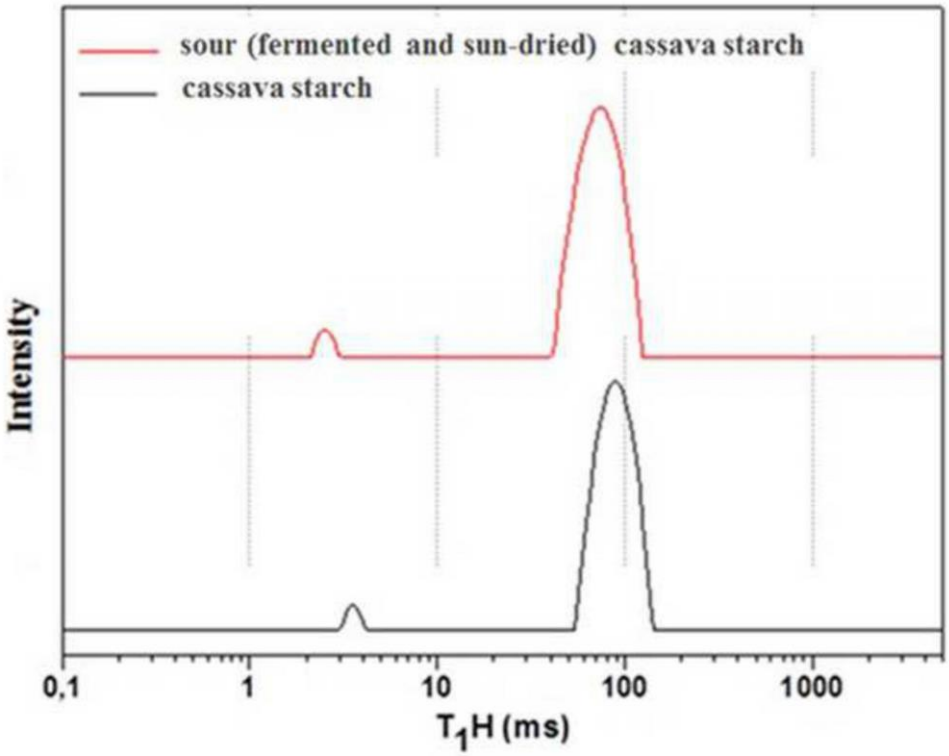
Figure(s)
Click here to download high resolution image



Figure(s)
Click here to download high resolution image



Figure(s)
Click here to download high resolution image



ANEXO B – APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO: Análise comparativa de ácidos orgânicos encontrados no material fermentado do polvilho azedo e doce. In: CHEMRIO 2014, Symposium, Rio de Janeiro

institutodequímica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

CHEM RIO 14 SYMPOSIUM

ANÁLISE COMPARATIVA DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ENCONTRADOS NO MATERIAL FERMENTADO DO POLVILHO AZEDO E DOCE

K.H. REBOUÇAS[1*], A. M. O. LEITE[2], P.R. PEREIRA[1], L. P. GOMES[1], V.S. BASTOS[1], E. M. DEL AGUILA1[1] E V.M.F. PASCHOALIN[1]

[1]Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química
[2]Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé
E-mail: karine_hojo@hotmail.com

O polvilho é o produto amiláceo extraído da mandioca e de acordo com o teor de acidez, é classificado em polvilho doce ou azedo. O polvilho azedo é um tipo modificado por processo de fermentação e secagem solar, apresentando características bem diversas do polvilho doce que serve de matéria-prima para a fabricação do polvilho azedo. Durante a fermentação do polvilho azedo, ácidos orgânicos são produzidos, o que contribuem com o sabor e aroma diferenciado deste polvilho, além de resultar em um produto com propriedade de expansão, sem adição de fermento. Amostras de polvilho doce e azedo (produto acabado) foram coletadas na Região Nordeste, na cidade de Vitória da Conquista-BA. Para a extração dos ácidos orgânicos foi utilizado 25 ml de H_2SO_4 (45 mmol / L) para 5 g de polvilho doce e azedo e homogeneizados por 1 h a 250 rpm. As amostras foram filtradas com filtro 45 µm de diâmetro e foram injetadas (50 µL), em triplicata, em um sistema de HPLC usando uma coluna de fermentação HPX - 87H Aminex. A fase móvel foi 3mM de ácido sulfúrico com fluxo de 0,7mL / min a 65 °C. Resultados iniciais revelaram a presença de 1,3 mg de ácido cítrico e 3,1 mg de ácido láctico nas amostras de polvilho doce e no polvilho azedo foi observada a presença de 3,5 mg de ácido acético, 1,2 mg de ácido láctico, 0,1 mg de ácido cítrico e succínico, respectivamente. Os níveis de ácido láctico são relativamente baixos ao início do produto doce não fermentado. O ácido láctico no polvilho azedo representa 66-82 % da acidez total, os ácidos acéticos e lácticos contribuem para expansão e ligação de água, o ácido cítrico participa na fermentação da sacarose e o ácido succínico tem função de aromatizante e neutralizante, produzido pela fermentação de carboidratos.

Agradecimentos: FAPESB; Instituto Federal Baiano; **Area:** Ciência de Alimentos;

ANEXO C – APRESENTAÇÃO DE TRABALHO EM EVENTO CIENTÍFICO: Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: 53° Congresso Brasileiro de Olericultura 2014, Palmas

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Anais... Palmas: ABH.

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis

RESUMO

O polvilho azedo é um amido modificado que se obtêm da fermentação natural da fécula de mandioca após um período de 30 a 40 dias seguido da secagem ao sol. Amostras foram coletadas no Estado da Bahia e analisadas ao longo do processo de fermentação (0, 9, 18 e 25 dias). Nas amostras foi detectada a presença de bactérias produtoras de ácido láctico e foi avaliada a alteração da acidez. Foram isoladas 331 colônias de bactérias e foi feito um screening das bactérias isoladas utilizando o método PCR- ARDRA e identificadas posteriormente por sequenciamento, sendo apenas 15 colônias diferentes. Foi observado o aumento na acidez titulável e redução do pH ao final da fermentação. As bactérias *Lactococcus* e *Lactobacillus* são as que prevalecem nos primeiros dias de fermentação e após 18 dias de fermentação, foram identificadas as bactérias *Lactobacillus plantarum cepa WCFS1, L. paraplantarum cepa DSM 10667; L. pentosus cepa 124-2.* Aos 25 dias de fermentação, foram identificadas as bactérias *Bacillus anthracis cepa Ames; Bacillus cereus ATCC 14579.* Foi possível observar diferenças no perfil volátil do polvilho doce e azedo, mostrando que o polvilho azedo teve uma perda de compostos voláteis, devido ao processamento, em comparação com o polvilho doce. Os resultados indicaram que o processamento modifica o sabor, devido principalmente a diferentes microrganismos presentes no seu processamento.

Palavras-chave: *Cassava,* bactérias ácido-lácticas, fermentação, cromatografia

ABSTRACT

Molecular identification of microorganisms by molecular techniques and profile of volatile compounds in sour

The cassava starch is a modified starch which is obtained from natural fermentation of cassava starch after a period of 30 to 40 days followed by sun drying. Samples were collected in the State of Bahia and analyzed during the fermentation process (0, 9, 18 and 25 days). In all samples were detected lactic acid bacteria and it was evaluated the acidity in the samples. It was isolated 331 colonies of bacterial and was carried out a screening of bacterial using the PCR- It was observed the increasing in thetitratable acidity and reduced pH at the end of the fermentation. The *Lactococcus* and *Lactobacillus* bacterial are prevalent in the early days of fermentation and after 18 days

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Anais... Palmas: ABH.

of fermentation, the bacteria *Lactobacillus plantarum strain WCFS1, L. paraplantarum strain DSM 10667* were obtained ; *L. pentosus strain 124-2* . After 25 days of fermentation, the bacterial identified were *Bacillus anthracis Ames strain*; *Bacillus cereus ATCC 14579*. It was possible to observe differences in the volatile profile of sweet and sour cassava starch, showing the cassava starch had a loss of volatile compounds, due to processing in comparison with the sweet starch. The results indicated that processing modifies the flavor, mainly due to different microorganisms found in their processing

Keywords: *Cassava,* lactic acid bacteria, fermentation, chromatography

O polvilho azedo é um derivado da fécula de mandioca, sendo considerado um amido modificado por processo de fermentação e secagem solar, o que permite adquirir a propriedade de expansão que outros amidos nativos não apresentam. A propriedade de expansão do polvilho azedo pode depender também da produção de exopolissacarídeos por bactérias lácticas, responsáveis pela formação da estrutura viscoelástica que permite a retenção de gás e expansão da massa no forneamento (MAEDA, 2001). A microbiota do polvilho azedo foi descrita por CARVALHO *et al.*(1996), onde foi encontrada a predominância de microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* (32,0%), *Leuconostoc* (21,0%), *Lactococcus* (12,6%), *Enterococcus* (8,3%), *Pediococcus* (5,9%), *Streptococcus* (0,8%) e de leveduras (2,2%). Outros estudos concluíram que 80,6 % dos microrganismos presentes no polvilho azedo são bactérias ácido-láticas (BAL) e que a fermentação é feita por uma flora mista que produz o aumento da acidez titulável. As BAL nos alimentos fermentados não só contribuem para o sabor, aroma e textura, mas também promovem a redução do pH, atuando na melhoria de sua qualidade e segurança (Kopermsub & Yunchalard, 2010). Os compostos voláteis são substâncias de diversas classes químicas presentes em quantidades bastante reduzidas nos alimentos, mas que são responsáveis pelo aroma, contribuindo assim para a definição do sabor. O objetivo deste trabalho foi identificar a microbiota presente no processo fermentativo do polvilho por ARDRA-PCR e sequenciamento e determinar o perfil dos compostos voláteis encontrados no polvilho produzido no estado da Bahia.

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Anais... Palmas: ABH.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi executado no Laboratório de Análises Avançadas em Bioquímica e Biologia Molecular (IQ- UFRJ) e no Laboratório de Análise de Aromas (IQ-UFRJ).

Foram analisadas as amostras de polvilho ao longo do processo de fermentação (0, 9, 18 e 25 dias). A acidez titulável foi determinada por titulação ácido-base de acordo com o protocolo do Instituto Adolfo Lutz (1985). Para isolar as bactérias ácido-láticas predominantes da microbiota foram utilizados os meios Kanamicina Esculina Azida (BD) e M17 Broth (HIMEDIA). Para isolar as leveduras, utilizamos o meio extrato de malte (HIMEDIA). Os DNAs das bactérias isoladas foram extraídos de acordo com Sambrook & Russell (2001) e quantificados com o kit Quant It DSDNA HS (Invitrogen). O DNA extraído foi utilizado como molde para a amplificação do fragmento de 1200bp. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL, uma mistura de reação contendo 5 µL de tampão (10X PCR), 50mM $MgCl_2$, 10mM de cada DNTP, 10 pmol de cada oligonucleotideo (16-1A (5′-GAATCGCTAGTAATCG-3′) e 23-1B (5′-GGGTTCCCCCATTCGGA-3′), 100ng de DNA da amostra e 1.5U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen). As condições da reação foram: 94°C por 2 min seguido por 35 ciclos de 94 °C por 30 seg; 55 °C por 1 min e 72 °C por 1 min e um a etapa de extensão de 72 °C por 7 min e resfriamento a 4°C. O resultado foi visualizado em um gel de agarose 1,2%.

Os produtos amplificados foram digeridos com as enzimas ApaI, XhoI (Promega) e DdeI (Fermentas). Foi utilizada 1U das enzimas ApaI, Xho I e DdeI, 2 µL do tampão de cada enzima, 500 ng de DNA extraído em um volume final de 20 µL. A mistura foi incubada a 37 °C por 1 hora e depois paralisada a 65°C por 20 minutos. Para verificar o perfil de bandas foi realizada eletroforese em um gel de agarose 1,2%.

Os produtos de PCR que apresentaram diferenças foram purificados com o kit PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) e o material purificado foi usado para o sequenciamento. Os segmentos purificados foram sequenciados pelo equipamento modelo 3130 (Applied Biosystems) utilizando o banco de dados Microbial ID System II. Foi realizada a primeira reação do sequenciamento utilizando o kit MicroSeq500 16S rDNA Bacterial Identification PCR (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. Para o PCR do sequenciamento, a reação foi realizada segundo o Kit MicroSeq 500 16S rDNA Sequencing (Applied Biosystems). Finalizada a

reação, foi utilizado o Kit BigDye Terminator Purification, seguindo as instruções do fabricante. As amostras (20 µL) foram adicionadas na placa de sequenciamento com 20uL de formamida e colocadas no sequenciador 3130 e as sequências produzidas foram examinadas por comparação utilizando o programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Os compostos voláteis presentes nas amostras antes da fermentação (polvilho doce) e após a fermentação e secagem a temperatura ambiente (polvilho azedo), foram extraídos através da técnica de micro extração em fase sólida (SPME) por 30 min a temperatura ambiente. A análise do extrato obtido foi realizada em um cromatógrafo gasoso (Agilent GC 6890) acoplado ao detector de espectrômetrometria de massas (Agilent MSD 5973N) com coluna capilar DB5 (30m x 0,25 mm d.i. x 0,25 mm e.f.). Os compostos foram identificados de acordo com a biblioteca Wiley.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi verificado o aumento expressivo na acidez titulável de (0,27 para 0,67 mL de sol. NaOH 1N) durante o período de fermentação (Tabela 1), o que corrobora os resultados apresentados por Chiste & Cohen (2011). O aumento na acidez titulável implicou na redução do pH de 4,4 para 3,8 no final da fermentação. A redução no valor do pH das amostras finais da fermentação é devido a uma atividade intensa da microbiota durante a fermentação pelas bactérias ácido-lácticas. O teor da acidez titulável caracteriza a fermentação natural do polvilho azedo (CEREDA & LIMA, 1981).

A contagem de microrganismos crescidos no meio M17 e Kanamicina Esculina Azida foram representados na Tabela 2, mostrando uma tendência da diminuição do número de bactérias encontradas no tanque de fermentação. Foi verificada somente a formação de colônias de leveduras no tempo inicial (1 dia) e nos demais intervalos, não foram observadas a presença de leveduras quando as amostras foram incubadas por 7 dias em meio especifico para leveduras. Um total de 331 bactérias foi isolado a partir do meio M17 considerando todos os tempos de fermentação. Os produtos de PCR (1200bp) foram amplificados do DNA genômico das bactérias isoladas e este fragmento produzido apresentou um perfil quando tratadas com as enzimas ApaI, XhoI e DdeI (Figura 1). Com esta técnica, apenas 41 cepas pareceram ser diferentes. No entanto, após o sequenciamento, apenas 15 cepas provaram ser diferentes. As bactérias isoladas no tempo zero foram identificadas pelo sequenciamento como: *Lactococcus lactis*

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Anais... Palmas: ABH.

subsp. lactis cepa NCDO 604; Lactococcus lactis subsp. hordniae cepa NCDO 2181 ; Lactococcus lactis subsp Cremoris cepa NCDO 607; Lactobacillus paracasei subsp. tolerans cepa NBRC 15906; Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei cepa R094; Lactobacillus zeae cepa RIA 482; Lactobacillus casei subsp. Casei ATCC 393; Lactobacillus casei cepa JCM 1136; Lactococcus lactis subsp. cremoris SK11 cepa SK11. Foi descrito na literatura que a *L. lactis subsp. lactis* converte os hidratos de carbono em ácido láctico.

Aos nove dias de fermentação, foram identificadas as bactérias: *L. casei ATCC 334 cepa ATCC 334; L. paracasei subsp. tolerans cepa NBRC 15906; L.paracasei subsp. paracasei cepa R094.* Após 18 dias de fermentação, foram obtidas *L. plantarum WCFS1,* que é encontrado numa variedade de nichos ambientais, incluindo lacticínios, carne, e muitos vegetais ou plantas fermentadas. Por outro lado, *L. plantarum* é frequentemente encontrado no trato gastrointestinal humano, e ainda é comercializado como um probiótico que pode conferir vários efeitos benéficos para a saúde do consumidor (AHRNE *et al.*, 1998).

Desde o tempo inicial, até os 18 dias de fermentação foi observada a presença *de Lactobacillus*, que representa ser a principal bactéria láctica responsável pela acidificação do produto nos tanques durante o processo fermentativo. *L. plantarum* e outras bactérias lácticas têm sido relatadas como os microrganismos predominantes relacionado com a fermentação natural do amido de mandioca (AMPE *et al.*, 2001). Estes microorganismos são conhecidos por serem responsáveis pela produção dos ácidos orgânicos e dos compostos aromáticos. Aos 25 dias de fermentação dentro do tanque identificamos: *Bacillus anthracis str. Ames cepa Ames; Bacillus cereus ATCC 14579 cepa ATCC 14579.*

Foi possível observar diferenças entre as substâncias voláteis presentes no polvilho doce e azedo. O polvilho doce apresenta ácidos orgânicos de massa molar superior, ésteres, hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos e terpênicos. Enquanto o polvilho azedo apresenta ácido acético, que pode ser o responsável pela diminuição do pH, não apresenta ésteres, similar perfil de hidrocarbonetos alifáticos e uma alteração/diminuição do perfil terpênico e aromático (tabela 3).

Portanto, pode-se concluir com esse estudo que houve redução do pH no final da fermentação em relação ao início e consequentemente, aumento da acidez. Foram

isoladas 331 colônias de bactérias, sendo que apenas 15 apresentam diferenças genotípicas. As bactérias *Lactococcus* e *Lactobacillus* são as que prevalecem nos primeiros dias de fermentação. O perfil dos compostos voláteis mostra a ausência de substâncias terpênicas e aromáticas durante o processo fermentativo na produção do polvilho azedo.

REFERÊNCIAS

AHRNE S; NOBAEK S; JEPSSON B; ADLERBERTH I, WOLD AE & MOLIN G. 1998. *J. Appl. Microbiol:* 85, 88–94.

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

BLAST- BANK LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. 2013. Estados Unidos: Disponível emhttp://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. Acessado em: outubro 2013.

CARVALHO EP; CANHOS VP; RIBEIRO VE; CARVALHO HP. 1996. Polvilho azedo: Aspectos físicos, químicos e microbiológicos. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.31, n.2, p.129-137.

CEREDA MP; LIMA UA. 1981. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. II- Controle das fermentações realizadas em laboratório. Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas. 15: 107-122.

CHISTE RC; COHEN KO. 2011. Influência da fermentação na qualidade da farinha de mandioca do grupo d´água. Acta Amazonica. Vol. 41(2): 279 – 284

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. 1985. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3 ed. São Paulo, pp. 533.

KOPERMSUB P & YUNCHALARD S 2010. Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaasom, a traditional fermented fish product of Thailand. Int J Food Microbiol 138, 200–204.

MAEDA KC; CEREDA MP. 2001. Avaliação de Duas Metodologias de Expansão ao Forno do Polvilho Azedo. Ciênc. Tecnol. Aliment. 21: 139-143.

SAMBROOK J; RUSSEL DW. 2001. Molecular Cloning. 3rd edition. 3 vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Anais... Palmas: ABH.

Tabela 1. Acidez titulável do polvilho azedo ao longo do processo de fermentação (0, 9, 18 e 25 dias) e respectivos erros padrão (EP) (Titratable acidity of cassava starch throughout the fermentation (0, 9, 18 and 25) and standard errors (SE) process). Rio de Janeiro, UFRJ, 2013.

Tempo de Fermentação (dias)	Acidez Titulável ± EP	pH ± EP
0	0,270 ± 0,012	4,458 ± 0,017
9	0,210 ± 0,016	3,960 ± 0,018
18	0,740 ± 0,010	3,908 ± 0,022
25	0,670 ± 0,019	3,815 ± 0,031

Tabela 2. Números de UFC para amostras coletadas nos tempos de 0, 9, 18 e 25 dias de fermentação que foram crescidas em meio M17 (Numbers of UFC for samples collected at 0, 9, 18 and 25 days of fermentation that were grown in M17 medium).

Tempo de Fermentação (dias)	UFC / mL (M17)	UFC / mL (Azida)	UFC / mL (extrato malte)
0	$2,65 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$
9	$0,85 \times 10^8$	$0,7 \times 10^8$	nd
18	$1,20 \times 10^8$	$0,2 \times 10^8$	nd
25	$0,60 \times 10^8$	nd	nd

nd: não detectado

Identificação molecular da microbiota em polvilhos e perfil de compostos voláteis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 53. Anais... Palmas: ABH.

Tabela 3. Compostos voláteis presentes no polvilho azedo e doce (Volatile compounds present in the cassava starch and sweet). Rio de Janeiro, UFRJ, 2013.

	Polvilho doce	**Polvilho azedo**
Ácidos orgânicos	ácido benzenodicarboxílico; 1,2-ácido benzeno-dicarboxílico.	ácido acético
Hidrocarbonetos alifáticos	nonano; Decano; Dodecane; Heptadecano; Tetradecano; 2,6-bis (1,1-dimetiletil) pentadecano; 1,1'-oxibis-octano; 2,5-dimetil-nonano;;	octano; 2,5-dimetil-nonano; nonano; decano; dodecano; octacosano.
ésteres	éster bis (2-metil propil); éster dietílico	
Hidrocarbonetos aromáticos	metil benzeno; 1,3-dimetil-benzeno; 1,2,3-trimetil-benzeno; 1,3,5-trimetil-benzeno; 1,2-dicloro-benzeno; 1-metil-3-(1-metiletil)-benzeno; metil(1-metiletenil)-benzeno; α-4-trimetil-metanolbenzeno; estireno; benzaldeído;	1-etil-3-metil-benzeno; 1,2,3-trimetil-benzeno; 1,2,4-trimetil-benzeno; 1-etil-2,3-dimetil-benzeno.
terpenos	sabineno; 2-β-pineno; β-mirceno; δ-careno; 2-etil-1-hexanol; dl-limoneno; α-terpinoleno;; (+)-(2S,4R)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol; l-.α.-terpineol; dihidrocarvone; decanal; trans-2-caren-4-ol; 2-ciclo-hexen-1-ona, 2-metil-5-(1-metiletenil); m-cimeno, 5-terc-butil-; 1-ciclo-hexeno-1-carboxaldeído, 4 - (1-metiletenil); 8-metil -; fenol, o 5-metil-2-(1-metil-etil); fenol, 2-metil-5-(1-metil-etil); acetato de nerilo; acetato de geranilo; α-bergamoteno; 2,5- ciclohexadieno-1,4-diona,; β-bisabolene;	tert-butil-cimeno; dl-limoneno; beta-damascenone cis-cariofileno; α-ionona.

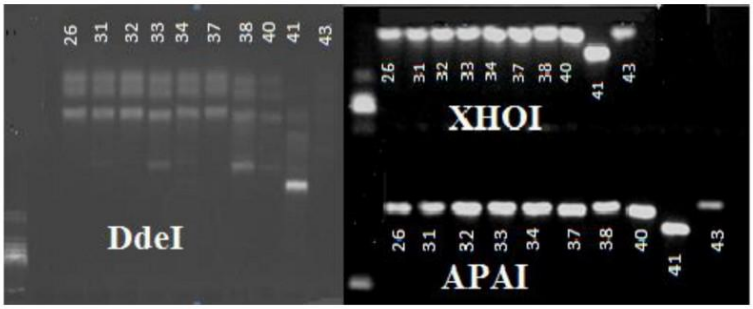


Figura 1. Avaliação para técnica ARDRA-PCR. As enzimas utilizadas foram APAI, DdeI e XhoI (Evaluation for technical ARDRA-PCR. The enzymes used were APAI, DdeI and XhoI). Rio de Janeiro, UFRJ, 2013.