

**SANDRA REGINA PAULON AVANCINI**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E  
TOXICOLÓGICA DA ÁGUA DA FERMENTAÇÃO DO AMIDO  
DE MANDIOCA**

**FLORIANÓPOLIS, SC**

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**Sandra Regina Paulon Avancini**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E  
TOXICOLÓGICA DA ÁGUA DA FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE  
MANDIOCA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de  
Santa Catarina, como requisito final à obtenção do  
Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Edna Regina Amante

**Florianópolis – SC**

**2007**

# CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, MICROBIOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DA ÁGUA DA FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA

**Sandra Regina Paulon Avancini**

Tese aprovada como requisito final para a obtenção do título de Doutor no programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela Comissão formada por:

Presidente \_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Edna Regina Amante (UFSC)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dra Deborah Helena Markowicz Bastos (USP)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dra Rosemary Hoffman Ribani (UFPR)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dra Regina Vasconcelos Antônio (CCB- UFSC)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Ernani Sebastião Sant'Anna (UFSC)

Membro: \_\_\_\_\_  
Prof. Dra Vera Regina Cardoso Garcia Tramonte (CCS-UFSC)

**FLORIANÓPOLIS, julho/2007**

Aos meus pais

Ao Sidney, meu maior incentivador pelo amor, carinho, ajuda, compreensão, e paciência

Aos meus queridos filhos

## AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero reconhecimento e agradecimento, em especial:

Ao Prof Antonio J. S. Hamad (*in memoriam*), que sob sua orientação iniciei este doutorado, pelo seu grande incentivo.

À Professora Edna Regina Amante, pela dedicada orientação e confiança na realização deste trabalho, por sua paciência, compreensão e amizade.

Às Professoras Renata Dias de Mello Castanho Amboni e Elane Shwinden Prudêncio colaboradora, “revisora” e amigas.

À Professora Vera Lúcia C. G. Tramonte do Departamento de Nutrição por sua atenção, assistência e amizade.

Ao professor Ricardo Tramonte pela colaboração nas análises histológicas.

Ao professor Paulo Ogliari pelas orientações nas análises estatísticas.

À Dra. Valeria Reginatto pelas análises de Demanda Química de Oxigênio.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Nutrição pela minha liberação para a realização do doutorado.

Ao Gerson L Faccin do Laboratório de Nutrição Experimental da UFSC, pela assistência e grande apoio durante o desenvolvimento e decorrer do ensaio toxicológico.

Ao Hospital Universitário pelas análises hematológicas e bioquímicas em especial a Professora Maria de Lourdes Rovaris e os técnicos Nicéia e Erico.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Frutas e Hortaliças Rossana, Karina Tramonte, Karina Simas, Eloísa, Thiago, Paula Janete e Iolanda, pela amizade, apoio e inestimável contribuição na elaboração deste trabalho.

À Manuela Alano Vieira, minha grande incentivadora pela amizade e apoio na execução deste trabalho.

À “anja” que sempre esteve presente no desenvolvimento deste trabalho, Ângela Angeloni Rovaris, bolsista de iniciação científica.

À Renata Angeloni Búrigo pela colaboração na coleta dos materiais biológicos para a análise toxicológica.

À Eunice C Ilha pela amizade e colaboração na execução das análises microbiológicas.

Ao Professor. Ernani S. Sant’Anna pela gentileza ao ceder o Laboratório De Biotecnologia Alimentar para a realização das análises microbiológicas.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, em especial ao Sérgio, ao Carlos, ao Bento e à Inês.

Aos colegas de pós-graduação, pelos momentos de companheirismo.

Ao Rodrigo e Eria Cardoso pela grande colaboração e apoio nas visitas às polvilharias e coleta das amostras em Santa Rosa.

As polvilharias Finardi, Machado, Sevenhani e Inquil pelo fornecimento da matéria prima.

A todas as pessoas citadas e aquelas que possa ter esquecido o meu carinho e amizade. MUITO OBRIGADO!

AVANCINI, S.R.P. **Caracterização química, microbiológica e toxicológica da água de fermentação do amido de mandioca** 2007, Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

## RESUMO

O amido fermentado de mandioca (polvilho azedo), apesar da sua importância, ainda é obtido de maneira empírica, com uma fermentação prolongada e praticamente sem nenhum controle. A fermentação é do tipo submersa, normalmente com uma lâmina de 20 cm de água na superfície. As águas resultantes da fermentação do amido, descartadas ao final do processo, são ainda pouco estudadas, sendo até hoje consideradas como efluente poluidor, no entanto compostos ácidos, aromáticos, vitaminas e muitos outros podem ser formados pelas bactérias lácticas e leveduras durante o processo fermentativo. Neste trabalho foram avaliadas as características químicas, microbiológicas e toxicológicas deste resíduo para contribuir para sua conversão em matéria-prima para outros produtos. A água residual da fermentação, em laboratório, do amido de mandioca proveniente de três regiões diferentes do Estado de Santa Catarina, e a água coletada em uma polvilharia apresentaram pH entre 3,0 e 3,7, índice de acidez de 21 a 68,0 mL de NaOH N por 100mL; 0,19 a 0,62 g de ácido láctico por 100mL, respectivamente. A produtividade de 15,00 mg de ácido láctico/g de amido representa uma porcentagem de bioconversão de apenas 1,5%. O teor de sólidos totais deste resíduo (1.700 a 6.000 mg/L) é muito baixo e também apresentou uma composição muito pobre. A contagem de bactéria láctica ao final da fermentação variou de 5,27 a 7,84 log UFC/mL, ocorrendo em menor número nas fermentações com amido proveniente de Rio do Sul. Valores semelhantes foram encontrados para bactérias mesófilas totais (6,39 a 8,02 log UFC/mL) e bolores e leveduras (5,92 a 6,99 log UFC/mL), mas não diferiram entre as diferentes fermentações. Esta água apresentou baixa toxicidade aguda em camundongos (>5,0 g/Kg de peso) e sua ingestão por 28 dias em concentrações de 0, 25%, 50% e 100% durante 28 dias não causou alterações clínicas e hematológicas significativas nos animais. Mais estudos ainda são necessários para avaliar a utilização deste resíduo tanto para produção de ácidos orgânicos como para o desenvolvimento de produtos probióticos.

**Palavras-chave:** amido de mandioca, fermentação, água residual, ácido láctico, toxicologia

## AVANCINI, S.R.P. Chemical, microbiologic and toxicological characterization of cassava starch fermentation wastewater

### ABSTRACT

The sour cassava starch (“polvilho azedo”), even though its importance, is still obtained at empiric form, in a prolonged fermentation and without any control. The fermentation is of the submerge kind, normally with a 20 cm layer of water in surface. The cassava starch wastewater has not been fully studied and until today considered as polluting wastewater, nevertheless, acids, aromatic, vitamins and other compounds can be produced by lactic bacterial and yeast during the fermentative process. In this work were evaluated the chemical, microbiologic and toxicological characteristics of this wastewater with the aim of contribute for its conversion in a new raw material for other products. The cassava starch fermentation wastewater produced in laboratory from three different places of the Santa Catarina State, and the collected in a industry, presented pH between 3.0 and 3.7, acidity index of 21.0 to 68.0 mL of NaOH N by 100 mL; 0.19 to 0.62 g of lactic acid by 100 mL. The productivity of 15.00 mg of lactic acid.g<sup>-1</sup> of starch means a bioconversion of only 1.5%. Total solids content from this wastewater is very short and also presented a poor composition. The lactic bacterial count at the final of fermentation varied from 5.27 to 7.84 log cfu.mL<sup>-1</sup>, lower number being observed in fermentation with starch from Rio do Sul region. Similar values were observed for total mesophylic bacterial and yeasts, but were not different between several fermentations. This wastewater presented low acute toxicity in mice (>5.0 g.Kg<sup>-1</sup> of weight) and its ingestion during 28 days in concentrations of 0, 25, 50 and 100% did not cause significant clinical and haematological changes in animals. More studies are necessary to evaluate the utilization of this wastewater for organic acid production or probiotic products development.

**Keywords:** cassava starch, fermentation, wastewater, lactic acid, toxicology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Páginas</b>
<b>Figura 1</b> Formação de cianídeos a partir da linamarina	21
<b>Figura 2</b> Esquema geral da fermentação da glicose	29
<b>Figura 3</b> Processo de produção de amido de mandioca fermentado	40
<b>Figura 4</b> Crescimento dos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda da água residual da fermentação do amido de mandioca.	71
<b>Figura 5</b> Consumo de líquido dos animais em mL/kg/dia durante os 28 dias de experimento.	74
<b>Figura 6</b> Consumo de líquido residual da fermentação do amido de mandioca em g de sólidos totais por Kg de peso do animal por dia durante os 28 dias de experimento.	75
<b>Figura 7</b> Aparência da mucosa intestinal do intestino delgado dos diversos grupos experimentais	85

## LISTA DE TABELAS

Tabelas	Páginas
<b>Tabela 1</b> Área colhida e quantidade produzida de mandioca no mundo e nos principais países produtores.	16
<b>Tabela 2</b> Área colhida e produção de mandioca no Brasil e nos principais estados	17
<b>Tabela 3</b> Composição química da raiz da mandioca	19
<b>Tabela 4</b> Composição de alguns produtos da mandioca típicos do Brasil	23
<b>Tabela 5</b> Composição da água vegetal gerada no processo de produção de polvilho em Santa Rosa do Sul (SC)	46
<b>Tabela 6</b> Composição do resíduo líquido de uma fábrica de farinha de mandioca	47
<b>Tabela 7</b> Sólidos totais, cinzas e nitrogênio total na água residual da fermentação do amido de mandioca.	57
<b>Tabela 8</b> Composição média das águas residuais da extração do amido de mandioca	58
<b>Tabela 9</b> Origem da fécula, época do ano, tempo de fermentação acidez e pH da água de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo.	59
<b>Tabela 10</b> Produção do ácido láctico usando amido como fonte de carbono em condições controladas e em fermentação natural	61
<b>Tabela 11</b> Tempo de fermentação (TF), acidez, pH e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias mesófilas e bolores e leveduras da água residual da fermentação do amido de mandioca.	64
<b>Tabela 12</b> Características bioquímicas das colônias isoladas da água de fermentação do amido de mandioca.	66
<b>Tabela 13</b> Fermentação de carboidratos das colônias isoladas da água de fermentação do amido de mandioca.	67
<b>Tabela 14</b> Caracterização Fenotípica das colônias isoladas da água de fermentação do amido de mandioca.	68
<b>Tabela 15</b> Composição química da água residual da fermentação do amido de mandioca RS+TB.	70

<b>Tabela 16</b> Contagem de bactérias ácido lácticas, mesófilos totais e bolores e leveduras da água residual da fermentação do amido de mandioca (UFC/mL) RS+TB	70
<b>Tabela 17</b> Valores de ganho de peso, consumo de ração e líquido e peso do fígado absoluto e relativo (g/100 g de peso corporal) das fêmeas submetidas à toxicidade aguda (14 dias).	72
<b>Tabela 18</b> Ganho de peso, consumo de ração e líquido dos animais em 28 dias de experimento.	73
<b>Tabela 19</b> Peso relativo dos órgãos dos animais com 28 dias de experimento em g/100g de peso corporal.	76
<b>Tabela 20</b> Valores de hemograma dos ratos machos e fêmeas no final do período experimental de 28 dias (média $\pm$ DP).	78
<b>Tabela 21</b> Tempo de protrombina (TAP) dos ratos no final do período experimental de 28 dias (média $\pm$ DP)	79
<b>Tabela 22</b> Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos machos e fêmeas no final do período experimental de 28 dias (média $\pm$ DP).	81
<b>Tabela 23</b> Resultados da análise histopatológica do corte intestinal dos animais após 28 dias de experimento.	84

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	15
<b>2.1 Mandioca</b>	15
<b>2.2 Toxicidade da mandioca</b>	19
<b>2.3 Fermentação da mandioca</b>	26
<b>2.4 Bactérias ácido-láticas</b>	27
2.4.1 <i>Lactobacillus</i>	31
<b>2.5 Probióticos</b>	32
<b>2.6 Produtos fermentados de mandioca</b>	35
2.6.1 Gari	35
2.6.2 Fufu	36
2.6.3 Lafun	37
2.6.4 Attieke	37
2.6.5 Ckickwangué	37
2.6.6 Agbelima	37
2.6.7 Mandioca Puba	38
2.6.8 Fécula de mandioca fermentada	38
<b>2.7. Resíduos do processamento da mandioca</b>	45
<b>2.8 Análise toxicológica</b>	48
<b>2.9 Tecnologia Limpa e o processamento de alimentos</b>	50
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	51
<b>3.1 Material</b>	51
<b>3.2 Obtenção da água de fermentação do amido de mandioca</b>	51
<b>3.3 Caracterização química da água de fermentação do amido de mandioca em laboratório</b>	51
<b>3.4 Análises Microbiológicas</b>	52

<b>3.5 Análise de micotoxinas</b>	53
<b>3.6 Teste de toxicidade</b>	53
3.6.1 Animais	53
3.6.2 Toxicidade aguda	54
3.6.3 Toxicidade subcrônica ou dose repetida-28 dias	54
3.6.4 Parâmetros bioquímicos e hematológicos	55
3.6.5 Análise histológica	55
3.6.6 Análise estatística	56
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	57
4.1 Composição química da água residual da fermentação do amido de mandioca	57
4.2 Análises microbiológicas	63
4.3 Micotoxinas	69
4.4 Análise toxicológica	69
4.4.1 Toxicidade aguda	70
4.4.2 toxicidade subcrônica	72
<b>5 CONCLUSÕES</b>	87
<b>6 SUGESTÕES</b>	88
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	89
<b>ANEXOS</b>	103

# 1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta de origem brasileira, considerada um importante alimento em países da América Latina, África e Ásia, devido a sua grande capacidade de adaptação a várias condições agro-ecológicas. Cultivada em todo o território brasileiro, é utilizada tanto na alimentação humana e animal, bem como matéria-prima em inúmeros produtos industriais, dentre eles, os mais importantes são a farinha de mandioca, a fécula e o polvilho azedo.

O amido fermentado de mandioca (polvilho azedo) é um amido naturalmente modificado através da fermentação e secagem ao sol, resultando em produto com a peculiar propriedade de expansão, sem glúten e sem fermento, para a elaboração de inúmeros produtos de panificação. Apesar da sua importância, ainda é obtido de maneira empírica, apenas com o conhecimento prático dos fabricantes, com uma fermentação prolongada e quase sem nenhum controle. A fermentação é do tipo submersa, normalmente com uma lâmina de 20 cm de água. No entanto, os produtores de Santa Catarina utilizam um volume de água muito menor, principalmente os do sul do Estado.

O trabalho realizado por Marcon (2004) indicou que a adição do xarope de glicose, durante o processo fermentativo, pode contribuir para incrementar a produtividade do polvilho azedo sem comprometer a expansão. O processo envolve, obrigatoriamente, a manutenção da lâmina de água na superfície do amido em fermentação.

O processo fermentativo tem início com a geração de açúcares a partir do amido, por microrganismos amilolíticos. A partir desta fonte de carbono, bactérias e leveduras passam a atuar gerando compostos ácidos, aromáticos, vitaminas e muitos outros.

As águas resultantes da fermentação do amido, descartadas ao final do processo, são ainda pouco estudadas, sendo até hoje consideradas efluentes com elevada Demanda Química e Bioquímica de Oxigênio (DQO e DBO). As poucas considerações existentes, dizem respeito ao seu potencial poluidor. Os efluentes da fermentação do amido de mandioca diferem das águas residuais da extração do amido de mandioca a partir das raízes, comumente denominadas de manipueira.

Apesar da literatura ser vasta em estudos sobre a manipueira, são praticamente inexistentes trabalhos relacionados à caracterização química, microbiológica e toxicológica da água residual do processo de fabricação do polvilho azedo.

A água residual da fermentação representa um volume expressivamente menor comparativamente a manipueira, mas pode conter uma composição interessante para ser aproveitada na elaboração de outros produtos, o que significaria maiores rendimentos para o produtor do polvilho azedo.

O Grupo de Pesquisa em Tecnologias Limpas no Processamento de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, UFSC, tem procurado contribuir para a redução do impacto ambiental das agroindústrias propondo tecnologias que valorizem as matérias-primas e minimizem a emissão de resíduos sólidos, líquidos e gasosos. Sendo a maioria dos projetos inéditos internacionalmente, requerendo elevado investimento em pesquisa com a finalidade de assegurar sugestões de usos aos produtos considerados resíduos.

Através do presente trabalho, as águas da fermentação do amido de mandioca foram caracterizadas com a finalidade de sugerir aplicações que contribuam para a conversão de um resíduo industrial em matéria-prima para a elaboração de novos produtos. Foram avaliadas as características químicas, microbiológicas e toxicológicas da água de fermentação do amido de mandioca obtidas em polvilharias e em laboratório.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), originária da região amazônica brasileira, foi introduzida na África durante o século 16 e na Ásia no século 18. Planta arbustiva, composta de uma parte aérea e uma subterrânea formada por raízes tuberosas, que consiste na parte comestível. Pode apresentar 5 a 20 raízes com 20 a 80 cm de comprimento, diâmetro de 5 a 10 cm e o peso fresco de cada raiz pode variar de 100 a 5000 g (PANDEY et al., 2000).

Devido à sua grande capacidade de adaptação a várias condições agroecológicas, como por exemplo, a resistência à seca e sem nenhuma necessidade específica para crescimento, seus aspectos agrícolas têm recebido atenção nos últimos anos, visando aumentar sua produção. A mandioca é o sexto alimento mais produzido no mundo e representa o alimento básico para mais de 700 milhões de pessoas em diversos países (KATO; SOUZA, 1987; SOCCOL, 1996, citado por PANDEY et al., 2000).

A África é responsável por 53,8% da produção mundial, seguida pela Ásia, com 29,4% e a América do Sul com 16,9%. Entre os países produtores destacam-se a Nigéria, responsável por 19,92% da produção total, seguido do Brasil, com 11,76%, a Indonésia, com 9,77%, a Tailândia, com 9,75%, a República Democrática do Congo, com 8,89% e Gana com 5,29%. Estes países contribuem com cerca de 65% do volume mundial produzido (Tabela 1) (Vieira, 2004a). Cerca de 60 % da produção mundial de mandioca é utilizada para consumo humano, 33% na alimentação animal e 7 % nas indústrias têxteis, papel, alimentos e fermentação (PANDEY et al., 2000).

O cultivo da mandioca está associado ao Brasil desde o seu descobrimento, sendo atualmente cultivada em todos os Estados brasileiros, (CEREDA, 2001; CARDOSO; SOUZA, 2002).

**Tabela 1** Área colhida e quantidade produzida de mandioca no mundo e nos principais países produtores.

País	Área colhida (1000 ha)			Quantidade produzida (1000 t)		
	00/01	01/02	02/03	00/01	01/02	02/03
Mundo	17.184	17.353	17.184	184.985	186.391	189.100
Angola	573	593	573	5.394	5.620	5.699
Brasil	1.667	1.692	1.646	22.577	23.131	22.147
Rep. Dem. Congo	1.902	1.840	1.902	15.436	14.929	14.929
Gana	726	794	726	8.966	9.731	10.000
Índia	270	270	270	6.900	7.000	7.100
Indonésia	1.318	1.277	1.318	17.055	16.913	18.474
Moçambique	834	1.020	834	5.988	5.925	6.150
Nigéria	3.430	3.455	3.430	32.586	34.476	33.379
Tailândia	1.049	988	1.049	18.396	16.868	18.430
Tanzânia	661	660	661	6.884	6.888	6.888
Uganda	390	398	390	5.265	5.373	5.400
Demais países	4.364	4.366	4.385	39.538	39.537	40.504

Fonte: FAO/ jun 04 (Vieira, 2004a)

Segundo Vieira (2004b), a produção nacional dessa cultura, na safra 2004, conforme as estimativas de outubro de 2004 pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (Tabela 2) foi cerca de 24 milhões de toneladas com rendimento médio de 13,6 toneladas de raízes por hectare. A Região Nordeste lidera a produção, com 8,75 milhões de toneladas, seguida, em ordem de importância, pelas regiões: Norte, com 6,44 milhões de toneladas; Sul, com 4,04 milhões de toneladas; Sudeste, com 2,45 milhões de toneladas e Centro-Oeste, com 1,33 milhão de toneladas (VIEIRA, 2004b).

**Tabela 2** Área colhida e produção de raiz de mandioca no Brasil e nos principais estados nas safras de 2002/2003 e 2003/2004.

Discriminação	Área colhida (mil ha)			Quantidade produzida (mil t)		
	02/03	03/04	Var %	02/03	03/04	Var %
Brasil	1.645,7	1.769,9	7,55	22.146,8	24.003,6	8,38
Bahia	330,6	335,8	1,56	3.908,3	4.201,6	7,50
Pará	292,6	298,6	2,04	4.468,6	4.309,3	-3,57
Paraná	110,7	163,8	47,98	2.351,2	3.210,0	36,53
Maranhão	164,6	172,9	5,05	1.241,7	1.291,7	4,03
Amazonas	83,8	82,8	(1,13)	804,9	795,8	-1,13
Rio Grande do Sul	88,9	88,2	(0,81)	1.315,2	1.232,9	-6,26
Ceará	82,1	81,2	(0,99)	857,9	756,5	-11,81
Minas Gerais	60,6	59,0	(2,72)	850,6	885,6	4,12
Pernambuco	41,8	46,2	10,55	440,4	473,9	7,55
São Paulo	36,7	43,8	19,38	864,2	1.086,4	25,71
Piauí	39,8	40,8	2,63	358,8	435,6	21,38
Santa Catarina	28,4	32,3	13,52	538,9	593,0	10,03
Rio Grande do Norte	37,2	52,2	41,97	385,8	591,7	53,36
Mato Grosso do Sul	22,9	29,6	29,30	485,3	510,6	5,22
Mato Grosso	25,8	37,3	44,97	356,0	536,1	50,60

**FONTE:** IBGE.(1) Safra 03/04 – Dados preliminares (LSPA, outubro de 2004), citado por VIEIRA (2004b).

A safra catarinense de mandioca em 2004 apresentou uma área plantada de 32,3 mil hectares, obtendo 593 mil toneladas e rendimento médio de 18.382 Kg por hectare (Tabela 2). O rendimento médio industrial obtido na produção da farinha, do polvilho azedo e da fécula, na região Sul Catarinense, atingiu a média de 322 Kg de farinha por tonelada de raiz processada; o segmento de polvilho azedo oscilou entre 180 e 200 Kg por tonelada de raiz. No Alto Vale do Itajaí, a produção de fécula alcançou 254,8 Kg por toneladas de raiz (VIEIRA, 2004b).

Quando o processamento é grande, os subprodutos podem representar sérios problemas ambientais, pois mesmo as pequenas unidades fabris como as casas de farinha podem gerar quantidades significativas de resíduos, uma vez que normalmente se reúnem em um dado local ou município. Além do aspecto ambiental

o despejo indevido dos subprodutos de mandioca constitui um desperdício de rendimento para o produtor, quando se considera as quantidades geradas e a composição (CEREDA, 2001). Segundo CEREDA (2001), os subprodutos da mandioca são partes constituintes da própria planta, gerados em função do processo tecnológico adotado, sendo que a qualidade e a quantidade dos subprodutos variam em função do cultivar, idade da planta, tempo após a colheita, tipo e regulagem do equipamento industrial e outros fatores.

Considerando os principais tipos de processamento das raízes da mandioca, fabricação de farinha e extração de fécula, os subprodutos gerados podem ser sólidos (casca marrom, entrecasca, descarte, crueira, fibra, bagaço e varredura) ou líquidos (água de lavagem das raízes, água de prensa ou água vegetal da fabricação de farinha e manipueira diluída ou água de extração da fécula) (CEREDA, 2001).

Os resíduos líquidos geram, em média, um volume de 2,62 m<sup>3</sup> com a água de lavagem das raízes e 3,68 m<sup>3</sup> com a água de extração da fécula por tonelada de raízes processadas. Sendo esta última composta pela água de constituição das raízes mais a água utilizada para a extração (CEREDA, 2001).

Apesar de sua importância, a expansão da cultura da mandioca é limitada pela rápida deterioração de suas raízes após a colheita, baixo conteúdo de proteína e potencial toxigênico (Tabela 3), o que demanda um eficiente processamento pós-colheita (MOORTHY; MATHEW, 1998; NOUT; SARKAR, 1999; WESTBY, 2002).

**Tabela 3** Composição química da raiz da mandioca.

Composição	Peso úmido	Peso seco
Energia (Kcal/100g)	135,00	335,00
Umidade (g/100g)	65,50	15,70
Proteína (g/100g)	1,00	1,40
Lipídios (g/100g)	0,20	0,50
Amido (g/100g)	32,40	80,60
Fibra (g/100g)	1,10	1,20
Cinzas (g/100g)	0,90	1,80
Cálcio (mg/100g)	26,00	96,00
Fósforo (mg/100g)	32,00	81,00
Ferro (mg/100g)	0,90	7,90
Sódio (mg/100g)	2,00	-
Potássio (mg/100g)	394,00	-
Vitamina B2 (mg/100g)	0,04	0,06
Vitamina C (mg/100g)	34,00	0,00
Niacina (mg/100g)	0,60	0,80
Cianídeos (% m/m)	-	1,60

Fonte: Pandey (2000).

A mandioca é consumida de diversas maneiras, variando conforme o país. O processamento normal inclui cocção em água fervente, fatiamento e secagem, torração e conversão a outras formas de alimento, após a extração de amido e produção de farinha. Outra forma de processamento consiste na fermentação das raízes e subsequente produção de diferentes produtos, como *gari*, *fufu*, *placali* e *farinha*, na África; *pan de yuca*, *pan de bono*, *polvilho azedo* na América Latina e *Tape Katella* nos países orientais, entre muitos outros (MOORTHY; MATHEW, 1998).

## 2.2 Toxicidade da mandioca

A planta da mandioca difere de outras tuberosas amiláceas por conter glicosídeos potencialmente hidrolisáveis a cianeto (CEREDA, 2001). Os glicosídeos cianogênicos são produtos do metabolismo secundário das plantas e são compostos

por uma  $\alpha$ -hidroxinitrila tipo aglicona e um açúcar (principalmente D-glicose) (VETTER, 2000).

A linamarina é o glicosídeo mais representativo (93%) e a lotaustralina, o menos freqüente (7%) (KAMALU, 1995; CEREDA, 2001). Estes glicosídeos, presentes em todos os tecidos da planta, em presença de ácidos e temperatura adequada ou enzimas sofrem hidrólise e liberam ácido cianídrico (HCN), substância tóxica e potente inibidora da atividade de enzimas da cadeia respiratória (CARVALHO; CARVALHO, 1979).

A mandioca é geralmente classificada em brava ou amarga quando apresenta níveis de HCN superiores a 50 ppm e mansa ou doce quando contém níveis inferiores (CARVALHO; CARVALHO, 1979). O limite seguro de cianogênicos tem sido delimitado em 10 mg equivalentes de cianeto por quilograma de peso fresco (10 ppm) (PADMAJA, 1995).

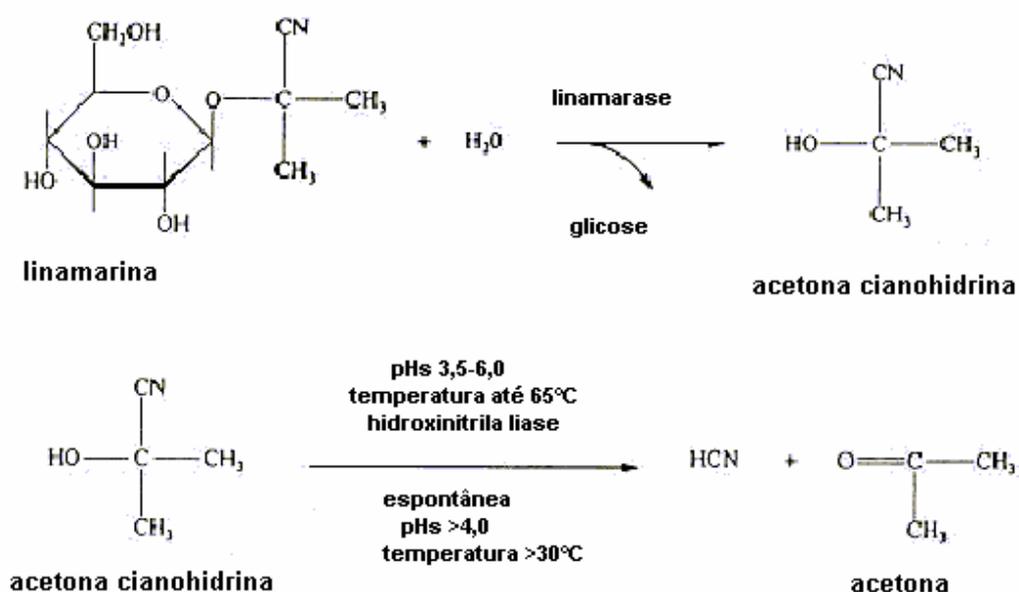
A dosagem para efeito letal do cianeto de potássio em humanos, segundo Montgomery (1969), citado por Ezeala e Okoro (1986), via oral, está estimada entre 1,0 e 7,0 mg/kg de peso. Carvalho e Carvalho (1979) relatam que a dose letal de ácido cianídrico é de 50 a 60 mg para uma pessoa adulta de 50 kg, enquanto Padmaja (1995) considera doses de 50 a 100 mg letais para adultos.

A quantidade de glicosídeos cianogênicos na raiz de mandioca é dependente do cultivar. Muitos cultivares apresentam teores de glicosídeos na raiz menores que 100 mg/kg de peso fresco, outros contém mais de 500 mg/kg. Nenhum cultivar de mandioca sem estes glicosídeos foi identificado (VETTER, 2000). Por ser a concentração de cianídeos na raiz afetada pelas condições ambientais durante o cultivo, algumas cultivares, geralmente consideradas mansas ou doces podem apresentar alto potencial cianogênico sob certas condições (WESTBY, 2002).

A formação de cianídeos a partir da linamarina é um processo em duas etapas (Figura 1), envolvendo a deglicolisação inicial da linamarina e a sua clivagem a acetona cianohidrina para formar acetona e cianídeos. Estas reações são catalisadas pela linamarase ( $\beta$ -glicosidase) e a  $\alpha$ -hidroxinitrila-liase (HNL). A etapa final é a quebra da cetona formando cianídeos e cetonas. Pode ocorrer espontaneamente (temperaturas maiores que 35°C ou pH acima de 4,0) ou catalisadas pela enzima hidroxinitrila-liase (HNL). No entanto, tem sido demonstrado que a expressão genética desta enzima ocorre principalmente nas folhas, com

pouca atividade nas raízes (WESTBY, 2002). As plantas cianogênicas intactas não liberam HCN (VETTER, 2000).

As enzimas hidrolíticas capazes de liberar cianídeos dos glicosídeos cianogênicos estão presentes na mandioca devidamente compartimentadas, para evitar contato com os glicosídeos em condições normais. Qualquer processo de ruptura das células fará com que a enzima entre em contato com os glicosídeos liberando cianídeos (PADMAJA, 1995).



**Figura 1** Formação de cianídeos a partir da linamarina.

Fonte: McMahan et al (1995) citado por Vetter (2000)

A linamarina é quimicamente estável, solúvel em água e resistente a fervera em meio ácido. A cetona cianohidrina também é solúvel em água e tem um ponto de ebulição de 82°C. O ácido cianídrico livre é volátil a 27,5°C, sendo rapidamente volatilizado na temperatura ambiente em regiões tropicais. Estes conhecimentos são utilizados para um processamento adequado da mandioca reduzindo a níveis adequados estes compostos cianogênicos (WESTBY, 2002). O total de cianogênicos ou potencial cianogênico de uma amostra é a soma da quantidade de linamarina, cetona cianohidrina e HCN/CN expresso em mg de equivalentes de HCN por quilograma de peso fresco (BRADBURY; EGAN; BRADBURY, 1999). Produtos derivados da mandioca que não foram processados adequadamente e que

apresentam níveis residuais não tóxicos de cianeto podem conter três tipos de compostos: as cianohidrininas, a linamarina e o HCN. As cianohidrininas remanescentes podem ser quebradas pelo pH alcalino do intestino produzindo cianídeos, já a linamarina acredita-se que possa ser quebrada por ação de enzimas microbianas no intestino. No entanto, conforme relata Kamalu (1995), uma quantidade significativa da linamarina ingerida permanece intacta, sendo absorvida desta maneira e excretada pela urina, mas se esses produtos são consumidos por períodos prolongados, podem levar a intoxicações crônicas (PADMAJA, 1995).

De acordo com Kamalu (1993), a linamarina absorvida de dietas com mandioca causa inibição da Na-K-ATPase, provocando um desequilíbrio de eletrólitos com depleção de Potássio levando a desidratação celular, vacuolização e ruptura das células epiteliais dos túbulos proximais, resultando em proteinúria com baixa concentração de albumina sérica. A produção de radicais livres por ciclos de hipoxia e normoxia (isquemia/reperfusão) criados pela liberação de cianetos da linamarina causa peroxidação lipídica da membrana celular. A quantidade de lesão está relacionada com a quantidade de linamarina ingerida rotineiramente a níveis subletais (KAMALU, 1995). Diversos casos de envenenamento foram relatados na Nigéria após o consumo de produtos de mandioca, como o gari (AKINTONWA et al., 1994; OSUNTOKUN, 1973 citados por VETTER, 2000).

Oluwole, Onabolu e Sowunmi (2002), em um estudo para determinar se o *gari* era uma fonte de exposição a cianetos, verificaram que a quantidade de cianeto no plasma após uma única ingestão era muito pequena para causar intoxicação aguda e que o longo tempo de trânsito do cianeto absorvido no plasma sugere que a ingestão freqüente de gari pode causar acúmulo no plasma.

Durante muitos anos, o consumo diário de alimentos a base de mandioca contendo compostos cianogênicos residuais, em regiões da África Central foi associado a doenças crônicas como o bócio, cretinismo, neuropatia tropical e a diabetes tropical, embora esse mecanismo não tenha sido demonstrado experimentalmente (OKE, 1969; OSUNTOKUN, 1981). Segundo Cagnon, Cereda e Pantarotto (2002), estudos recentes revelam que tais doenças estão mais relacionadas com o desequilíbrio nutricional e não com a ingestão constante de mandioca.

A mandioca também contém um agente bociogênico potencial, que pode agravar desordens por deficiência de iodo, como bócio e cretinismo (OKE, 1980).

Grande parte do cianeto da dieta é convertido a tiocianato, sendo que seus sintomas imitam a deficiência de iodo por impedirem a captação deste mineral pela glândula tireóide. Experimentos sobre valores séricos de tiocianato em amostras de urina humana indicam que a conversão de cianetos a tiocianato é uma via significativa no metabolismo do HCN (EMINEDOKI et al., 1994, citado por VETTER, 2000).

No processamento da mandioca para extração da fécula, a quantidade de água utilizada carrega grandes concentrações do glicosídeo cianogênico, fazendo com que o líquido residual apresente elevados níveis de cianeto (SOBRINHO, 1975, citado por CEREDA, 2001). Conforme Argueda e Cooke (1982), citado por Cereda (2001), a massa ralada para extração de fécula apresenta 76% do HCN original da raiz, na água de extração restariam 74%, na fécula úmida 2% e na fécula seca menos de 1%. Segundo Cereda e Mattos (1996), a mandioca processada consumida no Brasil apresenta níveis seguros de cianídeos (Tabela 4).

**Tabela 4** Composição de alguns produtos da mandioca típicos do Brasil.

Componentes	Produto			
	Farinha	Amido	Polvilho azedo	Chips
Umidade (%)	1,2	1,1	1,6	0,9
<b>Matéria seca(%)</b>				
Carboidratos	93	97,3	95,6	94
Proteínas	1,3	0,6	1,5	1,7
Lipídios	0,1	0,3	0,3	0,3
Fibra bruta	3,3	0,6	0,7	1,1
Cinzas	1,1	0,1	0,3	0,4
Cianídeos	0	0	0	1,6

Fonte: Cereda e Takahashi (1996)

Tradicionalmente, as raízes de mandioca são processadas por inúmeros métodos que variam enormemente de região para região. Estas técnicas geralmente são utilizadas com o objetivo de reduzir a toxicidade, melhorar a aceitabilidade e o armazenamento. Processamento adequado é primordial para converter a mandioca em alimento seguro (PADMAJA, 1995). Uma dessas técnicas é a fermentação, tanto

da raiz quanto da fécula para obtenção de vários produtos fermentados (SILVEIRA; CARVALHO; PILON, 1999).

Ezeala e Okoro (1986), analisaram o teor de HCN em produtos de mandioca, processados por diferentes técnicas, consumidos na Nigéria como a mandioca fermentada por 4 dias e torrada (*gari*); a mandioca macerada em água por 4 dias, desintegrada, retirada a água e cozida a 100°C por 25 a 30 minutos (*fufu*); desintegrada com eliminação posterior do suco e a fritura da massa em óleo a 100-150°C (torta de mandioca) e mandioca cozida em água em ebulição por 40 minutos, deixado em água corrente por uma noite e parcialmente seca (chips) e não encontraram níveis detectáveis de cianídeos. Portanto a incidência de neuropatia atáxica poderia não ser devido à ingestão prolongada de produtos de mandioca.

Segundo Essers, Van der Grift e Voragen (1996), a redução efetiva dos níveis de cianídeos requer dois tratamentos. O primeiro para aumentar o contato linamarina-linamarase, através da desintegração do tecido, como esmagamento, moagem ou degradação enzimática (microbiana) e o segundo para degradar as cianohidrininas formadas e a volatilização do HCN, por aquecimento ou secagem e pH adequado.

Iwuoha, Banigo e Okwelum (1997), observaram uma redução nos níveis de cianídeos da mandioca de 81,5 % em farinha de mandioca obtida após fatiamento da raiz, cocção por 35 minutos e maceração por 48 horas e 84,2% de redução na farinha de mandioca obtida por maceração por 24 horas, trituração e novamente maceração por 48 horas e extração da água. Também encontraram que os níveis de cianetos residuais foram maiores em produtos secos em estufas (50 a 80°C) do que em produtos secos ao sol, principalmente com a mandioca triturada. Uma área superficial maior e um período maior a temperaturas que favorecem a atividade endógena da linamarase podem ser responsáveis pela maior eficiência da secagem ao sol.

Obilie, Tano-Debrah e Amoa-Awua (2004), avaliaram a quebra dos glicosídeos cianogênicos durante o processamento da mandioca em *akyele*, um produto consumido em Gana que consiste na fermentação da mandioca moída, eliminação da água, passagem por peneira e cocção a vapor do produto granular. Ocorreu redução do potencial cianogênico durante todo o processo em cerca de 97%. A maior perda ocorreu durante a trituração e a fermentação. No final da

fermentação, nenhum glicosídeo cianogênico foi encontrado exceto cianohidrinas e cianetos livres.

Segundo Amoa-Awua, Appoh e Jakobsen (1996), embora algumas bactérias e leveduras isoladas da fermentação da mandioca possam produzir linamarase, a redução de glicosídeos cianogênicos, em mandioca fermentada, se deve ao fato de alguns microrganismos romper os tecidos da mandioca, facilitando o contato entre a linamarase e o glicosídeo cianogênico. Para Vasconcelos et al. (1990), citados por Wood (1991), a hidrólise do glicosídeo cianogênico ocorre devido às enzimas da planta e não à presença de bactérias durante a fermentação. A hidrólise é muito rápida, pois 95% da linamarina é hidrolisada até 3 horas após o início da fermentação e a torração do gari reduz os níveis de cianeto e cianohidrinas.

Para avaliar os efeitos do tempo de fermentação e o método de eliminação do líquido (desagüagem) sobre a quantidade de cianídeos no gari, Onabolu et al. (2002), fermentaram a mandioca triturada para a produção do gari, durante 7 dias, com extração contínua de líquido e com a extração somente no final da fermentação. Este estudo mostrou que os dois parâmetros estão associados ao nível de cianohidrinas no gari e que o método de extração contínua, processamento mais aceito pelos consumidores, apresentou níveis mais elevados de cianohidrinas e que para utilização deste processo é necessário maior tempo de fermentação (no mínimo 144 horas).

O crescimento de fungos também é comum em produtos secos de mandioca, ocorrendo durante a secagem, estocagem e quando submetidos à fermentação. Quando ocorre crescimento de fungos potencialmente micotoxigênicos pode ocorrer formação de micotoxinas. Diversos fungos micotoxigênicos como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus versicolor* e *Penicillium* sp., já foram encontrados na mandioca, mas o risco potencial associado as micotoxinas ainda não foi completamente avaliado. Em produtos de mandioca fermentados não tem sido encontradas micotoxinas (WESTBY, 2002).

## 2.3 Fermentação da mandioca

O termo fermentação, utilizando uma definição rigorosamente química é aplicado para descrever processos estritamente anaeróbios, no entanto, este termo é utilizado geralmente para descrever processos aeróbios e anaeróbios da quebra de carboidratos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

A produção de alimentos por fermentação é um dos mais antigos processos conhecidos pelo homem. Registros de métodos para fermentação do leite, carnes e vegetais têm sido encontrados com data de 6000 a.C., tendo como principal objetivo a preservação dos alimentos. No entanto, com o desenvolvimento de novas tecnologias para preservação, esses alimentos são fabricados pelo seu sabor, aroma e textura característicos, muito apreciados. Mesmo assim, as condições geradas na fermentação são essenciais para garantir a vida de prateleira e a segurança do produto (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). Em muitos países a fermentação é considerada essencial, sendo ainda realizada mais de forma artesanal do que industrial, (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Muitos alimentos fermentados dependem das bactérias ácido-láticas para mediar o processo fermentativo. Os produtos finais do catabolismo dos carboidratos pelas bactérias, geralmente ácidos, álcoois e dióxido de carbono, além de contribuir para a preservação, conferem sabor, aroma e textura proporcionando características únicas para o produto (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Diversos microrganismos estão associados aos produtos da fermentação da mandioca, sendo uma importante técnica de processamento utilizada na África e América Latina. Modificações nas características bioquímicas ocorrem durante o processo de fermentação, como a diminuição da toxicidade, com a remoção dos cianídeos, queda do pH e conseqüente aumento da acidez, variando com as condições de fermentação e produção de ácidos orgânicos, sendo o ácido lático o mais comum em todas as fermentações (MOORTHY; MATTHEW, 1998). A composição do substrato e os requerimentos nutricionais da cepa afetam consideravelmente a performance da fermentação. O crescimento microbiano também depende de fatores ambientais, como pH, temperatura e acúmulo de produtos finais do metabolismo destas bactérias. Alimentos obtidos pela fermentação ácido lática são caracterizados por um sabor ácido, atribuído

principalmente à produção de ácido láctico e acético pelas vias homo ou heterofermentativas (CHARALAMPOPOULOS; PANDIELLA; WEBB, 2002a).

As bactérias envolvidas com a fermentação da mandioca são *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium* e *Bacillus* sp, predominando as espécies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. manihotvorans*) no final da fermentação (MIAMBI; GUYOT; AMPE, 2003). Leveduras também têm sido identificadas como microrganismos predominantes na fermentação da mandioca (OYEWOLE; ODUNFA, 1990). Segundo Oyewole (2001), leveduras parecem ter um importante papel na sobrevivência e atividades de bactérias ácido lácticas durante a fermentação da mandioca. Através da sua atividade amilolítica, estão envolvidas na quebra do amido da mandioca em açúcares simples, que são convertidos pelas bactérias ácido lácticas em ácidos orgânicos. Somente bactérias ácido lácticas e leveduras parecem sobreviver à acidez encontrada nos estágios finais da fermentação submersa (OYEWOLE; ODUNFA, 1990).

## 2.4 Bactérias ácido-láticas

As bactérias ácidas lácticas (BAL) constituem um grupo de diversos microrganismos amplamente distribuídos na natureza associados com plantas (couve, milho, cevada), carnes, laticínios, mingaus e silagens. Conhecidas como culturas iniciadoras no processamento de produtos lácteos tais como, leites fermentados, iogurtes, queijos e manteigas, são importantes comercialmente também na fabricação de embutidos, carnes curadas, vinhos, cervejas, picles e outros. No entanto, estas bactérias podem ser um problema para as indústrias de alimentos, como contaminantes, podendo produzir sabores e aromas estranhos aos produtos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL consistem de bastonetes ou cocos gram-positivos e compreendem os gêneros: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e, mais recentemente, o gênero *Lactococcus*. Estas bactérias são geralmente mesófilas, mas podem crescer tanto a 5 °C quanto a 45 °C. Da mesma maneira, enquanto alg umas crescem a pH 4,0 - 4,5, outras são ativas a pH 9,6 ou 3,2 (CAPLICE; FITZGERALD, 1999). São oxidases negativas, benzidinas negativas, catalase negativas com exceção de algumas que

produzem uma pseudo catalase e necessitam de porfirina férrica (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL têm sido caracterizadas principalmente pela sua habilidade em formar vários isômeros de ácido láctico pela fermentação da glicose. O ácido láctico pode ser extraído de produtos fermentados e analisado quanto a sua habilidade em girar a luz polarizada. Se a rotação for para a direita recebe o nome de dextrógero (D), se for para a esquerda, levógero (L), ou uma mistura de ambos, denominada racêmica (CAPLICE; FITZGERALD, 1999, CARR; CHILL; MAIDA, 2002). O ácido láctico D(-) não é metabolizado pelos humanos (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

As BAL são agrupadas em homofermentativas ou heterofermentativas de acordo com o produto final da sua fermentação (Figura 2) (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; CARR; CHILL; MAIDA, 2002). As homofermentativas produzem ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose, apresentam a enzima aldolase, que fermenta glicose diretamente a ácido láctico, gerando 2 moles de lactato por mol de glicose. As heterofermentativas produzem outros produtos além do ácido láctico, incluindo dióxido de carbono, ácido acético e etanol da fermentação da glicose, utilizando a via alternativa da pentose monofosfato, convertendo as hexoses (açúcar de 6 carbonos) em pentoses (5 carbonos) pela enzima fosfocetolase, produzindo no processo aldeídos e diacetil, substâncias altamente desejáveis para formação de aromas (CAPLICE; FITZGERALD, 1999; CARR; CHILL; MAIDA, 2002). As BAL homofermentativas incluem o gênero *Streptococcus* (produz L(+) lactato) e *Pediococcus* (produz DL lactato). As heterofermentativas abrangem o gênero *Leuconostoc* e um subgrupo do gênero *Lactobacillus*, a Betabactéria. O *Leuconostoc* produz D(-) lactato e a Betabactéria DL lactato (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As BAL têm sido consideradas agentes etiológicos de doenças como endocardites, bacteremias e septicemia em pacientes com sistema imune deprimido, mas pesquisas recentes sugerem que estas bactérias podem fornecer uma microbiota intestinal transitória que competirá com organismos potencialmente perigosos, prevenindo doenças de natureza estabelecida (ADAMS, 1999; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

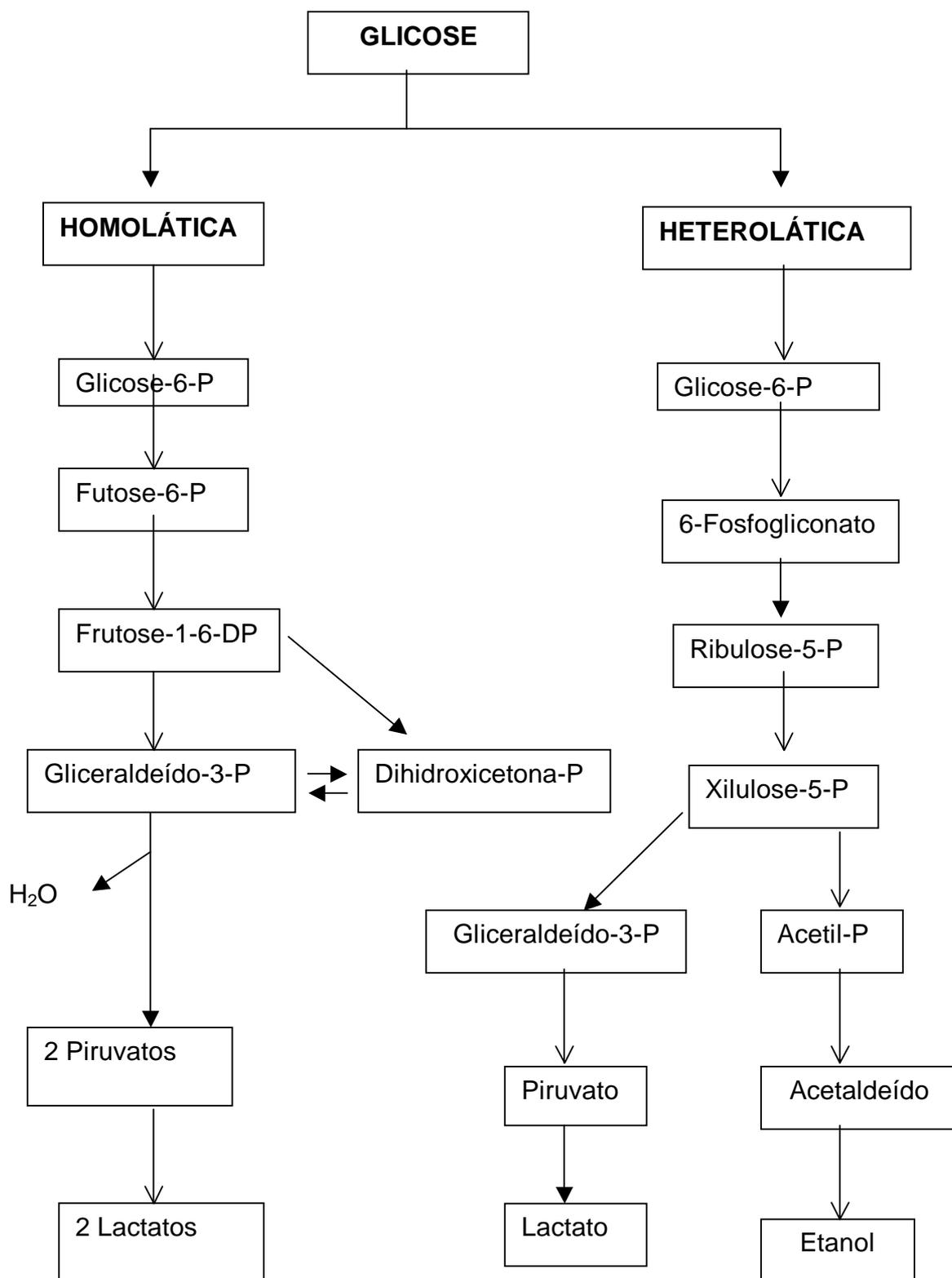


Figura 2. Esquema geral da fermentação da glicose  
 Fonte: CAPLICE e FITZGERALD (1999)

A inibição de certos microrganismos por outros membros do habitat, ou interferência microbiológica, envolve mecanismos que inclui competição de nutrientes, geração de ambiente desfavorável e competição pelo local de ataque ou adesão. Na atividade antimicrobiana das BAL, estão envolvidas as produções de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, antimicrobiano como reuterinas e bacteriocinas (ADAMS, 1999; CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

O antagonismo dos ácidos orgânicos, incluindo o láctico, acético e propiônico, produzidos pelas bactérias durante a fermentação, pode ser resultado da ação destes ácidos sobre a membrana citoplasmática das bactérias, interferindo com o potencial de membrana e inibindo o transporte ativo. O ácido acético é mais inibidor que o láctico e pode inibir leveduras, fungos e bactérias, enquanto o ácido propiônico pode inibir fungos e bactérias. A contribuição do acetaldeído e do etanol é mínima por sua baixa concentração nestes produtos. (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Nas BAL a falta de catalase para quebrar o peróxido de hidrogênio gerado na presença de oxigênio, pode levar ao acúmulo desta substância o que poderia inibir alguns microrganismos pelo forte efeito oxidante da membrana lipídica e proteínas celulares (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

O dióxido de carbono formado nas fermentações heteroláticas pode criar um ambiente anaeróbio, tóxico para microrganismos aeróbios, através da ação sobre a membrana celular e a redução do pH (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

O diacetil raramente está presente em alimentos fermentados em quantidades suficientes para produzir um efeito antibacteriano. No metabolismo do citrato, sua produção é reprimida pela fermentação das hexoses (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

As reuterinas são produzidas na fase estacionária durante o crescimento anaeróbio do *Lactobacillus reuteri* em uma mistura de glicose e glicerol ou gliceraldeído, afetando vírus, fungos, protozoários e bactérias, provavelmente pela inibição da enzima ribonucleotídeo redutase (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Bacteriocinas são substâncias primárias liberadas extracelularmente ou produtos modificados da síntese ribossomal das bactérias, que apresentam atividade antimicrobiana. O alvo das bacteriocinas é a membrana citoplasmática das bactérias (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

### 2.4.1 *Lactobacillus*

Lactobacilos são microrganismos muito exigentes que requerem carboidratos fermentescíveis, aminoácidos, vitaminas do complexo B, ácidos nucléicos e minerais para crescimento, além dos nutrientes específicos de cada cepa (GOMES; MALCATA, 1999).

O gênero *Lactobacillus* pode ser subdividido em três grupos: betabactérias, streptobactérias e thermobactérias, baseados na temperatura de crescimento e reações bioquímicas (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As Betabactérias crescem à temperatura de 15°C, são consideradas heterofermentativas porque produzem CO<sub>2</sub> na fermentação da glicose e freqüentemente hidrolisam arginina. São importantes na produção de alimentos fermentados (*L. brevis*, *L. fermentum*, *L. carnis*, *L. sanfrancisco*, *L. helveticus*, *L. fermentum*) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As streptobactérias também possuem uma temperatura ótima de crescimento de 15°C, são homofermentativas e são capazes de formar CO<sub>2</sub> a partir do gluconato e não da glicose. Inclui um grande número de microrganismos utilizados extensivamente na produção de alimentos e fermentações industriais e são encontrados naturalmente associados a vários vegetais como repolho (*L. plantarum*), milho (*Streptococcus lactis*), leite (*L. casei*) e queijos (*L. plantarum* e *L. lactis*) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As Termobactérias (*L. delbrueckii* sp. *bulgaricus* e *L. delbrueckii* sp. *lactis*), são homofermentativas e crescem a 45°C. São importantes em bebidas fermentadas, em vários queijos e outros produtos lácteos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Com o objetivo de identificar os principais fatores que influenciam o crescimento e a atividade metabólica de bactérias ácido lácticas em substrato de cereal, Charalampopoulos, Pandiella e Webb (2002a) estudaram o crescimento de quatro bactérias ácido lácticas (*L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* e *L. plantarum*), potencialmente probióticas em culturas de malte, cevada e trigo sem controle do pH. O meio de cultura com malte foi o que proporcionou o melhor crescimento de todas as cepas, devido a sua composição química, ou seja, por apresentar maior conteúdo de açúcar e de nitrogênio amino livre. O *L. plantarum* e o *L. fermentum* foram mais resistentes às condições ácidas do que o *L. reuteri* e o *L.*

*acidophilus*. Em todas as fermentações o crescimento cessou com valores de pH entre 3,73 e 4,88, valores menores do que os observados na fermentação com malte, o que sugere que a deficiência do substrato em açúcares e nitrogênio amino livre contribuiu para a limitação do crescimento.

## 2.5 Probióticos

A palavra probiótico, do grego “para a vida”, nos últimos anos tem sido utilizada de diversas formas (GOMES; MALCATA, 1999). Foi originalmente proposta para descrever compostos produzidos por um protozoário que estimulavam o crescimento de outros. Na década de 70 foi expandida para abranger extratos vegetais que estimulavam o crescimento microbiano e, mais tarde, utilizada para descrever suplementos alimentares para animais que exerciam efeito benéfico ao hospedeiro, contribuindo para o seu balanço microbiano intestinal. Atualmente, probiótico é definido como microrganismos viáveis que exercem um efeito benéfico sobre a saúde de seu hospedeiro, após sua ingestão, melhorando as propriedades de sua microbiota intestinal (GOMES; MALCATA, 1999).

A *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2001) define probiótico como microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas produzem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

Os efeitos benéficos dos probióticos podem ocorrer através de um efeito antagonista contra grupos específicos de organismos (enterobactérias patogênicas), resultando na sua diminuição, afetando seu metabolismo no intestino ou pela estimulação da imunidade (FULLER, 1989; KALANTZOPOULOS, 1997). Os possíveis modos de ação dos probióticos estão relacionados com a supressão de células viáveis, através da produção de compostos antibacterianos, competição por nutrientes e competição pelos sítios de adesão; alteração do metabolismo microbiano, com o aumento ou diminuição da atividade enzimática e estimulação da imunidade, com um aumento dos níveis de anticorpos e da atividade macrofágica (FULLER, 1989).

Muitas bactérias ácido lácticas são consideradas probióticas por proporcionarem efeitos benéficos em humanos e animais, por aumentarem a microbiota normal no trato gastrintestinal (FULLER, 1989; ADAMS, 1999). Acredita-

se que a presença destas bactérias pode prevenir infecções intestinais virais inibindo as patogênicas. Estudos duplo-cego placebo controlado suportam o argumento de que essas bactérias promovem a saúde aumentando a barreira da mucosa intestinal contra patógenos (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

A ingestão de probióticos tem sido considerada efetiva contra alergias alimentares, na redução da severidade da dermatite atópica, doença de Crohn, colite ulcerativa, diarreia associada a antibiótico e gastroenterite aguda devido ao rotavírus. O *Lactobacillus GG* tem sido associado com um aumento no nível da resposta imune em relação ao rotavírus, um aumento no total de células secretoras de anticorpos bem como no nível de imunoglobulina A (Ig A) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As bactérias probióticas, utilizadas atualmente em produtos comercializados, são principalmente do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GOMES; MALCATA, 1999; HELLER, 2001; CHARALAMPOPOULOS, et al., 2002b). As espécies de *Lactobacillus* de maior interesse são *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*. Do gênero das *Bifidobacterium* são *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* e *B. animalis* (KLAENHAMMER; KULLEN, 1999).

Diversos estudos têm sido realizados para verificar os efeitos terapêuticos dos probióticos nos distúrbios e infecções intestinais, atividade antitumorogênica, ação hipocolesterolêmica, principalmente de leites fermentados com *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus* (FULLER, 1989; KALANTZOPOULOS, 1997; GOMES; MALCATA, 1999), mas estudos clínicos adicionais ainda são necessários para confirmação.

Uma longa história de consumo, dados epidemiológicos disponíveis, testes clínicos e estudos de toxicidade aguda sugerem que as bactérias ácido-láticas normalmente encontradas nos alimentos fermentados e utilizadas na fabricação de probióticos são seguras. No entanto, a introdução de novas cepas probióticas deve ter uma avaliação mais detalhada quanto a sua segurança, principalmente, as cepas modificadas geneticamente ou de origem animal (ADAMS, 1999).

As propriedades mais importantes para um bom probiótico incluem tolerância à acidez e à bile, para manter o número de células viáveis adequado durante o armazenamento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal e aderência à

mucosa intestinal para colonização e produção de substâncias antimicrobianas com concomitante inibição de patógenos (FULLER, 1989; GOMES; MALCATA, 1999).

Considera-se que as bactérias ácido lácticas são efetivas como probióticos quando os níveis no cólon intestinal de  $10^6$  UFC (Unidades Formadoras de Colônias) são mantidos (CARR et al., 2002). Gomes e Malcata (1999), relatam que é essencial que os produtos probióticos fermentados conttenham um número satisfatório de células ativas no momento do consumo, ou seja, ao menos  $10^6$  UFC/mL, pois a dose terapêutica mínima diária é considerada de  $10^8$  a  $10^9$  células viáveis obtidas através da ingestão de 100 g de produto, contendo  $10^6$  a  $10^7$  células viáveis por mL e que ainda, é necessário que estes produtos sejam consumidos regularmente para manter o efeito desses microrganismos sobre a composição da microbiota intestinal.

Segundo Shah (2000) a maioria dos países não estabeleceu padrões para a contagem de células viáveis em produtos probióticos. No Japão, a Associação dos Produtores de Leites e Bebidas Lácteas Fermentadas, estabeleceu que este tipo de produto deve conter  $10^7$  células viáveis por mL. A legislação brasileira também não estabelece padrão para estes produtos (BRASIL, 2002).

A incorporação de cepas probióticas em alimentos tem sido muito utilizada na indústria de laticínios na produção de leites fermentados, iogurtes e queijos (GOMES; MALCATA, 1999; CHARALAMPOPOULOS, et al., 2002 b), no entanto, segundo Mattila-Sandholm et al. (2002), a aplicação de culturas probióticas em alimentos não lácteos representa um grande desafio.

A viabilidade de um probiótico em uma matriz alimentícia depende de fatores como pH, temperatura de estocagem, nível de oxigênio e presença de microrganismos competidores e inibidores (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Muitos alimentos tradicionais de fermentação ácido láctica, além dos leites fermentados, são disponíveis e raramente considerados como carreadores de probióticos. *Lactobacillus* crescem espontaneamente em cereais fermentados como a *Togwa*, uma bebida fermentada feita de sorgo e milho, consumida regularmente por bebês na Tanzânia. Esta bebida aumenta a barreira da mucosa intestinal em crianças de 6 a 25 meses com diarreia aguda (MOLIN, 2001).

Segundo Sanni, Morlon-Guyot e Guyot (2002), as fermentações tropicais podem ser exploradas como fontes de novos probióticos, pois estas cepas apresentam tolerância a sais biliares e pH igual a 2, indicando que podem sobreviver à passagem pelo estômago antes de chegar ao intestino humano. Estes autores

relatam que cepas de *L. fermentum* e *L. plantarum* com estas características foram isolados de uma pasta de milho fermentada produzida em Gana.

Um produto probiótico a base de farinha de aveia fermentada com *L. plantarum* 299v e misturado ao suco de fruta em uma concentração de 5%, contendo aproximadamente  $5 \times 10^{10}$  UFC/mL no produto final, foi lançado na Suécia em 1994. O *L. plantarum* é encontrado em alimentos fermentados de origem vegetal (MOLIN, 2001), sendo que nos países africanos a mandioca é principalmente consumida após fermentação ácido láctica, na qual o *L. plantarum* é normalmente a bactéria predominante (MOORTHY; MATHEW, 1998, OYEWOLE; ODUNFA, 1990).

Nsofor et al. (1996), produziram iogurte de soja utilizando como inóculo, exsudato de mandioca fermentada por 24 a 48 horas a 42°C, apresentando um gel firme e aroma similar ao do iogurte. O inóculo continha bacilos e cocos gram positivos e, não foram dependentes de lactose para adequada produção de ácido. A ausência de constituintes do leite em iogurte de soja manufaturado com essa cultura iniciadora pode ser vantajosa para pessoas alérgicas ao leite de vaca.

As características da fermentação do amido de mandioca e as águas resultantes do processo podem apresentar propriedades probióticas, porém até os dias de hoje, apenas uma citação prática indica esta possibilidade.

## **2.6 Produtos fermentados de mandioca**

### **2.6.1 Gari**

O *gari* é um dos produtos mais pesquisados entre os vários produtos fermentados derivados da mandioca, pois é um alimento básico na África. É produzido a partir de raízes de mandioca amargas, recém colhidas, descascadas, lavadas e raladas ou trituradas. A polpa é mantida em sacos de juta, sob pedras, para facilitar o escoamento do líquido durante a fermentação por 4 dias. O resíduo é tostado em panelas de ferro e apresenta um fraco sabor ácido (PADMAJA, 1995; IUWOHA; EKE, 1996). O suco extraído contém a maior parte dos glicosídeos cianogênicos tóxicos e é descartado (PADMAJA, 1995)

Na fermentação do Gari, observa-se no período inicial um rápido crescimento de bactérias, enquanto no período final de fermentação as leveduras são

predominantes. Inicialmente os microrganismos *Corynebacterium* sp. e *Geotrichum candidum* foram considerados responsáveis pela formação de ácido, sabor e aroma. Estudos posteriores demonstraram que o *Lactobacillus plantarum* produzia o conjunto sabor aroma mais típico do gari. Cinco gêneros estão envolvidos com a fermentação do gari: o *Leuconostoc*, o *Alcaligenes*, o *Corynebacterium*, o *Lactobacillus* e a *Cândida*. *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroids* estavam presente em grande número durante as 96 horas de fermentação e *Corynebacterium manihot* e *Geotrichum candidum* somente nas primeiras 48 horas. Portanto, as bactérias ácido lácticas parecem predominar durante a fermentação (MOORTHY; MATHEW, 1998). Segundo Okafor, Umeh e Lbenegbu (1998), *L. delbruckii*, *L. coryneformis*, e *Saccharomyces* sp., isolados na fermentação do gari, foram considerados os maiores produtores de linamarina, lisina e amilase.

### 2.6.2 Fufu

O *fufu* é um alimento fermentado popular na África, produzido pela maceração das raízes de mandioca, descascadas, lavadas e cortadas em pedaços de 20 cm, colocadas em potes de cerâmica com água ou em um pequeno fluxo de água, por 4 a 5 dias. Durante este período a mandioca fermenta e amacia, liberando ácido cianídrico na água de maceração e produzindo sabor e aroma característicos. A mandioca é então desintegrada e passada por peneira, ficando em repouso por 3 a 4 horas. A água é decantada e o sedimento é colocado em sacos e submetido à pressão para eliminar o restante da água (IUWOHA; EKE, 1996; MOORTHY; MATHEW, 1998). O sedimento é o *fufu* que pode ser consumido após gelatinização com água para formar uma pasta (IUWOHA; EKE, 1996). A sua produção envolve fermentação por bactérias lácticas (*Bacillus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Leuconostoc* e *Corynebacterium*) e pela levedura *Candida* sp, dos quais apenas o *Bacillus* sp, e *Corynebacterium* hidrolisam o amido (OKAFOR; IJIOMA; OYOLU, 1984; DEMIATE; OETERRER; WOSIACKI, 1994; MOORTHY; MATHEW, 1998). Segundo Oyewole e Odunfa (1990), *Lactobacillus plantarum* foi a bactéria ácido láctica predominante durante a produção do *fufu*.

### **2.6.3 Lafun**

O lafun é uma farinha de mandioca fermentada e seca (semelhante à farinha de mandioca puba brasileira), consumida na Nigéria. Raízes inteiras ou pedaços de mandioca descascadas e lavadas são macerados em água por 4 a 5 dias, para fermentação e amaciamento. Após este período, são secas ao sol por 2 dias, moídas e peneiradas. A farinha é adicionada à água em ebulição com agitação constante até formar uma pasta, que é servida com sopas (IUWOHA; EKE, 1996; MOORTHY; MATHEW, 1998). Os cinco grupos microbianos encontrados na fermentação deste produto são similares a outros produtos de mandioca fermentada: *Bacillus* sp., *Klebsiella* sp., *Leuconostoc* sp., *Corynebacterium* sp., *Cândida* sp. e *Lactobacillus* sp. (MOORTHY; MATHEW, 1998).

### **2.6.4 Attieke**

Produto fermentado popular em Gana semelhante ao fufu, com uma diferença nos estágios finais, quando é submetido ao vapor (MOORTHY; MATHEW, 1998).

### **2.6.5 Ckickwangué**

É o mais popular produto de mandioca processado no Zaire. As raízes são descascadas, maceradas por 3 a 5 dias até o amaciamento. As fibras são removidas da polpa, que é mantida em uma prateleira para posterior fermentação ou cobertas com folhas e pressionadas utilizando objetos pesados para drenar o excesso de líquido. A polpa é então triturada sobre uma pedra ou mortar, envolvida em folhas de *plantain* ou espécies da família Zingiberaceae, amarradas firmemente e cozidas ao vapor. O produto final é uma pasta mais espessa que o fufu (MOORTHY; MATHEW, 1998).

### **2.6.6 Agbelima**

Produto de mandioca fermentado muito consumido em alguns países da África (Gana, Benin e Togo). É uma farinha fermentada de mandioca, onde um inóculo produzido a partir da própria mandioca fermentada por 2 a 4 dias (Kudeme),

é triturado junto com a mandioca descascada e deixado fermentar por 2 a 3 dias (AMOA-AWUA; JACOBSEN, 1995). A microbiota encontrada tanto no inóculo quanto na pasta fermentada foi *Bacillus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus brevis* (AMOA-AWUA; JACOBSEN, 1995; AMOA-AWUA; APPOH; JAKOBSEN et al., 1996).

### **2.6.7 Mandioca Puba**

Processo utilizado pelos índios brasileiros, absorvido pelos escravos e transferido para o continente africano (SILVEIRA; CARVALHO; PILON, 1999). As raízes são colocadas diretamente em água estagnada ou dentro de um saco mantido em água corrente, permanecendo assim de 3 a 7 dias, até que amoleçam e comecem a soltar a casca. O período de maceração depende do cultivar, da idade das raízes, da temperatura e do pH da água. Em seguida, as raízes são esmagadas em peneiras ou cochos de madeira e secas ao sol ou em forno. Segundo Almeida (1992), citado por Silveira, Carvalho e Pilon (1999), os microrganismos envolvidos com a fermentação da mandioca puba são do tipo enterobactérias, corinebactérias, lactobacilos, leuconostoc, enterococos e leveduras formadoras de películas, ocorrendo alterações na população microbiana durante a fermentação. Também estão envolvidas na fermentação: enzimas amilolíticas e pectinolíticas, degradação do glicosídeo cianogênico, o metabolismo das dextrinas e de açúcares em compostos como ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas.

### **2.6.8 Fécula de Mandioca fermentada (polvilho azedo)**

A substância amilácea extraída de raízes da mandioca através de decantação, centrifugação ou outros processos tecnológicos adequados recebe o nome de fécula (BRASIL, 1978).

O amido da mandioca é utilizado na produção de diversos produtos tanto na indústria alimentícia, na produção de polvilho doce, polvilho azedo (utilizados na confecção de pães de queijo, biscoitos), massas alimentícias e panificáveis (macarrão, pão, bolachas e bolos), espessantes (em sopas, pudins, alimentos infantis), sagu, tapioca, como na indústria de papel, têxteis, ligas cerâmicas, cosméticos, medicamentos entre outros (EL-DASH, 1987; VILELA; FERREIRA,

1987). Os teores de amido das raízes da mandioca variam de 20 a 30 % na matéria úmida e de 80 a 90 % na matéria seca (VILELA; FERREIRA, 1987).

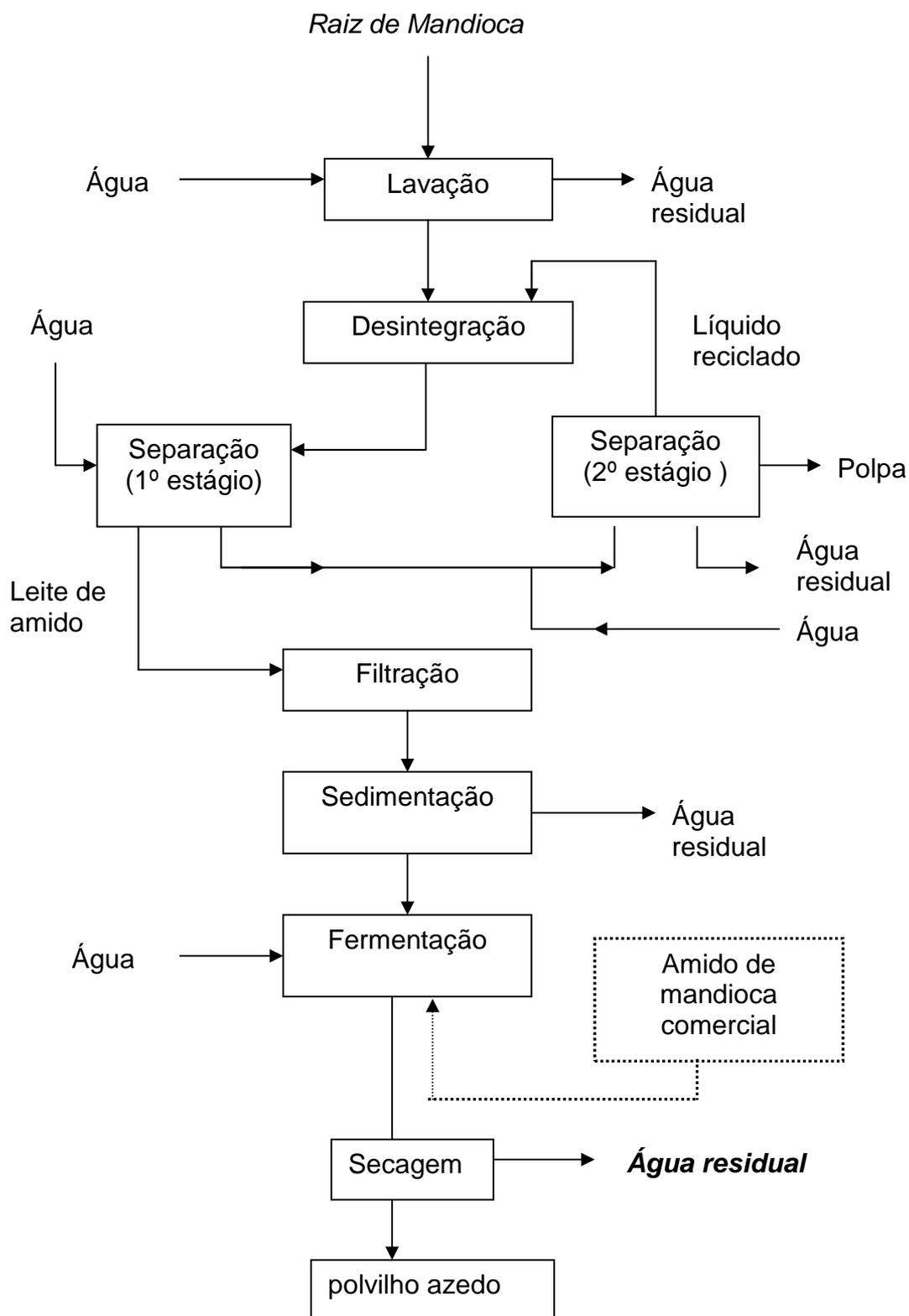
O processo de produção do amido consiste na colheita, lavagem, descascamento, picagem e/ou ralação das raízes, prensagem e tamisação da massa sob água corrente. O bagaço acumulado é eliminado e, a fécula é arrastada pela água e separada desta por decantação em tanques ou por centrifugação. A fécula obtida é então desidratada em secadores de túnel ou *flash-dryer* (VILELA; FERREIRA, 1987).

A fécula fermentada, conhecida como polvilho azedo no Brasil é obtida pela fermentação natural da fécula doce da mandioca (DEMIATE, et al., 1999). A legislação brasileira classifica o polvilho em doce e azedo, tendo como base apenas a acidez titulável, que para alimentos fermentados deve ser no máximo de 5,0 mL de NaOH N/100g (BRASIL, 1978).

O polvilho azedo é um produto tipicamente regional, produzido principalmente nos estados de Minas Gerais, Paraná, São Paulo e Santa Catarina, sendo processado, muitas vezes, por pequenas indústrias rurais (WESTBY; CEREDA, 1994). Este produto é utilizado na fabricação do biscoito de polvilho e pão de queijo. Apesar do baixo teor de proteína sua expansão é excelente (FIGUEROA; DAVILA; POURQUIÉ, 1995).

O processo fermentativo altera o grânulo do amido, conferindo ao polvilho azedo características peculiares, como modificação de sabor e aroma e alteração da sua reologia (PARADA; FABRIZIO; MARTINEZ, 1996; DEMIATE et al., 1999). A atividade microbiana durante a fermentação promove modificações nas propriedades funcionais do amido, que são essenciais para que a massa do biscoito se expanda durante a cocção (RIVERA, 1996)

A produção do polvilho azedo (Figura 3), apresenta basicamente o mesmo processo que a extração da fécula. Após a separação da fécula por decantação, esta é transferida para tanques de fermentação, recobertas por uma camada de água com cerca de 20 cm, onde deve permanecer por um intervalo de tempo de 20 a 60 dias, variando de acordo com as condições climáticas. Considera-se o processo acabado quando há formação de espuma na superfície e formação de bolhas persistentes no interior da massa com desprendimento de forte odor característico, queda rápida do pH e aumento da acidez titulável.



**Figura 3** Processo de produção de amido de mandioca fermentado (adaptado de Marder et al., 1996).

.....Rota alternativa durante a entressafra da mandioca

A secagem é feita ao sol, por um período de 8 a 14 horas, dependendo das condições climáticas (NAKAMURA; MORAES; MARTUCCI, 1976; CEREDA, 1987; WESTBY; CEREDA, 1994; SILVEIRA et al., 2000, 2003). A secagem do polvilho azedo ao sol é essencial para a elevada expansão ao forno e provavelmente se deve a degradação oxidativa (DEMIATE, et al., 2000). A maioria dos produtores inicia o processamento pela raiz da mandioca, no entanto, muitos fermentam o polvilho doce extraído e armazenado durante a safra (CEREDA, 1987; WESTBY; CEREDA, 1994).

O polvilho azedo é tradicionalmente produzido por fermentação natural (DEMIATE, et al., 1999), a partir da microbiota normal presente na fécula de mandioca. O tempo de fermentação é variável e a qualidade do produto é irregular (PARADA; FABRIZIO; MARTINEZ, 1996), sendo impossível obter um produto com as mesmas características, mesmo tendo igual origem (FIGUEIROA, 1991, citado por SILVEIRA, et al., 2000). Segundo Figueroa, Davila e Pourquié (1995), devido à ausência de agitação e aeração e ao alto teor de sólidos (cerca de 50%), condições anaeróbicas prevalecem durante todo o processo.

As diferentes condições climáticas brasileiras selecionam a microbiota predominante nos processos fermentativos, ocorrendo diferenças na acidez e composição de ácidos orgânicos em polvilho azedo produzidos em diferentes estados brasileiros (SILVEIRA et al., 2003). Segundo Cereda (1987), a temperatura de 30°C favorece a fermentação butírica com predomínio do *Clostridium butyricum*, mas em temperaturas de 12 a 20°C a fermentação láctica é favorecida, com predomínio da microbiota láctica, principalmente *Lactobacillus*, bactérias esporulantes Gram positivas e leveduras.

Para acelerar a fermentação e reduzir o tempo de permanência da fécula nos tanques de fermentação, alguns produtores utilizam como inóculo o polvilho da safra anterior deixando os tanques sujos de uma safra para outra ou colocando no fundo do tanque um pouco de fécula fermentada (CEREDA, 1987). No início da fermentação, o amido é a principal fonte de açúcar fermentável e várias cepas de bactérias ácido lácticas isoladas da fermentação natural do amido de mandioca apresentam atividade amilolítica (BRABET et al., 1996; SANNI; MORLON-GUYOT; GUYOT, 2002). O processo fermentativo do amido foi estudado por diversos autores, sendo predominantemente láctica (CÁRDENAS; BUCKLE, 1980;

CARVALHO et al., 1996; PARADA; FABRIZIO; MARTINEZ, 1996; SILVEIRA et al., 2003).

Marcon (2004) desenvolveu um método de fermentação, no qual é adicionado maior quantidade de água e glicose melhorando o processo fermentativo. A adição de glicose na concentração de 0,5 % ao meio de fermentação, contribuiu para duplicar a velocidade de fermentação, passando de 40 dias (sem adição de glicose) para 20 dias (com 0,5 % de glicose).

No processo de fermentação do amido de mandioca, um ambiente ácido é alcançado após 2 ou 3 dias de fermentação. Durante este período o pH diminui de 6,5 para 3,5, permanecendo estável por até 20 dias. O principal ácido orgânico encontrado é o ácido láctico (66 a 82%), o que demonstra o papel das bactérias ácido lácticas no processo, os ácidos remanescentes são ácido acético e butírico (CÁRDENAS; BUCKLE, 1980).

Bangou (1995) citado por Demiate et al., (1999), estudou a fermentação do amido de mandioca a duas diferentes temperaturas, 20 e 35°C, por um período de 15 dias e determinou o conteúdo de ácido láctico e butírico. A 35°C o ácido butírico foi encontrado em maior quantidade (1,38 mg/g), seguida do ácido láctico (0,93 mg/g). A 20°C, ocorreu o contrário, ou seja, o componente em maior concentração foi o ácido láctico (2,47 mg/g).

Demiate et al. (1999), ao analisarem 29 amostras de amido de mandioca fermentado da região sul e sudeste adquiridos diretamente das fábricas ou do comércio, obtiveram os seguintes resultados: das 8 amostras do estado do Paraná, somente uma não apresentou ácido butírico na sua composição; das 11 amostras de Santa Catarina, 6 apresentaram os ácidos típicos do amido de mandioca fermentado (ácidos láctico, acético, butírico e propiônico) e 5 apresentaram ácido láctico e acético ou somente ácido láctico; das 6 amostras de Minas Gerais, 5 apresentaram ácido láctico e acético e, somente uma apresentou ácido butírico em sua composição, demonstrando assim, uma grande heterogeneidade no perfil de ácidos orgânicos obtidos na fermentação do polvilho azedo.

A microbiota encontrada por Cárdenas e Buckle (1980), no amido de mandioca fermentado esteve predominantemente constituída por bastonetes Gram-positivos, identificados como bactérias ácido lácticas, sendo que o *Lactobacillus plantarum* foi o mais comum em várias amostras examinadas, sozinho ou acompanhado do *Lactobacillus casei*. Colônias de leveduras também foram

encontradas, assim como o fungo *Geotrichum cândida*. Uma vez que nenhum inóculo foi acrescentado, estes microrganismos podem estar presentes no ambiente, tanques de fermentação ou em equipamentos.

Figuerola, Davila e Pourquié (1995) identificaram uma sucessão de bactérias durante a fermentação, apresentando inicialmente uma população de cepas heterofermentativas e a segunda população de homofermentativas com predominância do *Lactobacillus plantarum*.

CEREDA (1973) citado por DEMIATE et al. (1999), dividiu a fermentação do amido em três fases distintas. Na primeira fase, os microorganismos responsáveis por estabelecer condições favoráveis à fermentação incluem *Achromobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus* e *Clostridium*. Na segunda fase, aparecem os microrganismos acidogênicos mais exigentes nutricionalmente (microrganismos microaerófilos, facultativos ou anaeróbios estritos). Na terceira fase, aparecem os microrganismos saprófitas e contaminantes como *Bacillus* e alguns fungos. Nesta etapa, ocorre a formação de compostos responsáveis pelo aroma e sabor do polvilho.

Carvalho et al. (1996), ao verificarem as condições de processamento de polvilho azedo relacionaram 590 culturas das quais 23 (3,9 %) perderam a viabilidade de crescimento durante a fermentação. Estes pesquisadores identificaram 567 dos isolados, sendo que 3,1 % eram bactérias gram negativas; 2,2 %, leveduras; 7,8 %, bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Corynebacterium*; 2,4 %, *Staphylococcus* e *Micrococcus*, possivelmente como contaminantes do processo e 80,6 % como bactérias ácido-láticas. Mesmo com o decréscimo do pH do meio de fermentação (6,97 para 3,87), não foi verificada alteração no número de microrganismos totais durante todo o processamento do polvilho azedo (CARVALHO et al., 1996).

A contagem total de microrganismos aeróbios mesófilos, realizadas em duas fecularias em Minas Gerais por Silveira et al. (2003), não sofreram alterações significativas durante a fermentação da fécula (contagem média de  $10^8$  UFC/g), sendo somente observada uma mudança na microbiota devido a diminuição do pH. A microbiota ácido-lática foi predominante, com maior participação do gênero *Lactobacillus*, seguido de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus*.

Parada, Fabrizio e Martinez (1996), estudaram a microbiota de amido de mandioca fermentado na mesma época em dois anos consecutivos de duas pequenas unidades de produção na Colômbia. Os principais microrganismos encontrados foram *Bacillus* sp., *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces*, *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo que nenhum coliforme foi encontrado. No final da fermentação, somente microrganismos ácido-tolerantes sobreviveram. A composição e densidade microbiana das amostras de dois diferentes produtores foram muito semelhantes. O maior produto da fermentação foi ácido láctico (60 a 62%), seguido do ácido acético (5 a 10%) e ácido butírico (0 a 3 %).

Duas novas cepas de *Lactobacillus* homofermentativos e com atividade amilolítica foram isoladas do amido de mandioca fermentada na Colômbia por Morlon-Guyot et al. (1998), denominadas *Lactobacillus manihotivorans*. Ampe (2000), utilizando sondas de hibridização com base em seqüências de rRNA, concluiu que este *Lactobacillus* representava cerca de 20% do total de BAL.

Lacerda (2002), isolaram os seguintes *Lactobacillus* em polvilharias de Minas Gerais: *L. jensenii-similar*, *L. manihotivorans*, em aerobiose e *L. acidophilus* e *L. manihotivorans* em anaerobiose. A espécie heterolática mais freqüente encontrada em aerobiose e anaerobiose foi o *L. plantarum*. As leveduras identificadas foram *Galactomyces geothricum*, *Issatchenkia scutulata* var. *exigua-similar* e *Cândida ethanolica*. As leveduras parecem ter um importante papel na sobrevivência e atividades de bactérias ácido lácticas durante a fermentação da mandioca, pois através da sua atividade amilolítica, estão envolvidas na quebra do amido em açúcares simples, os quais são convertidos pelas bactérias ácido lácticas em ácidos orgânicos (CARDENAS; BUCKLE, 1980; OYEWOLE, 2001).

Mante, Sakyi-Dawson e Amoa-Awua (2003), concluíram em um estudo sobre interações microbianas entre espécies envolvidas na fermentação da mandioca, que a espécie dominante, *L. plantarum* foi capaz de inibir o crescimento de outros *Lactobacillus* e que nenhuma inibição de leveduras foi observada, o que eles atribuem a um provável efeito sinérgico.

## 2.7 Resíduos do processamento da mandioca

As principais formas de processamento da mandioca no Brasil são a farinha de mandioca e extração do amido. A primeira gera principalmente resíduos sólidos, enquanto a segunda, resíduos líquidos. Os resíduos sólidos são a casca marrom, a casca interna, raízes não utilizáveis, farelo, bagaço e restos de farinha. Os resíduos líquidos são gerados durante a prensagem da mandioca para fabricar a farinha e durante a extração do amido e são denominados manipueira. Na extração do amido a manipueira (água vegetal) é diluída pela água utilizada no processo, reduzindo sua carga orgânica e o conteúdo de cianídeos (CEREDA; TAKAHASHI, 1996).

O volume médio de manipueira por fábrica de extração do amido é 3,68 m<sup>3</sup>/t de raízes (CEREDA; TAKAHASHI, 1996; PANDEY et al., 2000;). O conteúdo de cianogênicos tende a ser alto, uma vez que quase todos os glicosídeos cianogênicos da raiz desintegrada são carregados pelas substâncias solúveis e insolúveis em suspensão neste resíduo, variando de acordo com o cultivar. A descarga orgânica, também é alta e varia com o tipo de processamento. Fecularias geram em torno de 600 litros de manipueira diluída por tonelada de mandioca, com menos de 5% de matéria orgânica, 60 ppm de cianeto (CN) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 5000 mg O<sub>2</sub>/L (CEREDA; MATTOS, 1996). Segundo Sobrinho (1975), citado por Cereda e Mattos (1996), o resíduo líquido despejado no solo ou em cursos d'água causa poluição equivalente a produzida por 150 a 250 habitantes por dia. Em Santa Catarina, a poluição causada por estes resíduos corresponde a 460 habitantes por dia (ANRAIN, 1983 citado por CEREDA; TAKAHASHI, 2002).

Lima (2001), avaliando a produção de resíduos por três fecularias localizadas em Santa Rosa do Sul (SC), observou uma variação na produção de resíduos líquidos (água vegetal) de 3768 Kg a 7147 Kg/ton de mandioca processada contendo aproximadamente 11000 mg/L de sólidos totais, 10,5 a 13 mg/L de cianeto e uma demanda química de oxigênio (DQO) de 11864 a 15570 mg/L e (Tabela 5).

**Tabela 5** Composição da água vegetal gerada no processo de produção de polvilho em Santa Rosa do Sul (SC)

Parâmetros	Empresas		
	A	B	C
DQO (mg/L)	14.097	15.570	11.864
N (mg/L)	439,95	443,20	343,20
P(mg/L)	4,93	6,28	0,85
Sólidos totais(mg/L)	11.967	11.692	10.999
CN(mg/L)	10,50	13	11
Sólidos sedimentáveis(mg/L)	74	96	54
PH	4,9	3,7	5,5

Fonte: Lima (2001).

Siller e Winter (1998), relatam que dependendo do teor de glicosídeos cianogênicos da mandioca utilizada na fabricação do amido, a concentração de cianídeos no líquido residual pode chegar até a 200 mg/L.

A presença de cianeto ou compostos cianogênicos na água tem efeito significativo sobre a atividade biológica dos ecossistemas. A maioria das indústrias de processamento de mandioca utiliza como única forma de tratamento, a degradação natural, que consiste no confinamento do efluente sob a ação natural dos seguintes fatores: volatilização de HCN, hidrólise do cianeto livre e complexado, fotodecomposição, precipitação de compostos insolúveis e ação microbiana local. Este processo é lento e acarreta a retenção destes resíduos nestes locais por longo tempo (PANTAROTO; CEREDA, 2001)

A manipueira foi sempre desprezada sem qualquer aproveitamento econômico. Mas, atualmente, tem sido vista como subproduto passível de ser aproveitado em outras atividades (PANTAROTO; CEREDA, 2001)

Conforme Damasceno et al. (2003), alternativas para utilização dos resíduos são necessárias para diminuir a poluição ambiental e aumentar o valor destes resíduos. Pesquisas têm sido realizadas para encontrar aplicações úteis dos efluentes das indústrias de produtos de mandioca. O resíduo líquido pode ser fonte de material bruto para processos fermentativos, como a produção de biomassa lipídica, produção de biogás, ácido cítrico e fertirrigação (PANTAROTO; CEREDA, 2001).

A composição do resíduo líquido de uma indústria de farinha de mandioca em São Paulo, analisada por Damasceno et al. (2003), pode ser visualizada na Tabela 6. Uma das alternativas para a utilização deste resíduo é como substrato para o cultivo de *Geotrichum fragrans*, um microrganismo aeróbio também isolado do resíduo líquido, resistente ao cianídeo. Este microrganismo produz aroma de frutas a partir de compostos voláteis (DAMASCENO et al., 2003). Os compostos voláteis identificados por Damasceno et al. (2003), utilizando este resíduo para o cultivo de *Geotrichum fragrans* após 72 horas de fermentação foram: 1-butanol, 3-metil 1-butanol (álcool isoamílico), 2-metil 1-butanol, 1-3 butanodiol e feniletanol, acetato de etila, propionato de etila, 2-metil etil propionato e ácido 2-metil propanóico

**Tabela 6** Composição do resíduo líquido de uma fábrica de farinha de mandioca (São Paulo)

Componentes	Concentração
pH	5,5
sólidos totais (g/L)	62
Açúcares totais (g/L)	58,2
Açúcares redutores(g/L)	38
Frutose(g/L)	14,9
Glicose (g/L)	22,3
Maltose (g/L)	0,8
Açúcares não redutores(g/L)	20,2
Dextrinas (g/L)	1,5
Sacarose (g/L)	18,7
Nitrogênio total (g/L)	1,6
Fósforo (mg/L)	83,3
Potássio (mg/L)	895
Cálcio (mg/L)	184
Magnésio (mg/L)	173
Enxofre (mg/L)	38
Ferro (mg/L)	8
Cobre (mg/L)	0,8

Fonte: Damasceno et al. (2003)

Cárdenas e Buckle (1980), relatam que na fermentação do amido de mandioca na Colômbia, durante a fermentação, uma camada escura formada na superfície do amido é retirada até a superfície ficar clara. Este resíduo é denominado “Mancha” e consiste de amido e material protéico, sendo utilizado para alimentação animal.

## **2.8 Análise toxicológica**

A Resolução nº16 de 30 de abril de 1999 (BRASIL, 1999) define como alimentos novos e/ou novos ingredientes, os alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no País, ou alimentos com substâncias já consumidas, e que, entretanto venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos alimentos utilizados na dieta regular e estabelece a exigência de comprovação de segurança de uso através de ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação, ensaios bioquímicos, entre outros.

Os estudos de toxicidade são geralmente divididos em três categorias: estudos de toxicidade aguda, envolvendo a administração de uma dose única da substância teste ou diversas administrações em um período de 24 horas; estudos sub-agudos e subcrônicos, onde repetidas administrações são feitas em um período correspondente a 10 % da vida média da espécie animal utilizada (3 meses no rato) e estudos crônicos cujo período de experimentação envolve a vida toda do animal ou a maior fração dela (24 meses no rato) (BRITO, 1994; LU, 1996).

Os estudos de toxicidade aguda são utilizados para uma avaliação toxicológica preliminar, fornecendo informações sobre os riscos resultantes de uma exposição de curta duração e para a determinação da dose letal mediana ( $DL_{50}$ ), isto é, a dose necessária (mg/kg de peso) da substância em estudo para provocar a morte de 50 % dos animais submetidos ao teste. Estes estudos também servem de guia para as doses a serem utilizadas em estudos mais prolongados (BRITO, 1994; LU, 1996, BARLOW, et al., 2002).

Os animais utilizados para os testes de toxicidade aguda são o rato e o camundongo, macho e fêmea, jovem ou adulto, em número não inferior a 10 para cada dose experimental (BRITO, 1994; LU, 1996). Segundo LU (1996), quando os valores de  $DL_{50}$  forem muito diferentes nestes dois animais e quando o padrão ou

taxa de biotransformação é significativamente diferente em humanos, é desejável realizar o teste com uma espécie não roedora.

Geralmente, a via de administração da substância tóxica a ser utilizada deve ser a mesma via a que o ser humano estará exposto. A via oral é a mais utilizada, apesar de apresentar desvantagens, pois a substância em estudo pode não ser totalmente absorvida e os compostos ativos podem ser seqüestrados pelo fígado. A substância teste é administrada em dose única por gavagem, utilizando-se sonda gástrica ou cânula apropriada (LU, 1996).

A dose a ser administrada de uma só vez, depende da espécie e do porte dos animais utilizados. Para roedores, quando a via escolhida for oral ou intraperitoneal, esse volume não deve exceder 1mL/100g de peso corporal, para o caso de substâncias aquosas (BRITO, 1994).

Após a administração da substância teste, além de avaliar o número de mortes para o cálculo da  $DL_{50}$ , é muito importante avaliar os sintomas de toxicidade gerais, efeito sobre a locomoção, comportamento, respiração, entre outros (LU, 1996).

O período de observação usualmente é de 7 a 14 dias, mas depende das condições dos animais. Se estes demonstrarem muito sofrimento devem ser sacrificados. Todos os animais, inclusive os que morrerem durante o teste ou foram removidos devem ser submetidos à necropsia (BRITO, 1994; LU, 1996; OECD, 2001). Necropsia e análise histopatológica pode indicar os órgãos alvos da toxicidade, auxiliando nos testes subseqüentes (BARLOW, et al., 2002).

Como os seres humanos estão mais freqüentemente expostos a níveis muito menores do que as doses que causam toxicidade aguda e por longos períodos, os estudos de dose repetida ou toxicidade subcrônica fornecem dados mais realistas de toxicidade (LU, 1996; BARLOW, et al., 2002). O objetivo principal deste teste é determinar os efeitos da exposição diária a um alimento ou substância química durante períodos de um mês ou mais (BARLOW, et al., 2002).

Nos estudos, realizados após a obtenção dos dados de toxicidade aguda, é avaliado o peso corpóreo dos animais, consumo de alimentos, observações da aparência e comportamento, testes laboratoriais, análises patológicas e histológicas (LU, 1996), por um período experimental de 28 ou 90 dias (BRITO, 1994; LU, 1996; OECD, 2001; BARLOW, et al., 2002).

## 2.9 Tecnologia Limpa e o processamento de alimentos

A consideração com os resíduos industriais vem crescendo nos últimos anos, principalmente devido aos alertas ambientais que a natureza tem oferecido. Em 1992, no Rio de Janeiro, representantes de todo o mundo estiveram reunidos, na Rio 92, para traçar ações mais efetivas para a manutenção da qualidade ambiental do planeta (JORDAN, 1994).

Novos projetos industriais, obrigatoriamente, consideram o programa de minimização de resíduos tão importantes quanto o próprio processamento do produto alvo. Para a indústria de alimentos, as obrigações não são diferentes (AMANTE, 1997). A maioria dos projetos que visam a minimização do impacto ambiental realiza tratamento de resíduos, empregando as chamadas *end-of-pipe technologies*. Porém, a prática tem mostrado, que muitos resíduos sólidos, suspensos ou solúveis nos efluentes industriais, podem servir de matérias-primas. Adicionalmente, o comportamento dos envolvidos com o processo, pode contribuir para sistemas, mesmo antigos, porém, repensados sob o ponto de vista do desperdício, que culmina com poluição (AMANTE, 1997).

Sob os conceitos da Tecnologia Limpa (*Cleaner Technology*) ou Produção Limpa (*Cleaner Production*), cada etapa do processo é analisada, chegando aos resíduos gerados e às suas características para utilização como matérias-primas em outros produtos (HUISINGH; BAAS, 1991).

As pequenas empresas, tais como as processadoras de polvilho azedo, não devem ficar fora destas tendências. Cardoso, (2005), indica as vantagens e desvantagens para o emprego da manipueira na agricultura. No entanto, devido à pequena quantidade liberada, as águas sobrenadantes da produção do polvilho azedo, não têm sido alvo de pesquisas.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 Material**

O amido de mandioca utilizado para a fermentação em laboratório, foi obtido das fecularias de Rio do Sul e Tubarão (Santa Catarina). A água da fermentação industrial foi coletada em uma polvilharia de Santa Rosa.

### **3.2 Obtenção da água de fermentação do amido de mandioca em Laboratório**

Amido de mandioca foi submetido à fermentação natural em triplicata, com a adição de 0,5% de glicose em relação ao leite de amido, conforme Marcon (2004), em recipientes plásticos, contendo 6,4 Kg de amido, 24 litros de água e 140 g de glicose. O índice de acidez e o pH foram medidos diariamente até que atingissem a acidez mínima de 2 mL de NaOH N/100mL. Esta água foi então removida, filtrada em pano dessorador, envasada em garrafas de vidro, fechadas com rolhas de cortiça e armazenadas sob refrigeração em disposição aleatória para posterior análise.

As águas residuais das polvilharias, foram coletadas ao término da fermentação, conforme o produtor, em triplicata, filtradas e armazenadas da mesma forma que as águas obtidas em laboratório. O pH e a acidez foram medidos no prazo máximo de 24 horas.

### **3.3 Caracterização química da água de fermentação do amido de mandioca em laboratório**

A determinação do pH foi realizada com pH-metro (Pocket Ad 110 pH) e o índice de acidez calculado em mL de NaOH N por 100 mL e em gramas de ácido láctico por 100 mL (AOAC, 1998), lipídios, proteínas, cinzas e sólidos totais foram determinados conforme metodologia descrita na AOAC (1998). A determinação de

sólidos totais foi realizada através de secagem em estufa a 60°C até peso constante e os carboidratos totais determinados por diferença.

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi determinada pelo método de refluxo conforme metodologia recomendada pela APHA (1995), para análise de água e água residual.

A concentração de HCN foi determinada através método colorimétrico de leitura visual utilizando o Kit CHEMets® cianeto K-3810 (CHEMetrics) baseado no procedimento ácido isonicotínico/ácido barbitúrico (NAGASHIMA,1981). Cloro é adicionado a uma amostra que tenha sido tamponada para pH 6. O cloreto resultante reage com ácidos para formar uma cor azul. Os resultados são expressos em mg/L (ppm) CN, sendo que a faixa de detecção de CN deste método é de 0 a 1 ppm.

O teor de açúcares redutores foi determinado pelo método espectrofotométrico do ácido 3, 5 dinitrossalicílico (DNS) (VILELA; BACILA; TASTALDI, 1973).

As fermentações, as coletas e as análises das águas residuais foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média e desvio padrão.

### **3.4 Análises Microbiológicas**

As amostras industriais foram coletadas diretamente dos tanques de fermentação, em frascos esterilizados, em uma polvilharia de Santa Rosa, localizada no Sul de Santa Catarina quando indicado pelo produtor como término da fermentação e mantido sob refrigeração por no máximo 24 horas para análise. As amostras da fermentação em laboratório foram coletadas diretamente das cubas de fermentação ao término da fermentação e incubadas em meio apropriado.

A contagem de bactérias mesófilas, bactérias lácticas, bolores e leveduras do líquido sobrenadante no final da fermentação, foi realizada através de metodologia descrita pela APHA (2001). A contagem de bactérias ácido lácticas foi realizada em agar MRS (De Man, Rogosa & Sharp Agar, Biolife Italiana Srl) em jarro sob anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) temperatura de 32°C por 48 horas, bactérias mesófilas aeróbias em ágar padrão para contagem - PCA (Plate Count Agar, Oxoid CMO 325), em aerobiose a temperatura de 32°C por 48 horas e a contagem de

bolores e leveduras em Agar Dextrose Batata (Potato Dextrose Agar, Oxoid CMO 139), acidificado com ácido tartárico, em aerobiose a 25°C por 3 a 5 dias.

Para identificação das bactérias ácido lácticas, as colônias foram isoladas, e purificadas em Agar MRS e diferenciadas em grupos através de microscopia, reação de gram, teste de catalase, motilidade, produção de gás de glicose. Os lactobacilos foram identificados através do Kit Api 50 CHL (Biomerieux).

Para avaliar a ocorrência de diferença significativa no número de bactérias lácticas, mesófilas e bolores e leveduras, entre as diferentes fermentações, foi realizada análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

### **3.5 Análise de micotoxinas**

Para verificar a presença de micotoxinas na água de fermentação foi utilizado o método de análise de multitoxinas por cromatografia de camada delgada conforme Soares e Rodriguez-Amaya (1989), cujo limite de detecção é de 2 µg/Kg para Aflatoxinas, 5 µg/Kg para Ocratoxina A e 55 µg/Kg para Zearalenona. As análises foram realizadas em triplicata no Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares da Universidade Federal de Santa Catarina

### **3.6 Teste de toxicidade**

#### **3.6.1 Animais**

Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina sob protocolo nº 302/CEUA e 23080.016129/2004-24/UFSC. Camundongos (*Mus musculus*), fêmeas, pesando entre 24 e 28 g e ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) pesando entre 60 e 75 g, de ambos os sexos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e os experimentos realizados no Laboratório de Nutrição Experimental da mesma Universidade. Os animais foram mantidos por uma semana em grupos de 3-5 animais, em gaiolas de polipropileno de 410 mm x 340 mm x 180 mm, com uma grade de cobertura em aço inox e forradas com maravalha,

recebendo água e ração comercial (Nuvilab CR-1, Nuvital®) à vontade, em ambiente climatizado (22 a 24°C, iluminação artificial, com ciclo claro/escuro de 12 horas).

### **3.6.2 Toxicidade aguda**

Para os ensaios de toxicidade aguda, camundongos foram divididos em dois grupos de seis animais, sendo que um grupo (grupo teste) recebeu a água residual da fermentação do amido de mandioca proveniente de Rio do Sul obtida em laboratório, concentrada por liofilização, via gavagem, na dose de 5 g por quilograma de peso, veiculada em água destilada e outro grupo (grupo controle) recebeu, também por gavagem, água destilada no mesmo volume administrado ao grupo teste. Após a aplicação, os animais foram mantidos em grupos de três animais, em gaiolas de polipropileno, permanecendo em jejum nas primeiras quatro horas. Os sinais clínicos de toxicidade (alteração de pêlos, pele e mucosas, comportamento; tremores, diarreia, convulsões, respiração, cianose, etc), foram observados em intervalos de cinco e 30 minutos, uma, duas, quatro e vinte e quatro horas e a cada 24 horas por 14 dias após a administração do produto. Após este período os animais foram submetidos à eutanásia, em sala isolada, em câmaras de saturação com éter e o fígado retirado e pesado (BRITO, 1994).

### **3.6.3 Toxicidade subcrônica ou dose repetida - 28 dias**

Após uma semana de aclimação os ratos foram distribuídos em quatro grupos de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas), alocados individualmente em gaiolas metabólicas de aço inoxidável recebendo oralmente a água extraída do processo de fermentação do amido de mandioca, em três concentrações diferentes, 0 % (somente água), 25 %, 50 % e 100% do produto, diluídas em água potável e ração comercial à vontade durante 28 dias. O peso corporal foi registrado no início do experimento e semanalmente durante todo o período experimental. O consumo de alimentos foi medido duas vezes por semana e de líquido diariamente e calculados como consumo médio diário por rato. O comportamento e sinais clínicos foram observados diariamente durante todo o experimento. No final do experimento, após jejum de 16 horas, os animais foram anestesiados com éter etílico e amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca, para análises bioquímicas e

hematológicas. Os animais foram então sacrificados através de inalação de éter etílico e submetidos a uma autópsia geral. Os órgãos: fígado, rim esquerdo, coração, baço e pulmão foram retirados e pesados (OECD, 1995; BRITO, 1994).

#### **3.6.4 Parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Os seguintes parâmetros hematológicos foram medidos em amostras de sangue coletadas utilizando EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) como anticoagulante: leucócitos (LEU), eritrócitos (ERI), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLQ), volume médio de plaquetas (VMP), linfócitos (LIN), monócitos (MON), neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS), basófilos (BAS). Todos os parâmetros foram medidos em um analisador hematológico de 26 parâmetros automatizado ABX PENTRA 120 (HORIBA ABX Diagnostics). As análises do tempo de ativação da protrombina (TAP) foram feitas em amostras de sangue coletadas em tubos contendo citrato de sódio como anticoagulante utilizando analisador automatizado de coagulação sanguínea Sysmex® CA-1500 (Sysmex America, Inc.).

Medidas de colesterol (CHOL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos (TGL), creatinina (CREA), fosfatase alcalina (ALP), glicose (GLU), aspartato transaminase (AST), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais (PT), albumina (ALB), sódio (Na), potássio(K), cloreto (Cl) foram determinadas no soro após a centrifugação (2500 rpm por 15 minutos) das amostras de sangue, utilizando um sistema de química clínica DADE Dimension® RXL(Dade International Inc.).

Todas as análises sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina.

#### **3.6.5 Análise histológica**

Para avaliação histológica, foram retirados fragmentos de intestino delgado de 2 cm de comprimento, em ponto localizado a 5 cm distalmente ao ângulo de TREITZ. As peças retiradas foram imersas em solução aquosa de cloreto de sódio a 0,9% e fixadas em solução de formol a 10%. A seguir, as peças foram

submetidas ao processo de inclusão em parafina, seccionadas em micrótomo para obtenção de cortes histológicos de 10  $\mu\text{m}$  de espessura segundo um mesmo plano de corte transversal. As lâminas foram coradas empregando-se o método da Hematoxilina-Eosina. A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico convencional, utilizando-se objetiva de 4x e 10x. Os parâmetros de análise histopatológica utilizados foram ausência ou presença de lesão tecidual, tais como: perda de revestimento epitelial (lesão leve); presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria da mucosa (lesão moderada); destruição das vilosidades intestinais com presença de infiltrado inflamatório (lesão intensa).

### **3.6.6 Análise estatística**

Todos os resultados do teste de toxicidade são apresentados como média e desvio padrão. O ganho de peso e o peso do fígado dos camundongos no teste de toxicidade aguda foram analisados através do teste t de Student. A comparação entre os grupos do teste subaguda foram feitas através de análise de variância (ANOVA) de uma via, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ , com pós teste de Dunnett para comparação com o controle. Para verificação das suposições do modelo foram utilizados a análise de resíduos e o teste de Bartlett. Quando ocorreu heterogeneidade de variâncias foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Composição química da água residual da fermentação do amido de mandioca

A fermentação do amido de mandioca pode ocorrer com baixo nível de água ou com água em excesso, ou seja, uma camada de água de 20 cm aproximadamente. A adição de excesso de água é prática comum nas indústrias de polvilho azedo do Brasil e da Colômbia (CARDENAS ; BUCKLE, 1980), no entanto algumas indústrias utilizam-na apenas para iniciar o processo, apesar desta prática comprometer a qualidade do polvilho azedo, devido à distribuição heterogênea dos microrganismos envolvidos na fermentação.

A água residual da fermentação do amido de mandioca apresentou pobre composição, quando comparada à do processo de extração do amido de mandioca. A Tabela 7 apresenta a composição da água residual da fermentação do amido de mandioca obtido neste estudo.

**Tabela 7** Sólidos totais, cinzas e nitrogênio total na água residual da fermentação do amido de mandioca.

Fécula	Sólidos totais (mg/L)	Cinzas (mg/100mL)	N total (mg/100mL)
Rio do Sul	1.700 ± 500	7,00 ± 2,00	1,00 ± 0,01
Santa Rosa	6.000 ± 100	65,00 ± 3,00	-
Tubarão	3.600 ± 600	19,00 ± 1,00	1,30 ± 0,01
Tubarão + Rio do Sul	2.200 ± 300	19,00 ± 1,00	0,60 ± 0,10

Enquanto a manipueira apresenta teores de sólidos totais entre 5.800 e 56.460 mg/L, de acordo com Lamo e Menezes (1979) (Tabela 8), a água residual da fermentação do polvilho azedo estudada neste trabalho apresentou valores entre 1700 e 6000 mg/L (Tabela 7). A avaliação da Demanda Química de Oxigênio revelou que a água da fermentação do amido de mandioca apresentou valores de 5.186,8 a 7204,1 mg/L, o que está próximo dos valores mínimos encontrados para a manipueira, conforme pode ser observado na Tabela 8. Os valores médios para açúcares redutores foram  $2,75 \pm 0,56$  mg/100g, próximos ao limite inferior dos valores publicados para os efluentes de fecularias, apresentados na Tabela 8.

**Tabela 8** Composição média da água residual da extração do amido de mandioca.

pH	3,8 – 5,2
Volume (m <sup>3</sup> )	10 a 13
Acidez em ácido láctico (g/100 mL)	ND
Sólidos totais (mg/L)	5.800 – 56.460
DQO (mg/L)	6.280 – 51.200
DBO (mg/L)	1.400 – 34.300
Nitrogênio Total (mg/L)	140 – 1.150
Minerais (mg/L)	350 - 800
Açúcares redutores (mg/100g)	2,30 – 8,20

Adaptado de Lamo e Menezes (1979) ND – não determinado.

Não foi detectado ácido cianídrico nestas águas residuais com a metodologia utilizada, uma vez que a fermentação em laboratório foi realizada a partir do amido de mandioca comercial e praticamente todo o ácido cianídrico é eliminado durante a extração do amido (CEREDA, 2001). Além disso, diversos autores relataram a eliminação deste composto nos processos de fermentação da mandioca (AMOA-AWUA; APPOH; JAKOBSEN, 1996; ONABOLU et al., 2002, OBILIE; TANO-DEBRAH; AMOA-AWUA, 2004).

Os resultados das diferentes condições de fermentação realizadas neste estudo e a respectiva acidez em mL de NaOH N/100mL e a correspondente concentração de ácido láctico (gramas de ácido láctico/100mL) estão apresentados na Tabela 9. Ressalta-se que as fermentações realizadas em laboratório foram mais

rápidas, devido ao uso da fermentação modificada segundo Marcon (2004) enquanto o da indústria ocorreu pelo método tradicional, sem o emprego de xarope de glucose.

O pH variou de 3,0 a 3,7 e a acidez de 0,19 a 0,62 g de ácido láctico /100mL. A água residual obtida na polvilharia de Santa Rosa com 30 dias de fermentação foi a que apresentou maior acidez, e o menor pH ocorreu na fermentação do amido procedente de Rio do Sul. No entanto, o pH não parece estar relacionado com o tempo de fermentação, uma vez que as fermentações de 11 (Rio do Sul) e 12 (Tubarão) dias apresentaram pH de 3,4 e 3,8 respectivamente.

**Tabela 9** Origem da fécula, época do ano, tempo de fermentação acidez e pH da água de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo.

Fécula	Local de fermentação	Época do ano	Tempo de fermentação (dias)	Acidez (mL NaOH N/100mL)	Acidez (g ácido láctico/100mL)	pH
Rio do Sul	LFH	abril	17	2,79 ± 0,15	0,25 ± 0,013	3,0 ± 0,06
Rio do Sul	LFH	out	17	2,60 ± 0,27	0,23 ± 0,024	3,2 ± 0,12
Santa Rosa	Polvilharia	maio	22	3,17 ± 0,47	0,28 ± 0,43	3,4 ± 0,06
Santa Rosa	Polvilharia	julho	30	6,85 ± 0,26	0,62 ± 0,24	3,2 ± 0,03
Tubarão	LFH	out	12	2,54 ± 0,34	0,22 ± 0,032	3,4 ± 0,0
Rio do Sul	LFH	fev	11	2,51 ± 0,53	0,22 ± 0,047	3,7 ± 0,06
Tubarão + Rio do sul	LFH	fev	17	2,11 ± 0,13	0,19 ± 0,012	3,2 ± 0,17

LFH = Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças

O acompanhamento do processo de produção do polvilho azedo, pelo método tradicional e com glicose, realizado por Marcon (2004), indicou intensa redução do pH nos quatro primeiros dias de fermentação, com reduções menores até a estabilização, entre o décimo e o décimo terceiro dia de fermentação, variável segundo a origem da fécula em fermentação. Esta variação entre diferentes amidos também foi encontrada por outros autores (CEREDA; LIMA, 1981; CEREDA, 1987, 1993; CEREDA; BONASSI, 1985; CEREDA; GIAJ-LEVRA, 1987; ASCHIERI; VILELA, 1995; SRIROTH et al., 1999; DEMIATE et al, 1999; CHATAKANONDA et al., 2003).

Segundo Marcon (2004), ao contrário do ocorrido com o pH, o valor de acidez titulável na água de fermentação aumenta, ocorrendo variações entre o tempo de fermentação e o índice de acidez sendo, então, utilizado um índice de acidez de 2 mL de NaOH N como padrão para determinar o final da fermentação.

A acidez e o pH das águas da fermentação do amido de mandioca estão de acordo com os valores da literatura. Cárdenas e Buckle (1980), acompanharam a acidez das águas do processamento do polvilho azedo, obtendo valores de acidez em ácido láctico ao redor de 0,42 e 0,64 g/100 mL. Demiate et al. (1999) encontraram valores entre 0,013 e 0,813 g/100g para o polvilho azedo, enquanto para este trabalho a acidez determinada para as águas residuais esteve entre 0,19 e 0,62 g/100 mL. De acordo com Cereda et al. (2003), variações na acidez são atribuídas aos processos de fermentação não controlados que predominam na obtenção do polvilho azedo.

Demiate et al. (1999) analisando 30 amostras de polvilho azedo encontraram uma predominância de ácido láctico, variando de 38,2 a 100 % dos ácidos orgânicos analisados. Outros ácidos orgânicos encontrados em menores concentrações foram: acético, propiônico e butírico. A proporção de 38,2 % de ácido láctico encontrado por Demiate et al. (1999), foi uma exceção. Em todas as outras 29 amostras analisadas, o ácido láctico representou uma proporção superior a 67,2 %. Portanto, considera-se que o ácido láctico é responsável por cerca de 50 % da acidez das águas residuais da produção do polvilho azedo. As amostras estudadas pelos autores foram amostras de polvilho azedo e não das águas da fermentação, objetivo deste trabalho. A concentração de ácido láctico no polvilho azedo é geralmente mais alta comparativamente às águas estudadas. Considerando os resultados para o conteúdo de ácidos orgânicos da fermentação do amido encontrados na literatura, as águas da fermentação do polvilho azedo, por solubilizarem estes ácidos, podem representar uma alternativa para a produção do ácido láctico.

A fermentação do amido tem sido estudada em condições controladas para a produção de ácidos orgânicos, por vários pesquisadores (ALTAFF; NAVEENA; REDDY, 2007; ANURADHA; SURESH; VENKATESH, 1999; JOHN; NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2006). John, Nampoothiri e Pandey (2006), descreveram que um dos principais obstáculos para a produção do ácido láctico em grande escala está no custo das matérias-primas. Os autores empregaram resíduos da indústria do açúcar e do amido de mandioca para produzir ácido láctico através de fermentação semi-

sólida, usando *Bacillus delbrueckii* como inóculo, produzindo aproximadamente 250 mg de ácido láctico por grama de sólidos em um processo otimizado de fermentação, com um coeficiente de conversão maior do que 99 % do açúcar total disponível para ácido láctico.

Através de sacarificação e fermentação simultânea, Anuradha, Suresh e Venkatesh (1999), obtiveram produtividade de 1,21 g/L de ácido láctico usando 250 g/L de amido de batata no meio de cultura. Altaf, Naveena e Reddy (2007), produziram ácido láctico de amido de lentilha vermelha como fonte de carbono e obtiveram, sob condições controladas, 13,5 g de ácido láctico/15,2 g de amido.

É importante considerar que os trabalhos descritos foram desenvolvidos em processos de fermentação controlados para a produção do ácido láctico, enquanto os ácidos orgânicos produzidos na fermentação do polvilho azedo não são valorizados como produtos, são considerados como carga orgânica poluente em um efluente industrial.

Os resultados apresentados na Tabela 10 comparam a produção do ácido láctico sob condições controladas, no polvilho azedo e nas águas residuais do seu processo de produção.

**Tabela 10** Produção do ácido láctico usando amido como fonte de carbono em condições controladas e em fermentação natural

Fermentação	Matéria-prima	Produtividade (mg ácido/g matéria seca)	Referência
Controlada	Amido de batata	756	Anuradha et al. (1999)
	Farinha de lentilha vermelha	890	Altaf et al. (2007)
	Bagaço de cana e de mandioca	240	John et al. (2006)
Fermentação do amido de mandioca, não controlada	Amido de mandioca	4,0	Demiante et al. (1999)
*Água residual da fermentação do amido de mandioca, não controlada	Amido de mandioca	15,04	Trabalho atual

\*Tanque de fermentação 26,66 g de amido por 100 mL de água [15,04 = (0,19+0,62)/2/26,66]; 0,19 e 0,62 – Dados da Tabela 9.

A produtividade de 15,04 mg de ácido láctico/g de amido obtido em laboratório foi pequena, 1,5 %. Esta baixa percentagem de bioconversão é devido à hidrólise natural do amido, sendo pequena a quantidade de açúcar resultante da ação das enzimas amilolíticas quando comparada às fermentações controladas, realizadas com meio MRS com açúcares diretamente fermentescíveis, onde podem ser registrados rendimentos de até 78 % (OHKOUCHI; INOUE, 2007). Porém este ácido não representa o único produto da fermentação. Outros ácidos orgânicos como o propiônico, butírico e acético são típicos para este tipo de fermentação (DEMIATE et al., 1999), apesar de não estarem sendo considerados nesta oportunidade.

Publicações recentes (DING; TAN, 2006; SINGH et al., 2006) tratam de fermentações controladas, o que contrasta com a produção natural do ácido láctico a partir das águas da fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo.

Comparativamente às outras fontes de carbono (Tabela 10), o amido de mandioca utilizado no processo fermentativo para a produção do polvilho azedo, dentre os trabalhos publicados, apresenta o menor rendimento em ácido láctico. No entanto a concentração é maior na água residual do que o encontrado no trabalho de Demiate et al. (1999) no polvilho azedo, o que pode indicar estudos posteriores devido à presença deste importante aditivo químico nas águas residuárias do processo de produção do polvilho azedo, ainda considerado como poluente orgânico.

O uso industrial da água nos tanques de fermentação está em torno de 0,12 m<sup>3</sup> por tonelada de amido. Considerando a produção do polvilho azedo em regiões específicas, com uma grande concentração de pequenas unidades industriais na Argentina, Colômbia, Equador, Paraguai e Brasil, o uso destas águas residuais poderia ser estudado para novas aplicações e oportunidades para aumentar a renda de pequenas empresas. Pequenas indústrias poderiam fornecer as águas residuais como matéria-prima para novas unidades com tecnologias adequadas para a exploração dos ácidos orgânicos destes efluentes.

De acordo com Chuzel (2001), a produção anual de polvilho azedo no Brasil está em torno de 22.000 a 24.000 toneladas, com algumas unidades processando de 2 a 5 toneladas de raiz e outras 100 toneladas por dia. A perda média diária de ácido láctico como poluente por tonelada de polvilho azedo produzido está em 15,04 kg. As águas residuais de uma região produtora poderiam justificar futuros estudos

técnicos e econômicos com a finalidade de conversão deste resíduo em matéria-prima na produção de ácidos orgânicos.

Adicionalmente aos ácidos orgânicos, apesar da baixa concentração dos sólidos totais, as células microbianas e os demais compostos presentes nas águas devem ser investigados com o interesse na conversão desta água residual em um novo produto para as polvilharias. O polvilho azedo poderia ser produzido em uma indústria com base biotecnológica, transformando o atual processo empírico em um processo adequado para a utilização completa dos derivados, sem geração de resíduos.

Sob o ponto de vista da concentração de material orgânico, efluentes agroindustriais têm sido considerados materiais indesejáveis, no entanto poucos efluentes têm sua composição estudada, de modo que sólidos solúveis e insolúveis analisados sob os conceitos das Tecnologias Limpas, da valorização e minimização de resíduos, possam ser convertidos em matérias-primas. De acordo com este trabalho, as águas residuais da produção do polvilho azedo devem ser estudadas, contribuindo para novas oportunidades de negócios para as agroindústrias.

As bactérias lácticas estão sendo associadas a alimentos benéficos à saúde humana (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004; RAKIN et al., 2007). Esta tendência indica a necessidade de estudos de caracterização microbiológica de materiais produzidos através da fermentação láctica tais como o polvilho azedo.

## **4.2 Análises microbiológicas**

A contagem de bactérias em meio MRS (BAL) e em PDA (bolos e leveduras), em log UFC/mL das amostras de águas residuais das diversas fermentações de amido de mandioca realizadas em laboratório (Rio do Sul, Tubarão e Tubarão + Rio do Sul) e obtidas em uma polvilharia (Santa Rosa), o respectivo tempo de fermentação (dias) e acidez (% ácido láctico) são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11** Tempo de fermentação (TF), acidez, pH e contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias mesófilas e bolores e leveduras da água residual da fermentação do amido de mandioca.

Origem	TF (dias)	Acidez (g/100mL ácido lático)	pH	BAL (UFC/mL)	Bactérias Mesófilas (UFC/mL)	Bolores e leveduras (UFC/mL)
Rio do Sul	17	0,23 ± 0,024	3,3	5,27 <sup>a</sup>	6,92	6,99
Santa Rosa	30	0,62 ± 0,24	3,2	7,84 <sup>b</sup>	8,02	5,92
Tubarão	12	0,22 ± 0,032	3,4	7,73 <sup>b</sup>	n.d.	5,56
Rio do Sul	11	0,22 ± 0,047	3,8	5,80 <sup>a</sup>	6,57	6,15
TB+ RS*	17	0,19 ± 0,012	3,3	7,59 <sup>b</sup>	6,39	6,37

Letras diferentes na mesma coluna diferem a  $p < 0,05$  (Teste Tukey)

\*Mistura de féculas de Tubarão e Rio do Sul

n.d.: não determinado

O número de bactérias lácticas ao final da fermentação variou de 5,27 a 7,84 log UFC/mL, sendo que a população de bactérias foi maior na fermentação com fécula de Santa Rosa, Tubarão e no “pool” Tubarão e Rio do Sul (TB+Rio do Sul). A água residual de Santa Rosa teve um período de fermentação maior que as fermentações desenvolvidas em Laboratório, além de uma maior concentração de ácido Láctico (0,62g/100mL), no entanto, a contagem de bactérias lácticas da água residual foi semelhante às águas das fermentações de Tubarão e TB+Rio do Sul, cujo tempo de fermentação foi de 12 e 17 dias e a acidez em torno de 0,20 (g de ácido Láctico/100 mL). A contagem de bolores e leveduras foi semelhante entre as diferentes águas das fermentações.

A contagem elevada de bactérias mesófilas pode indicar falta de condições higiênico – sanitárias durante a fermentação, mas segundo Lacerda (2002), estes números podem representar mais a microbiota total, uma vez que o meio de cultura utilizado (PCA), possibilita o crescimento de diversos microrganismos. O crescimento de bactérias lácticas, leveduras e *Bacillus* sp foi observado neste meio (AMOA-AWUA, JAKOBSEN, 1995; CARVALHO et al., 1996,).

Os trabalhos encontrados na literatura (CARDENAS, BUCKLE, 1980; CARVALHO et al., 1996; LACERDA, 2002) relatam contagem total de bactérias lácticas no amido fermentado em torno de  $10^8$  UFC/g durante todo o processo fermentativo.

Lacerda (2002), monitorou as fermentações de amido de mandioca de duas polvilharias na Região de Conceição dos Ouros (MG), 45 dias na polvilharia A e 29 dias na polvilharia B e obteve contagens de bactérias lácticas de  $10^6 - 10^7$  UFC/g, na pasta de amido fermentado, mesmo com tempo de fermentação diferentes. Neste estudo também observaram que a contagem de bolores e leveduras, em torno de  $10^5$  UFC/g, reduziu após 14 dias de fermentação em uma das polvilharias e após 25 dias na outra, sendo que nessa polvilharia a contagem de bolores e leveduras aumentou após 40 dias de fermentação.

No presente estudo a contagem de bactérias lácticas e bolores e leveduras foram realizadas na água residual da fermentação diferentemente dos trabalhos citados acima. Podemos observar que a contagem de microrganismos foi semelhante à obtida no amido fermentado.

A fermentação do amido de mandioca para produção de polvilho azedo é tradicionalmente realizada a partir da microbiota natural presente no amido de mandioca. Esta microbiota é constituída principalmente por bastonetes gram-positivos, identificados como bactérias lácticas, homo e heterofermentativas com predominância do *Lactobacillus plantarum* (CARDENAS, BUCKLE, 1980; FIGUEROA; DAVILA; POURQUIÉ, 1995; CARVALHO et al., 1996; PARADA; FABRIZIO; MARTINEZ, 1996; SILVEIRA et al, 2003; LACERDA, 2002).

Colônias da água da fermentação do amido de mandioca proveniente de Rio do Sul (RS) realizada no Laboratório, e da água obtida na polvilharia de Santa Rosa (SR) com 17 a 22 dias de fermentação isoladas em agar MRS foram identificadas como cocos ou bastonetes gram-positivos, catalase negativas, homo e heterofermentativos (Tabela 12).

**Tabela 12** Características bioquímicas das colônias isoladas da água de fermentação do amido de mandioca.

Amostra	Colônias	Formação de gás da glicose	catalase	Gram	Morfologia
RS 1	2	positivo	negativo	positivo	cocobacilos
RS 2	1	positivo	negativo	positivo	cocobacilos
SR1	4	negativo	negativo	positivo	cocobacilos
SR2 1	1	negativo	negativo	positivo	bastonetes isolados ou diplo
SR2 1	4	negativo	negativo	positivo	bastonetes isolados e agrupados
SR2 2	1	negativo	negativo	positivo	bastonetes + finos e compridos
SR2 2	2	negativo	negativo	positivo	bastonetes finos e agrupados
SR2 2	3	negativo	negativo	positivo	bastonetes isolados e agrupados
SR2 3	1	negativo	negativo	positivo	bastonetes em cadeia
SR2 3	2	negativo	negativo	positivo	bastonetes isolados ou diplo

SR- Santa Rosa; RS- Rio do Sul

Dez colônias selecionadas (bastonetes anaeróbios, gram(+), catalase (-), não esporulados que cresceram em Agar MRS) foram analisadas quanto ao perfil de fermentação de carboidratos pelo kit Api (Tabela 13). Todas as colônias testadas fermentaram galactose, glicose, frutose, manose, manitol, maltose, sacarose, frutose. Apenas uma não fermentou a lactose

**Tabela 13** Fermentação de carboidratos das colônias isoladas da água de fermentação do amido de mandioca.

Colônias	SR1 4	SR2-3 2	SR2-1 1	SR2-2 3	RS2 1	RS1 2	SR2-2 1	SR2-3 1	SR2-1 4	SR2-2 2
L-arabinose	-	-	?	-	-	-	-	-	-	+
D-ribose	+	+	-	+	+	+	+	+	?	+
D-xilose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-ramnose	-	-	-	?	-	-	-	-	-	?
Dulcitol	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Metil D- manopiranosideo	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
N- acetilglicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arbutina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-lactose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Melobiose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
D-sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-melozitose	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
Rafinose	+	+	+	+	-	?	+	?	?	+
Amido	?	-	-	-	?	-	-	-	?	-
Gentobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Arabitol	?	?	-	-	-	-	?	-	-	?
Gluconato de potássio	?	?	?	?	?	-	?	-	?	?

SR- Santa Rosa; RS- Rio do Sul

A interpretação do perfil de fermentação foi facilitada pela utilização da base de dados “API-WEB” (BioMérieux) na qual a identificação de um organismo é acompanhada pela porcentagem de identificação (%ID) que é uma estimativa da sua proximidade relativa com os diferentes taxons da base de dados (Tabela 14). Este sistema considera uma boa identificação quando a %ID é acima de 80%. Das colônias de Santa Rosa analisadas, 5 tem o perfil do *Lactobacillus plantarum* com boa identificação (Santa Rosa), 2 tiveram baixa %ID como *Lactobacillus plantarum* e uma com baixa %ID como *Lactococcus lactis ssp lactis*. Das colônias isoladas de Rio do Sul, uma apresentou baixa % ID como *Lactococcus lactis ssp lactis*. Durante a fermentação ocorre uma sucessão de diferentes bactérias (FIGUEROA, DAVILA;

POURQUIÉ, 1995; CEREDA, 1973, citado por DEMIATE, 1999), sendo que no final da fermentação, somente microrganismos ácido-tolerantes sobrevivem (PARADA; FABRIZIO; MARTINEZ, 1996).

**Tabela 14** Caracterização Fenotípica das colônias isoladas da água de fermentação do amido de mandioca utilizando o Api-web.

Colônias	API 50CHL	
	% ID	Caracterização fenotípica
SR1-4	88,4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SR2-3-2	88,5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SR2-1-1	98,7	<i>Lactobacillus plantarum</i>
SR2-2-3	99,9	<i>Lactobacillus plantarum</i>
RS2-1	71,8	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
RS1-2	n.d	
SR2-2-1	69,3	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	28,6	<i>Lactobacillus brevis</i>
SR2-3-1	71,8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	17,7	<i>Lactococcus lactis ssp lactis</i>
SR2-1-4	Baixa discriminação	
SR2-2-2	99,3	<i>Lactobacillus plantarum</i>

SR- Santa Rosa; RS- Rio do Sul  
n.d.- não determinado

LACERDA (2002), avaliando duas polvilharias diferentes, observou que na polvilharia B aos 29 dias de fermentação só foram encontrados *L. acidophilus* e *L. manihotivorans*. *L. plantarum* só foi encontrado até 23 dias de fermentação, na polvilharia A, *L. fermentum*, *L. acidophilus* e *L. manihotivorans*. *L. plantarum*, foram encontrados com 45 dias de fermentação. Isto demonstra a dificuldade de se estabelecer um tempo adequado de fermentação para se obter um produto com determinada microbiota.

Muitas bactérias ácido-láticas são consideradas probióticas por proporcionarem efeitos benéficos em humanos e animais, aumentando a microbiota normal no trato gastrointestinal e inibindo as bactérias patogênicas (FULLER, 1989, ADAMS, 1999). Segundo Sanni, Morlon-Guyot e Guyot (2002), as fermentações

tropicais podem ser exploradas como fontes de novos probióticos, pois apresentam cepas tolerantes a sais biliares e pH igual a 2. Nsofor et al. (1996), produziram iogurte de soja, utilizando como inóculo, exsudato de mandioca fermentada por 24 a 48 horas.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que as águas residuais da fermentação de amido de mandioca podem ser direcionadas para produção de bactérias probióticas.

### **4.3 Micotoxinas**

A água residual das fermentações em laboratório com o amido de mandioca proveniente de Rio do Sul foram analisadas quanto à presença de micotoxinas. Não foram detectadas Aflatoxinas B1, B2, G1, G2, Ocratoxina A e Zearalenona nestas amostras. Segundo Westby (2002), micotoxinas não tem sido encontradas em produtos de mandioca fermentados.

### **4.4 Análise toxicológica**

Para a avaliação toxicológica da água residual da fermentação do amido de mandioca, foi efetuada a fermentação de uma mistura do amido de mandioca obtido na região de Rio do Sul e Tubarão (RS+TB). A composição química e a contagem de bactérias lácticas, mesófilas totais e bolores e leveduras encontradas nesta água são apresentados nas tabelas 15 e 16. A água residual desta fermentação apresentou baixa concentração de sólidos totais, representado principalmente por proteínas, açúcares e ácido láctico (Tabela 15). A água de fermentação apresentou em média de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL de bactérias lácticas, mesófilas totais e bolores e leveduras (Tabela 16).

**Tabela 15** Composição química da água residual da fermentação do amido de mandioca RS+TB

Parâmetros	g/100mL
Sólidos totais	0,21 ± 0,035
Lipídios	ND
Proteína	1,354 ± 0,255
Cinzas	0,015 ± 0,001
Carboidratos	0,194 ± 0,032
Acidez em ácido láctico	0,190 ± 0,012
pH	3,2 ± 0,17

ND – não detectado

**Tabela 16** Contagem de bactérias ácido lácticas, mesófilas totais e bolores e leveduras da água residual da fermentação do amido de mandioca (UFC/mL) RS+TB.

Bactérias	Final <sup>1</sup>	30 dias <sup>2</sup>
Bactérias Mesófilas totais	7,05 ± 10,78 x10 <sup>6</sup>	5,35 ± 1,06 x10 <sup>6</sup>
Bactérias lácticas	3,73 ± 4,03x 10 <sup>6</sup>	2,78 ± 2,76 x10 <sup>6</sup>
Bolores e Leveduras	4,13 ± 1,73 x10 <sup>7</sup>	2,76 ± 2,88 x10 <sup>6</sup>

<sup>1</sup>Contagem no final da fermentação

<sup>2</sup>Após 30 dias de armazenamento sob refrigeração

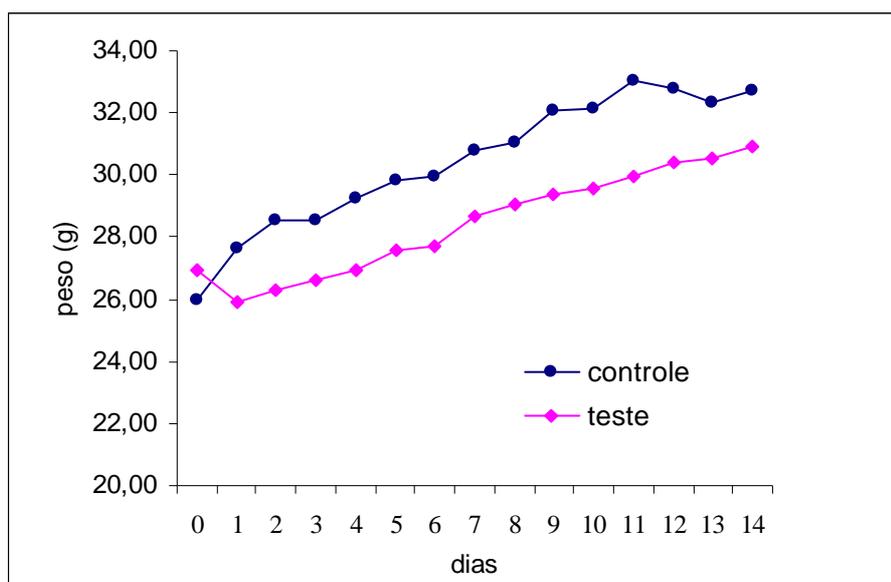
#### 4.4.1. Toxicidade aguda

Em estudos toxicológicos, um efeito adverso ou “anormal” tem sido definido como valores diferentes da variação “normal” observada em um grupo controle não tratado e expressos em termos estatísticos com um limite de confiança da média de 95%. Efeitos adversos podem ser definidos como as alterações que ocorrem com exposição continuada ou intermitente que resultam em falha na capacidade funcional, determinado por parâmetros anatômicos, fisiológicos, bioquímicos ou comportamentais (DYBING et al., 2002)

Os sinais de toxicidade sistêmica são manifestados através da redução no desenvolvimento ponderal dos animais, consumo de água e de ração, alterações no comportamento e má condição da pelagem como a presença de pelos arrepiados,

bem como alterações da massa relativa dos órgãos, alterações hematológicas e bioquímicas do sangue (LU, 1996).

Nenhum animal morreu ou apresentou sinais clínicos de toxicidade ou de modificação de comportamento durante os 14 dias do experimento. No entanto, os animais do grupo teste que receberam a água residual da fermentação do amido de mandioca liofilizado (5 mg/ Kg de peso), apresentaram um ganho de peso menor que o grupo controle (Tabela 15) que recebeu somente água destilada. Comparando a curva de crescimento dos animais (Figura 4), pode ser observado que ocorreu uma perda de peso após a ingestão do produto voltando a crescer em seguida, mas só alcançaram um crescimento em torno de 59% do crescimento do grupo controle. O consumo médio de ração do grupo teste foi inferior e o de líquido superior ao do controle. Não houve diferença significativa em relação ao peso do fígado (absoluto ou relativo) dos dois grupos (Tabela 17).



**Figura 4** Crescimento dos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda da água residual da fermentação do amido de mandioca.

**Tabela 17** Valores de ganho de peso, consumo de ração e líquido e peso do fígado absoluto e relativo (g/100 g de peso corporal) das fêmeas submetidas à toxicidade aguda (14 dias) da água da fermentação do amido de mandioca.

Grupo	Controle	Teste
Dose (g/Kg)	4,8 ± 0,13	5,01 ± 0,22
Ganho de peso(g)	6,73 ± 0,80 <sup>a</sup>	3,98 ± 0,75 <sup>b</sup>
Consumo de ração (g/dia)*	14,32 ± 2,25	11,71 ± 0,17
Consumo de líquido (mL/dia)*	6,66 ± 0,00	9,37 ± 0,29
Peso do fígado (g)	1,93 ± 0,13	1,90 ± 0,09
Peso relativo do fígado (g/100 g)	5,93 ± 0,54	6,16 ± 0,46

Valores são média ± DP (n=6). Médias com letras sobrescritas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes (P<0,05).

\* consumo médio aproximado de 2 caixas (3 animais por caixa)

A redução no ganho de peso dos animais, que receberam a água residual no teste de toxicidade aguda, pode estar relacionada com um menor consumo de ração, provavelmente por alguma irritação gástrica provocada pela alta acidez do produto, uma vez que nenhum outro sinal de toxicidade foi observado. Assim os resultados obtidos neste experimento demonstram que a água residual da fermentação do amido de mandioca apresenta baixa toxicidade aguda (>5000mg/Kg de peso).

Como os seres humanos estão mais freqüentemente expostos a níveis muitos menores do que as doses que causam toxicidade aguda e por longos períodos, os estudos de dose repetida ou toxicidade subcrônica fornecem dados mais realistas de toxicidade (LU, 1996; BARLOW et al., 2002).

#### 4.4.2 Toxicidade subcrônica

##### Observações clínicas e de crescimento

As doses para o estudo de dose repetida de 28 dias foram estabelecidas de acordo com a forma possível de consumo da água residual: adicionado a um outro líquido (25 e 50%) ou ingerida diretamente como uma bebida (100%), que expressa em gramas de sólidos totais/ kg de peso representa doses de 0,07, 0,15 e 0,30 g/Kg. A ingestão destas concentrações do resíduo da fermentação da fécula de mandioca

não causou nenhuma morte e não foi observada alteração significativa nas condições gerais dos animais relacionadas ao material testado.

A ingestão dos três níveis de concentração da água de fermentação da fécula de mandioca não causou diferenças significativas no ganho de peso dos animais quando comparado ao controle (Tabela 18).

### Consumo de líquido e alimento

O consumo médio de ração e líquido durante os 28 dias foi semelhante ao do controle sendo que os machos consumiram mais do que as fêmeas. A ingestão média do resíduo analisado em g de sólidos totais por Kg de peso ficou dentro do esperado (Tabela 18). No entanto ocorreram variações durante os 28 dias.

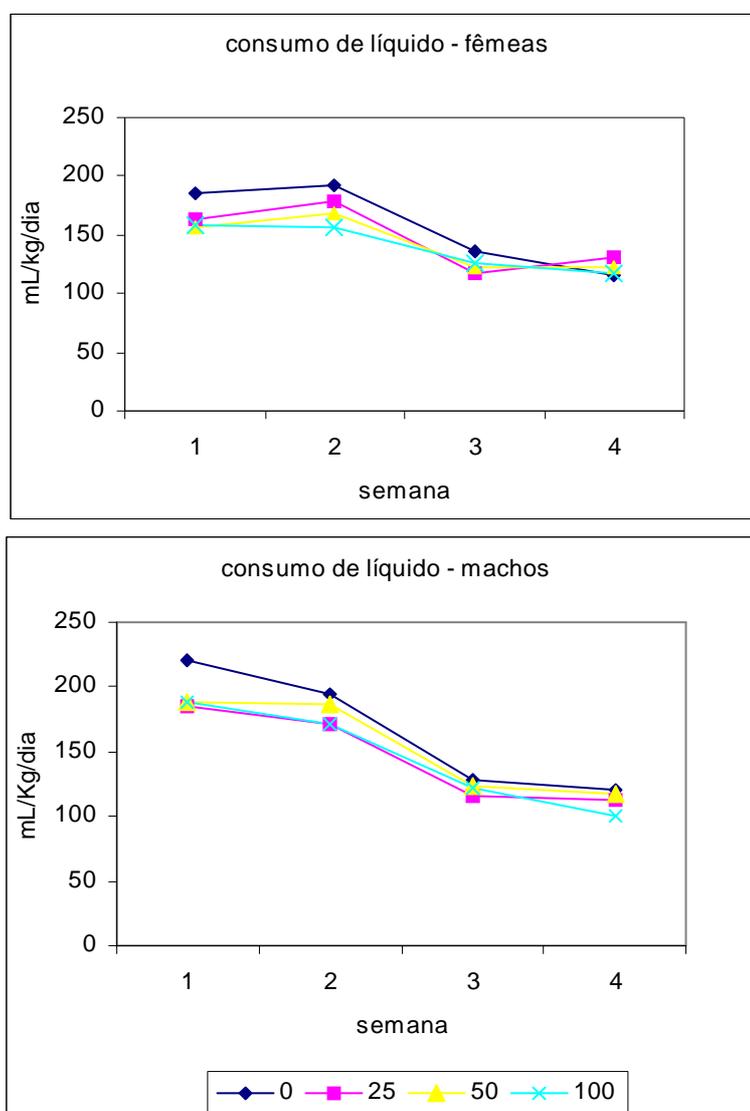
**Tabela 18** Ganho de peso, consumo de ração e líquido dos animais em 28 dias de experimento.

Dose (%)	Ganho de peso (g)	Consumo de ração (g/d/rato)	Consumo de líquido (mL/d/rato)	Ingestão média do resíduo (g/Kg de peso)*
<b>Fêmea</b>				
0	116,24 ± 8,19	17,54 ± 0,70	20,97 ± 1,33	-
25	104,96 ± 12,66	17,13 ± 1,31	20,08 ± 0,99	0,07 ± 0,01
50	106,64 ± 6,99	18,48 ± 1,67	19,86 ± 1,15	0,15 ± 0,02
100	109,18 ± 13,95	17,73 ± 1,75	19,03 ± 2,4	0,30 ± 0,02
<b>Macho</b>				
0	180,04 ± 8,58	21,60 ± 1,36	25,74 ± 3,57	-
25	200,16 ± 16,14	23,28 ± 1,68	26,07 ± 2,79	0,07 ± 0,00
50	173,94 ± 11,95	21,41 ± 1,06	25,25 ± 0,95	0,15 ± 0,01
100	192,90 ± 12,23	22,01 ± 0,72	24,85 ± 2,64	0,38 ± 0,00

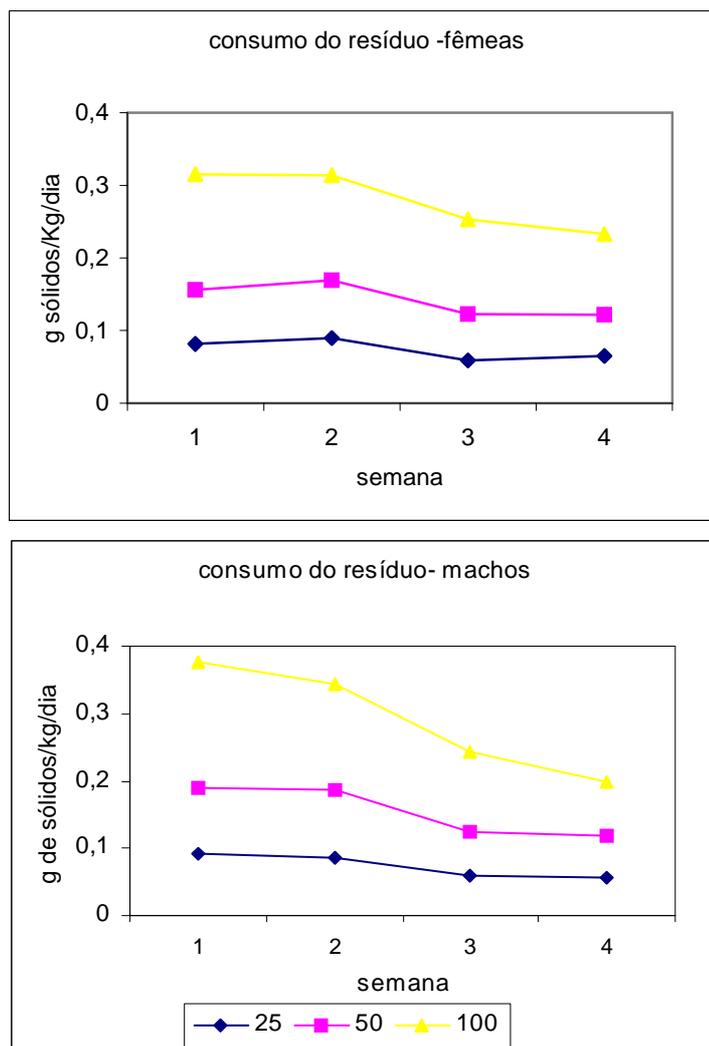
Valores são média ± desvio padrão (n=5). Não ocorreram diferenças significativas em relação ao controle.

\*Valores correspondem a g de sólidos totais ingeridos por Kg de peso.

A média de ingestão de líquido na primeira semana variou de 161 a 220 mL/Kg de peso/ dia para os machos e de 157 a 186 mL/Kg de peso/ dia para as fêmeas e na última semana a ingestão foi de 99 - 120 mL/Kg de peso/ dia nos machos e 115 a 130 mL/Kg de peso/ dia nas fêmeas (Figura 5), o que levou a uma redução da ingestão do resíduo pelos animais durante o período experimental. Esta redução foi mais acentuada nos grupos que receberam 100 % da água residual da fermentação do polvilho azedo, principalmente nos machos (Figura 6). Na última semana a ingestão do resíduo em sólidos totais foi de 0,06, 0,012 e 0,20 g/Kg /peso para os grupos 25, 50 e 100 respectivamente.



**Figura 5** Consumo de líquido dos animais em mL/kg/dia durante os 28 dias de experimento.



**Figura 6** Consumo de líquido residual da fermentação do amido de mandioca em g de sólidos totais por Kg de peso do animal por dia durante os 28 dias de experimento.

A avaliação patológica ao final de um estudo para analisar os potenciais riscos à saúde, permite a identificação de alterações orgânicas e teciduais (alterações morfológicas) enquanto que as medidas bioquímicas identificam as alterações funcionais (LOEB e QUIMBY, 1989, 1989).

Os pesos relativos dos órgãos (Tabela 19), foram semelhantes para todos os grupos com exceção do pulmão nas fêmeas que receberam a dose de 50%, cujo valor é maior que o controle ( $p=0,021$ ) e do fígado nos animais machos da dose 100%, que foi menor que do grupo controle ( $p=0,020$ ). Visto que não verificou-se uma dose dependência e que não está correlacionado com nenhum outro parâmetro, pode representar apenas uma variação normal e não sinal de toxicidade.

**Tabela 19** Peso relativo dos órgãos dos animais com 28 dias de experimento em g/100g de peso corporal.

Dose (%)	Fígado (g %)	Pulmão (g%)	Rim (g%)	Baço (g%)	Coração (g%)
<b>Fêmea</b>					
0	3,08 ± 0,16	0,50 ± 0,05	0,76 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,39 ± 0,01
25	3,06 ± 0,21	0,51 ± 0,05	0,75 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,37 ± 0,03
50	3,11 ± 0,12	0,62 ± 0,06*	0,74 ± 0,05	0,24 ± 0,03	0,38 ± 0,03
100	3,16 ± 0,25	0,52 ± 0,07	0,81 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,39 ± 0,02
<b>Macho</b>					
0	3,45 ± 0,17	0,49 ± 0,02	0,75 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,39 ± 0,03
25	3,66 ± 0,15	0,47 ± 0,05	0,77 ± 0,03	0,25 ± 0,03	0,37 ± 0,03
50	3,51 ± 0,14	0,53 ± 0,05	0,81 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,39 ± 0,02
100	3,16 ± 0,13*	0,45 ± 0,07	0,71 ± 0,04	0,22 ± 0,02	0,34 ± 0,04

Valores são média ± desvio padrão (n=5).

\* diferente do grupo controle ao nível de significância de  $p < 0,05$  (Dunnett).

## Hemograma e bioquímica do sangue

Durante a coleta de sangue para as análises alguns animais foram perdidos ou tiveram o sangue hemolisado o que levou a grupos com diferentes números de animais como demonstrado nas tabelas 20, 21 e 22.

Em condições fisiológicas o equilíbrio qualitativo e quantitativo das células sanguíneas, com estreitas variações, é mantido pelo balanço entre a produção e a destruição das mesmas. Qualquer fator físico, químico ou biológico que interfira neste balanço, pode se refletir em alterações no sangue periférico. O hemograma é o exame de rotina destinado a avaliar aspectos qualitativos, em termos morfológicos, e quantitativos das células do sangue periférico (FAILACE, 2003).

Uma contagem deprimida de hemácias, concentrações baixas de hemoglobina e hematócrito baixo pode indicar anemia, sobrecarga de líquido ou hemorragia além de 24 horas. Baixos VCM e CHCM indicam anemias microcíticas hipocrômicas causadas por anemia por deficiência de ferro, anemia sideroblástica ou talassemia. Um VCM alto sugere anemias macrocíticas causadas por anemias megaloblásticas, devido à deficiência de ácido fólico ou vitamina B12, desordens

congênitas de DNA ou reticulocitose. (MILLER, 1995; RAVEL, 1997; FAILACE, 2003).

Nenhum dos parâmetros analisados no sangue das fêmeas, que receberam as diferentes doses na bebida foi significativamente diferentes dos valores obtidos para os animais controles. No entanto, os machos que receberam 100% do resíduo apresentaram um valor médio de hemoglobina inferior ao grupo controle ( $p= 0,04$ ) (Tabela 20), no entanto, os valores se encontram dentro da faixa de variação para estes animais (WOLFORD et al.1986).

Os leucócitos (glóbulos brancos) formam a primeira linha de defesa contra microrganismos invasores. Os neutrófilos e os monócitos respondem através do processo de fagocitose, enquanto os linfócitos produzem anticorpos. Uma contagem elevada de leucócitos (leucocitose) com aumento concomitante de neutrófilos freqüentemente assinalam uma infecção bacteriana como, por exemplo, um abscesso, meningite, apendicite ou amigdalite. Uma contagem alta de leucócitos pode também resultar de leucemia e necrose tecidual devido a queimaduras, infarto do miocárdio ou gangrena. Já a leucopenia (diminuição dos leucócitos) indica depressão da medula óssea, que pode resultar de infecções virais ou de reações tóxicas, como, por exemplo, as que acompanham o tratamento com antineoplásicos, ingestão de mercúrio ou outros metais pesados, ou exposição ao benzeno ou arsênicos. A monocitose (aumento dos monócitos) é freqüente na endocardite bacteriana e a eusinofilia (eosinófilos aumentados) está mais associado a infestação por parasitas, mas pode aparecer em algumas infecções bacterianas (RAVEL, 1997). A ingestão da água da fermentação do amido de mandioca não apresentou alterações significativas no hemograma dos animais

**Tabela 20** Valores de hemograma dos ratos machos e fêmeas, no final do período experimental de 28 dias (média  $\pm$  DP).

Parâmetros	Machos				Fêmeas			
	0 (n=5)	25% (n=5)	50% (n=5)	100% (n=3)	0 (n=4)	25% (n=5)	50% (n=3)	100% (n=4)
LEU ( $10^3/\text{mm}^3$ )	10,88 $\pm$ 1,93	8,34 $\pm$ 1,70	9,2 $\pm$ 2,27	8,33 $\pm$ 1,75	5,27 $\pm$ 0,68	4,96 $\pm$ 1,34	6,40 $\pm$ 2,42	6,60 $\pm$ 1,54
ERI ( $10^6/\text{mm}^3$ )	7,33 $\pm$ 0,11	7,22 $\pm$ 0,15	7,26 $\pm$ 0,39	7,08 $\pm$ 0,25	7,45 $\pm$ 0,33	7,57 $\pm$ 0,3	7,86 $\pm$ 0,29	7,14 $\pm$ 0,35
HGB (g/dl)	14,8 $\pm$ 0,34	14,8 $\pm$ 0,33	14,9 $\pm$ 0,61	13,9 $\pm$ 0,55*	15,05 $\pm$ 0,47	15,02 $\pm$ 0,72	15,33 $\pm$ 0,81	14,55 $\pm$ 0,31
HCT (%)	44,2 $\pm$ 1,28	43,8 $\pm$ 0,72	44,2 $\pm$ 2,18	41,9 $\pm$ 1,6	43,90 $\pm$ 1,47	43,88 $\pm$ 1,85	45,06 $\pm$ 2,14	42,12 $\pm$ 1,06
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	60,4 $\pm$ 1,14	60,6 $\pm$ 0,55	61 $\pm$ 1,41	59 $\pm$ 0,0	59,00 $\pm$ 1,41	57,8 $\pm$ 0,84	57,33 $\pm$ 1,53	59,00 $\pm$ 2,00
HCM (pg)	20,16 $\pm$ 0,29	20,58 $\pm$ 0,23	20,54 $\pm$ 0,33	19,6 $\pm$ 0,35	20,18 $\pm$ 0,49	19,86 $\pm$ 0,30	19,5 $\pm$ 0,70	20,43 $\pm$ 0,81
CHCM (g/dl)	33,46 $\pm$ 0,26	33,88 $\pm$ 0,26	33,68 $\pm$ 0,34	33,1 $\pm$ 0,53	34,25 $\pm$ 0,1	34,24 $\pm$ 0,26	34 $\pm$ 0,30	34,6 $\pm$ 0,25
PLQ ( $10^3/\text{mm}^3$ )	916 $\pm$ 74	1002 $\pm$ 92	852 $\pm$ 81	770 $\pm$ 75	793 $\pm$ 159	815 $\pm$ 163	950 $\pm$ 17	864,00 $\pm$ 42
VMP ( $\mu\text{m}^3$ )	7,28 $\pm$ 0,82	7,88 $\pm$ 0,68	8,18 $\pm$ 0,99	6,77 $\pm$ 0,06	7,32 $\pm$ 0,55	7,08 $\pm$ 0,75	6,53 $\pm$ 0,15	7,02 $\pm$ 0,58
LIN (%)	89,2 $\pm$ 1,65	90,3 $\pm$ 3,33	88,3 $\pm$ 5,33	89,1 $\pm$ 2,44	86,50 $\pm$ 1,56	83,9 $\pm$ 2,60	83,30 $\pm$ 6,00	83,77 $\pm$ 4,04
MON (%)	2,48 $\pm$ 0,18	2,14 $\pm$ 0,46	2,12 $\pm$ 0,37	2,43 $\pm$ 0,5	2,70 $\pm$ 0,75	2,90 $\pm$ 0,64	2,80 $\pm$ 0,26	2,82 $\pm$ 0,45
NEU (%)	7,6 $\pm$ 1,41	7,38 $\pm$ 3,05	7,16 $\pm$ 1,3	7,4 $\pm$ 1,37	9,97 $\pm$ 1,54	12,94 $\pm$ 2,56	11,20 $\pm$ 3,12	11,4 $\pm$ 2,50
EOS (%)	0,58 $\pm$ 0,70	0,14 $\pm$ 0,05	0,68 $\pm$ 0,57	0,96 $\pm$ 1,50	0,67 $\pm$ 0,46	0,14 $\pm$ 0,09*	1,47 $\pm$ 2,10	1,92 $\pm$ 1,84
BAS (%)	0,1 $\pm$ 0,1	0,08 $\pm$ 0,04	0,12 $\pm$ 0,04	0,13 $\pm$ 0,06	0,15 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,07	0,17 $\pm$ 0,11	0,075 $\pm$ 0,05

\*diferente do grupo controle ao nível de significância de  $p < 0,05$  (Dunnett).

LEU = leucócitos; ERI = eritrócitos; HGB = hemoglobina; HCT = hematócrito; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média; CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; PLQ = plaquetas; VMP = volume médio das plaquetas; LIN = linfócitos; MON = monócitos; NEU = neutrófilos; EOS = eosinófilos; BAS = basófilos.

A coagulação sanguínea se desenvolve em três estágios fundamentais. Em resposta a uma lesão vascular ou a um dano ao próprio sangue forma-se uma substância ou complexo de substâncias designadas de “ativadores de protrombina” que catalisa a conversão da protrombina em trombina, que por sua vez converte o fibrinogênio em filamentos de fibrina que englobam plasma e elementos figurados do sangue na formação do coágulo. A protrombina é formada continuamente pelo fígado, se este órgão reduzir sua produção o teor sanguíneo cairá em 24 horas abaixo do nível necessário para a coagulação. Os valores médios do tempo de protrombina foram semelhantes para todos os grupos independentes do sexo do animal (Tabela 21).

**Tabela 21** Tempo de protrombina (TAP) dos ratos no final do período experimental de 28 dias (média  $\pm$  DP)

Dose	Machos	Fêmeas
0	10,04 $\pm$ 0,34 (n=5)	10,28 $\pm$ 1,28 (n=4)
25%	10,10 $\pm$ 0,62 (n=5)	9,34 $\pm$ 0,53 (n=5)
50%	9,60 $\pm$ 0,74 (n=5)	10,17 $\pm$ 0,31 (n=3)
100%	10,12 $\pm$ 0,96 (n=5)	8,98 $\pm$ 0,34 (n=4)

As plaquetas também contribuem para a coagulação sanguínea, pois aderem às paredes de vasos sanguíneos lesados (adesão plaquetária) formando o tampão plaquetário, secretam várias moléculas bioativas (agregação e secreção plaquetária) e contribuem para a geração de trombina (PARISE; SMITH; COLLIER, 2001). A trombocitose pode ocorrer em anemias por deficiência de ferro, em períodos pós-hemorragicos, em processos inflamatórios, nas síndromes mieloproliferativas e após traumas enquanto que a trombocitopenia pode estar associada a infecções virais, aplasia medular, anemias por deficiência de vitamina B12 e ácido fólico, quimioterapia entre outras causas (FAILACE, 2003). Alterações funcionais adquiridas podem ser devidas a doenças sistêmicas como a uremia e hepatopatias

crônicas e a desordens hematológicas, entre outras (SHATTIL; ABRAMS; BENNETT, 2001). Não ocorreram alterações significativas na contagem de plaquetas com a ingestão por 28 dias da água residual da fermentação do amido de mandioca (Tabela 20).

Quanto às análises bioquímicas, os animais machos apresentaram valores de colesterol, albumina e sódio superiores ao do grupo controle, no grupo que recebeu 25 % do resíduo e os triglicerídeos nos grupos que receberam 25 e 50 % (Tabela 22).

Apesar dos valores médios de glicose se encontrarem dentro da faixa de normalidade para estes animais (87-146 mg/dl) (WOLFORD et al., 1986), a média dos animais dos grupos testes foi superior ao controle, com o grupo 25% apresentando os maiores valores. O mesmo não ocorreu com as fêmeas.

Em condições normais, o teor de glicose no sangue mantém-se dentro de limites bastante estreitos. Os níveis de glicemia são regulados pela intervenção de diversos hormônios, sobressaindo, por sua maior atividade a insulina, cuja ação reduz a taxa glicêmica. Em condições patológicas, ou sobrecarga do sistema regulatório, pode ocorrer um desequilíbrio levando a estado de hiper ou hipoglicemia (MILLER, 1995; HENRY, 1995).

Inúmeras síndromes e doenças estão associadas com altos níveis de glicose plasmáticas em jejum, tais como diabetes mellitus, pancreatites, doenças endócrinas, hepáticas, estresse, entre outras. A hipoglicemia pode ser causada por hipotireoidismo, hiperinsulinismo, distúrbios na absorção intestinal, anorexia nervosa, diarreia, esforço muscular intenso entre outros (LIMA et al., 1992; MOURA et al., 1997).

A dosagem de triglicerídeos constitui um parâmetro importante na detecção de distúrbios no metabolismo lipídico. (HENRY,1995). A taxa dos triglicerídeos é elevada no diabetes, na síndrome nefrótica, na pancreatite, interferência bacteriana, estrógenos, álcool. A hipotrigliceremia pode estar relacionada com o uso de algumas drogas, má-absorção, desnutrição (LIMA, 1992; MOURA, 1987). Nos animais machos os valores de triglicerídeos foram superiores ao do controle nos grupos 25 e 50% e nas fêmeas somente o valor médio do grupo 50% foi menor do que o do grupo controle.

**Tabela 22** Parâmetros bioquímicos do sangue dos ratos, machos e fêmeas, no final do período experimental de 28 dias (média  $\pm$  DP).

Parâmetros	Machos				Fêmeas			
	0% (n=5)	25% (n=5)	50% (n=5)	100% (n=4)	0% (n=4)	25% (n=5)	50% (n=3)	100% (n=4)
CHOL (mg/dl)	54,80 $\pm$ 4,76	67,2 $\pm$ 15,51	79,2 $\pm$ 9,81*	67,00 $\pm$ 9,09	75,00 $\pm$ 18,46	93,20 $\pm$ 29,81	63,33 $\pm$ 8,62	102,00 $\pm$ 16,57
LDL (mg/dl)	42,64 $\pm$ 10,78	42,34 $\pm$ 10,25	40,32 $\pm$ 9,55	39,70 $\pm$ 8,28	55,85 $\pm$ 23,95	64,24 $\pm$ 23,03	43,13 $\pm$ 10,74	63,93 $\pm$ 12,76
HDL (mg/dl)	11,20 $\pm$ 4,21	16,80 $\pm$ 5,22	14,80 $\pm$ 6,06	12,00 $\pm$ 5,23	17,00 $\pm$ 6,68	17,20 $\pm$ 6,34	15,33 $\pm$ 4,51	21,75 $\pm$ 4,27
TGL (mg/dl)	56,00 $\pm$ 16,55	90,20 $\pm$ 14,53*	94,40 $\pm$ 22,29*	71,25 $\pm$ 18,73	79,50 $\pm$ 12,97	58,60 $\pm$ 18,93	47,33 $\pm$ 11,93*	81,50 $\pm$ 25,16
CREA (mg/dl)	0,20 $\pm$ 0,07	0,26 $\pm$ 0,09	0,26 $\pm$ 0,09	0,18 $\pm$ 0,05	0,23 $\pm$ 0,10	0,24 $\pm$ 0,15	0,30 $\pm$ 0,00	0,30 $\pm$ 0,08
ALP (U/L)	80,40 $\pm$ 16,86	92,00 $\pm$ 23,51	99,40 $\pm$ 25,08	75,25 $\pm$ 18,71	59,50 $\pm$ 5,07	63,80 $\pm$ 24,90	64,33 $\pm$ 10,41	78,00 $\pm$ 8,12
GLU (mg/dl)	63,6 $\pm$ 2,70	108,80 $\pm$ 17,08*	88,60 $\pm$ 9,07*	83,00 $\pm$ 7,12*	76,00 $\pm$ 14,76	59,60 $\pm$ 11,72	61,00 $\pm$ 5,57	84,75 $\pm$ 11,03
AST (U/L)	76,40 $\pm$ 12,70	73,80 $\pm$ 9,96	86,20 $\pm$ 19,64	70,25 $\pm$ 10,10	76,00 $\pm$ 4,08	93,50 $\pm$ 7,76*	99,00 $\pm$ 16,00*	85,33 $\pm$ 2,49
ALT (U/L)	28,40 $\pm$ 1,52	31,20 $\pm$ 3,11	28,80 $\pm$ 3,96	28,25 $\pm$ 3,86	26,00 $\pm$ 3,37	24,80 $\pm$ 4,32	28,66 $\pm$ 0,58	28,00 $\pm$ 0,82
TP (g/dl)	3,56 $\pm$ 0,55	4,78 $\pm$ 0,87	4,24 $\pm$ 0,77	3,58 $\pm$ 0,71	4,43 $\pm$ 0,85	4,06 $\pm$ 1,28	4,47 $\pm$ 5,23	5,23 $\pm$ 0,53
ALB (g/dl)	0,68 $\pm$ 0,13	1,04 $\pm$ 0,25*	0,88 $\pm$ 0,19	0,75 $\pm$ 0,17	0,98 $\pm$ 0,22	0,86 $\pm$ 0,29	1,10 $\pm$ 0,10	1,13 $\pm$ 0,15
Na (mmol/L)	94,8 $\pm$ 10,85	118,6 $\pm$ 14,89*	109,6 $\pm$ 14,15	99,25 $\pm$ 10,72	114,25 $\pm$ 15,97	104,00 $\pm$ 21,97	109,33 $\pm$ 8,08	127,75 $\pm$ 8,62
K (mmol/L)	3,16 $\pm$ 0,34	3,86 $\pm$ 0,35	3,56 $\pm$ 0,55	3,33 $\pm$ 0,62	3,95 $\pm$ 0,66	3,54 $\pm$ 0,68	4,30 $\pm$ 0,20	4,18 $\pm$ 0,25
Cl (mmol/L)	65,80 $\pm$ 8,17	83,20 $\pm$ 12,11	77,40 $\pm$ 10,78	69,50 $\pm$ 7,42	82,75 $\pm$ 13,38	73,80 $\pm$ 17,82	77,33 $\pm$ 6,43	93,25 $\pm$ 7,14

n = número de animais. \* diferente do grupo controle ao nível de significância de  $p < 0,05$  (Dunnett).

CHOL= colesterol, LDL = lipoproteína de baixa densidade, HDL = lipoproteína de alta densidade, TGL = triglicerídeos, CREA = creatinina, ALP = fosfatase alcalina, GLU = glicose, AST = aspartato transaminase, ALT= alanina aminotransferase, TP = proteína total, ALB= albumina, Na = sódio, K = potássio, Cl = cloreto

A hipercolesterolemia pode ocorrer no diabetes, com taxas elevadíssimas, no hipotireoidismo, distúrbios no trato biliar, anestesia por éter, dentre outros. A hipocolesterolemia pode ser causada por hipertireoidismo, anemia perniciosa, hepatites, má-absorção intestinal (HENRY, 1995). Os valores médios de colesterol foram maiores que o do controle somente nos animais que receberam a dose de 50%.

As alterações ocorridas nos parâmetros bioquímicos no sangue como colesterol, triglicerídeos, nos machos; triglicerídeos, glicose e aspartato transaminase nas fêmeas não demonstram ser dose dependente e encontram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie (WOLFORD et al, 1986).

As medidas da atividade das enzimas séricas podem auxiliar nas conclusões sobre a localização e a natureza das alterações patológicas (BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 1998). Um aumento da atividade de enzimas séricas acima da variação normal pode significar um aumento da sua produção pelas células ou diminuição da taxa de depuração destas enzimas da circulação (LOEB; QUIMBY, 1989, BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 1998).

A Fosfatase alcalina está acentuadamente elevada em doenças biliares, no entanto um aumento do nível sérico desta enzima não é uma indicação definitiva da atividade tecidual (LOEB; QUIMBY, 1989; BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 1998). A aspartato transaminase é largamente distribuída em diversos tecido nos ratos, com as mais altas concentrações no fígado, coração, músculo esquelético e rim. A *alanina aminotransferase* é uma enzima específica do fígado em ratos, por isso o aumento da atividade sérica é indicativo de dano hepatocelular e necrose hepática.(LOEB; QUIMBY, 1989). Neste estudo somente os níveis da enzima aspartato transaminase nas fêmeas que receberam as doses de 25 e 50% foram maiores que o grupo controle.

Os valores obtidos para creatinina, proteínas totais, albumina, sódio, potássio e cloreto neste experimento (Tabela 22) estão abaixo dos valores de referência para esses animais (WOLFORD et al, 1986; CHARLES RIVER,1998), no entanto estes animais não apresentaram outros sinais clínicos que pudessem estar relacionados com estes valores baixos. Somente os animais machos que ingeriram a dose de 50 % apresentaram um nível de sódio maior que o grupo controle. Segundo Loeb e Quimby (1989), os efeitos de um composto sobre os parâmetros bioquímicos deve

ser avaliado comparando com um grupo controle, pois ocorre uma grande variação entre os animais experimentais o que dificulta a utilização de valores de referência.

A creatinina é filtrada nos rins e pode ter seus níveis aumentados no sangue quando este órgão está alterado. Medidas de albumina sérica, cuja concentração sérica na maioria dos animais de laboratório variam de 2,42 a 4,19 g/dl, é importante para o diagnóstico do estado nutricional, integridade do sistema vascular e função hepática (LOEB; QUIMBY, 1989). Uma redução nos níveis de albumina sérica pode ser interpretada como desnutrição, doença hepática crônica, doença renal e intestinal (LOEB; QUIMBY, 1989; BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 1998). No entanto a sua concentração pode estar reduzida no animal em jejum por 18 horas (LOEB; QUIMBY, 1989). Os valores de proteína total tende a cair quando a análise é realizada após o congelamento da amostra, possivelmente pela crioprecipitação de alguma proteína.(LOEB; QUIMBY, 1989).

Os eletrólitos como potássio, sódio, cloreto, cálcio e magnésio são responsáveis pela manutenção da pressão osmótica, distribuição da água nos compartimentos do organismo, manutenção do pH e regulação das funções cardíacas. A hiponatremia (concentração reduzida de sódio no plasma) pode ocorrer por vômitos prolongados, diarreia, enteropatias e poliúria, bem como na retenção excessiva de água no caso de edema, ascite, cirrose e desnutrição (BURTIS; ASHWOOD; TIETZ, 1998). Sinais clínicos como os citados acima não foram observados nos animais deste estudo.

### **Análise histopatológica**

O intestino delgado é a região onde ocorrem os principais processos de digestão e absorção de alimentos. A mucosa intestinal é a principal barreira a potenciais patógenos e substâncias toxigenicas. A degradação da mucosa intestinal tem sido usada como marcador de toxicidade por bactérias (SALMINEN et al. 1998).

Os resultados da análise histopatológica apresentados na Tabela 23 mostram que a maioria dos animais machos apresentou apenas lesões histológicas leves na região intestinal analisada, com perda de revestimento epitelial. Apenas um animal do grupo que recebeu 100% da água residual apresentou lesão intensa com destruição das vilosidades intestinais e presença de infiltrado inflamatório. No entanto nas fêmeas, todos os animais avaliados no grupo controle e no grupo 100 %

apresentaram lesões intensas, enquanto os animais que receberam as outras doses praticamente não apresentaram lesões. Não foi possível, entretanto concluir que a lesão foi ocasionada pela bebida ingerida, uma vez que o grupo controle também apresentou estas lesões e os animais não apresentaram sintomas como perda de peso, vômitos ou diarreia.. Doenças inflamatórias do trato intestinal são muito comuns em animais de laboratório e são freqüentemente associadas com bactérias, vírus, e parasitas, e em muitos casos são de etiologia desconhecidas (McCLURE, et al., 1978). As lesões observadas nos animais experimentais podem ser vistas na Figura 7. As causas destas lesões não foram analisadas.

**Tabela 23** Resultados da análise histopatológica do corte intestinal dos animais após 28 dias de experimento.

Sexo	Dose	Nº de animais	Lesões			
			Normal	Leve	Moderada	Intensa
Machos	0%	5	5	0	0	0
	25%	5	0	5	0	0
	50%	3	1	2	0	0
	100%	5	0	4	0	1
Fêmeas	0%	5	0	0	0	5
	25%	5	4	1	0	0
	50%	5	5	0	0	0
	100%	5	0	0	0	5

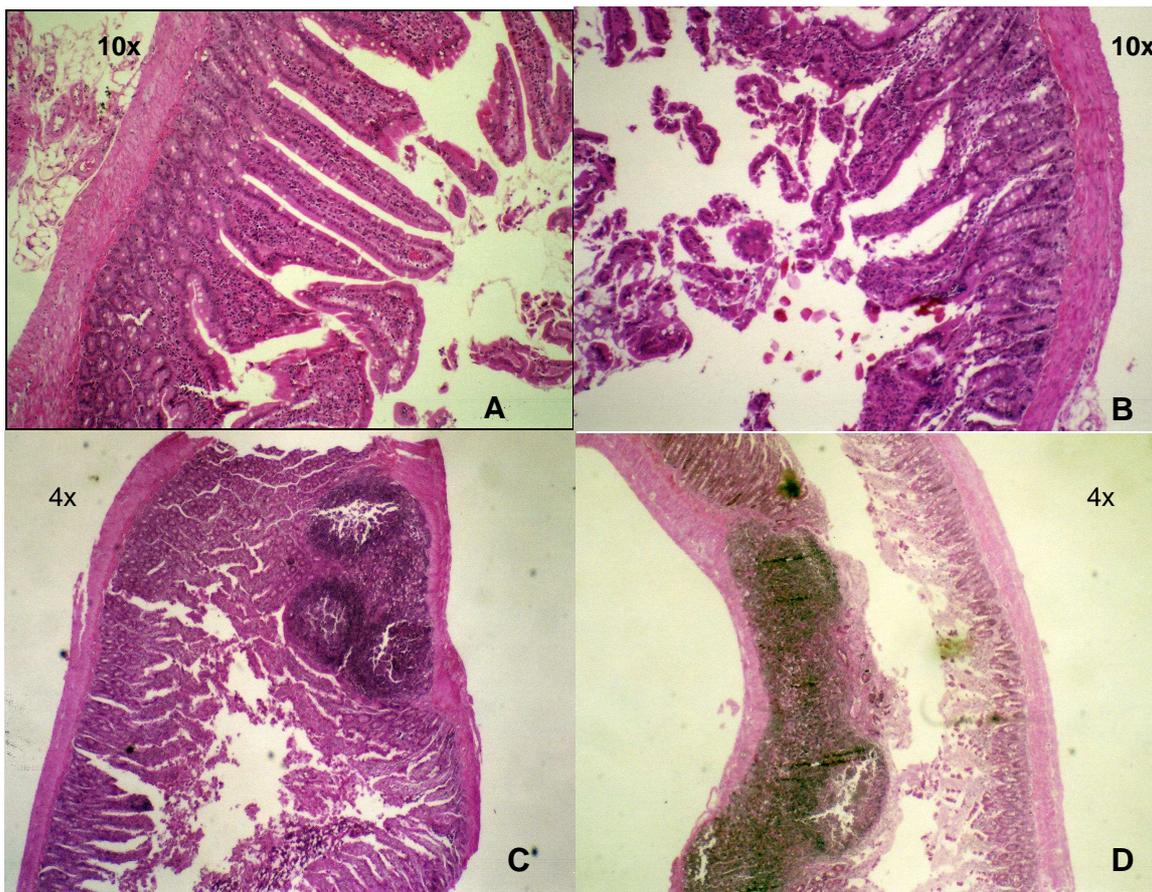


Figura 7. Aparência da mucosa intestinal do intestino delgado dos diversos grupos experimentais. A - mucosa intestinal normal com as vilosidades intestinais preservadas e ausência de infiltrado inflamatório na mucosa (aumento 10x); B - lesão leve da mucosa intestinal com perda das pontas das vilosidades intestinais (aumento de 10x); C- lesão moderada da mucosa intestinal com lesões das vilosidades e presença de nódulos linfáticos abundantes na mucosa (aumento de 4x) e D - lesão intensa da mucosa intestinal com destruição completa das vilosidades intestinais e grande quantidade de infiltrado inflamatório (aumento de 4x).

Segundo Adams (1999), as bactérias lácticas normalmente encontradas nos alimentos fermentados e utilizadas na fabricação de probióticos são seguras.

KE et al (2005), avaliaram a toxicidade de uma bebida antioxidante derivada da fermentação de arroz não polido, mamão e alga marinha com bactéria láctica, levedura e bactéria fotossintética e não encontraram nenhuma alteração no crescimento, consumo, comportamento, parâmetros hematológicos ou bioquímicos, bem como na inspeção histológica do coração, fígado, baço e pulmão, em ratos alimentados por 90 dias com doses de 150, 100 e 50 vezes a dose diária recomendada.

Estudos de dose repetida de 28 dias em ratos tratados com 2000mg/kg de peso de microrganismos desidratados não demonstraram efeitos adversos relacionados ao tratamento (KITANO et al, 2004).

Avaliação da toxicidade realizada em diversas cepas puras de bactérias lácticas, para sua utilização como probiótico, tem demonstrado que mesmo em grandes quantidades não produzem efeitos adversos quando analisados em ratos (HUANG et al,2003; TSAI et al, 2004a;TSAI et al, 2004b).

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a água residual da fermentação do amido de mandioca para a produção de polvilho azedo, nas doses avaliadas, não apresenta toxicidade. Este resultado pode ser, em grande parte, atribuído ao baixo teor de sólidos totais característico das águas da fermentação do amido de mandioca, as quais, se forem consumidas em um novo produto, não irão sofrer concentração que venha a comprometer a segurança. No entanto, um estudo mais prolongado e com maior número de animais pode ser necessário para assegurar a utilização deste resíduo, bem como avaliar possíveis propriedades probióticas.

O objetivo deste estudo foi avaliar as águas da fermentação do polvilho azedo da forma como é eliminada, como resíduo agroindustrial. A partir da intenção de uso destas águas, provavelmente como uma nova bebida, ela não sofrerá concentração, o que poderia ser economicamente inviável, ou mesmo alterar as características microbiológicas encontradas.

## 5 CONCLUSÕES

- A água residual da fermentação do amido de mandioca apresenta uma composição muito pobre com baixa quantidade de sólidos totais e conseqüentemente de nutrientes;
- A conversão do amido de mandioca fermentado em ácido láctico é baixa representando uma produtividade de 1,5%;
- As contagens totais de bactérias lácticas na água residual da fermentação do amido de mandioca variaram de 5,27 a 7,84 log UFC/mL; e nas amostras analisadas estas bactérias foram identificadas principalmente como *Lactobacillus plantarum*, o que pode significar que este resíduo pode ser utilizado para produção de bactérias probióticas;
- Como o tipo de fermentação deste estudo ocorre de forma espontânea, são necessários mais estudos para estabelecer parâmetros adequados de fermentação para se obter um produto com a microbiota desejada;
- A água residual da fermentação do amido de mandioca apresentou baixa toxicidade aguda (> 5,0 g/kg de peso);
- A ingestão de diferentes concentrações da água de fermentação do amido de mandioca durante 28 dias não causou alterações clínicas e hematológicas significativas nos animais;
- Estudos mais prolongados de toxicidade incluindo análises histológicas de outros órgãos, devem ser realizados para garantir a segurança deste resíduo para desenvolvimento de produtos.

## 6 SUGESTÕES

- Apesar da baixa concentração de sólidos totais, os demais compostos presentes nas águas residuais da fermentação do amido de mandioca, como por exemplo, a presença de vitaminas produzidas por microrganismos e oligossacarídeos deve ser investigada;
- Uma caracterização mais aprofundada da microbiota presente nestas águas em diferentes épocas do ano e diferentes regiões, visando um maior controle da fermentação;
- Análise da viabilidade econômica para produção de ácidos orgânicos;
- Desenvolvimento de bebidas probióticas aproveitando a presença de bactérias lácticas;
- Desenvolvimento de inóculo para fermentações mais controladas e produção de polvilho azedo de melhor qualidade.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. R. Safety of industrial lactic acid bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 68, n.2, p. 171-178. 1999.

ALTAF, M.D., NAVEENA, B. J., REDDY, G. Use of inexpensive nitrogen and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Bioresource Technology**, v.98, n.3, p.498-503. 2007.

AMANTE, E. R. **Proposições Metodológicas para a Minimização e Valorização de Resíduos de Fecularias e das Industrias Processadoras de Aves e Pescados do Estado de Santa Catarina**. 1997. 178f. Tese (Doutorado em Engenharia de Produção). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC. 1997.

AMPE, F. Design and evaluation of a *Lactobacillus manihotivorans* species-specific rRNA-targeted hybridization probe and its application to the study of sour cassava fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.2224-2226. 2000.

AMOA-AWUA, W.K.A; JACOBSEN, M. The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, n.3, p.250-256. 1995.

AMOA-AWUA, W.K.A; APPOH, F.E.; JAKOBSEN, M. Lactic acid fermentation of cassava dough into agbelima. **International Journal of Food Microbiology**, v.31, n.1-3, p.87-98. 1996.

ANURADHA, R., SURESH, A. K., VENKATESH, K. V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. **Process Biochemistry**, v.35, p.367– 375. 1999.

AOAC ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of Association Of Official Analytical Chemists**. 16<sup>th</sup> ed. Maryland, 1998.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19<sup>th</sup> ed, Washington, D.C. 1995. 1600p.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods of the microbiological examination of foods**. 4<sup>th</sup>. Edition. Washington D.C., 2001. 676p.

ASCHERI, D.P.R.; VILELA, E.R. Alterações do polvilho da mandioca pela fermentação, no fabrico de biscoitos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.30, n.2, p.269-279. 1995.

BARLOW, S.M. et al. Hazard identification by methods of animals-based toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, n.2-3, p.145-191. 2002.

BRABET, C. et al. Improving cassava sour starch quality in Colombia. In: DUFOUR, D.; O'BRIEN, G.M.; BEST, R. (Eds.). *Cassava flour and starch: Progress in research and development*. Colombia: CIAT. Publicação no. 271. p. 241-246, 1996. Ch 27.

BRADBURY, M.G.; EGAN, S.V.; BRADBURY, J.H. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, n.4, p.593-601. 1999.

BRASIL. Resolução CNNPA nº 12, 24/07/1978. Normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24<sup>de</sup> julho de 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 11 de janeiro de 2005.

BRASIL. Resolução RDC, nº2 de 07/01/2002 – Regulamento técnico de substâncias Bioativas e Probióticos isolados com alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Republicada no **Diário Oficial da União**, Brasília 17 de dezembro de 2002. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 11 de janeiro de 2005.

BRASIL. Resolução ANVS/MS nº16 de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Republicada no Diário Oficial da União, Brasília, 03 de dezembro de 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 11 de janeiro de 2005.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos *in vivo***. Campinas: Ed UNICAMP, 1994. 122p.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; TIETZ, N.W. **Tietz fundamentos de química clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1998. 836p.

CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. Glicosídeos cianogênicos da mandioca: biossíntese, distribuição, destoxificação e métodos de dosagem. In: CEREDA, Marney Pascoli (Coord). **Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, v.2, p 83-99, 2002 (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas v.2).

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F.; Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, n.1-2, p.131-149.1999.

CÁRDENAS, O.S.; BUCKLE, T.S. Sour cassava starch production: a preliminary study. **Journal of Food Science**, v.45, n.6, p.1509-1512. 1980.

CARDOSO, C.E.L.; SOUZA, J.S.. Importância, potencialidades e perspectivas do cultivo da mandioca na América Latina. In: CEREDA, Marney Pascoli (Coord). **Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, v.2, p 29-47, 2002 (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas v.2).

CARDOSO, E. **Uso de manipueira como biofertilizante no cultivo do milho: avaliação do efeito no solo, nas águas subterrâneas e na produtividade**. 2005. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais). Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais. Universidade do Extremo Sul Catarinense. 2005.

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. Polvilho azedo: Aspectos físicos, químicos e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.2, p.129-137. 1996.

CARVALHO, V.D.; CARVALHO, J.G. Princípios tóxicos da mandioca. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.5, n.59/60, p.82-88. 1979.

CEREDA, M. P. Tecnologia e qualidade do polvilho azedo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p.63-68. 1987.

CEREDA, M.P. Padronização para ensaios de qualidade da fécula de mandioca fermentada (polvilho azedo). Formulação e preparo de biscoitos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP. v.17, n.3, p.287-295, jul./set. 1993.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. In: CEREDA, Marney Pascoli (Coord). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargil, v.4, p 13-37, 2001 (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas v.4).Cap1.

CEREDA, M.P.;BONASSI, I.A. Avaliação da qualidade da fécula fermentada comercial de mandioca (polvilho azedo). III- Ácidos orgânicos e absorção de água. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.III, n.2, p.21-30. 1985.

CEREDA, M.P.; GIAJ-LEVRA, L.A. Constatação de bactérias não simbióticas fixadoras de nitrogênio em fermentação natural de fécula de mandioca. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v.6, n.1, p.29-33. 1987.

CEREDA, M.P.; LIMA, U.A. 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, v.15, p.107-122. 1981.

CEREDA, M. P.; MATTOS, M.C.Y. Linamarin: the toxic compound of cassava. **Journal of Venomomous. Animals and Toxins**, v. 2, n.1, p. 06-12. 1996.

CEREDA, M.P.; TAKAHASHI, M. Cassava wastes: their characterization, and uses and treatment in Brazil. In: DUFOUR, D.; O'BRIEN, G.M.; BEST, R. (Eds.). **Cassava flour and starch: Progress in research and development**. Colombia: CIAT. Publicação no. 271. pp. 221-232, 1996. ch 25.

CEREDA, M.P., VILPOUX, O. Polvilho azedo, critérios de qualidade para uso em produtos alimentícios. In: **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargil, 2003. pp.333-354.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA,S.S.; WEBB, C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, n.5 , p. 851-859. 2002a.

CHARALAMPOPOULOS, D. et. al. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review.; **International Journal Food Microbiology**, v. 79, n. 1-2, p.131-141. 2002b.

CHARLES RIVER LABORATORIES. Baseline hematology and clinical chemistry values for Charles River wistar rats (CRL: (WI) BR) as a function of sex and age. **Technical Bulletin**, Wilmington, MA, 1998. disponível em: [http://www.criver.com/research\\_models\\_and\\_services/research\\_models/RM\\_literature.html](http://www.criver.com/research_models_and_services/research_models/RM_literature.html). Acesso em 07/11/2006.

CHATAKANONDA, P. et. al. The influence of time and conditions of harvest on the functional behavior of cassava starch – a proton NMR relaxation study. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p.233-240. 2003.

CHUZEL, G. The cassava processing industry in Brazil: traditional techniques, technological developments, innovations and new markets. **African Journal Food Nutritional Security**, v.1, p.46-59. 2001.

DAMASCENO, S. et. al. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragrans* using cassava wastewater as substrate. **Process biochemistry**, v.39, n.4, p.411-414. 2003.

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

DEMIATE, I.M. et al. G. Relationship between banking 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.; OETERRER, M.; WOSIACKI, G. A fermentação como processo de enriquecimento nutricional. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.2, p.170-181. 1994.

DING, S., TAN, T. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. **Process Biochemistry**, v.41, p.1451–1454. 2006.

DYBING, E. et al. Hazard characterisation of chemicals in food and diet: dose response, mechanisms and extrapolation issues. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.237-282. 2002.

EL-DASH, A.A. Utilização da mandioca na alimentação Humana e em outros produtos industrializados. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.13, n.145, p.74-82. 1987.

ESSERS, A.J.A.; VAN der GRIFT, R.M.; VORAGEN, A.G.J. Cyanogen removal from cassava roots during sun-drying. **Food Chemistry**, v.55, n.4, p.319-325. 1996.

EZEALA, D.O., OKORO, N. Processing techniques and hydrocyanic acid content of cassava-based human foodstuffs in Nigeria. **Journal of Food Biochemistry**, v.2, n.10, p.125-132. 1986.

FAILACE, R. **Hemograma – manual de interpretação**. Porto Alegre:Artmed, 4. ed. 2003. 298 p.

FAO/WHO. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba –Argentina, 2001. Disponível em: [http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood\\_probiocons\\_en.stm](http://www.fao.org/es/esn/food/foodandfood_probiocons_en.stm) . Acesso em 10de janeiro de 2005.

FIGUEROA, C.; DAVILA, A.M.; POURQUIÉ, J. Lactic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation. **Letters in Applied Microbiology**, v.21, n.2, p.126-130. 1995.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378. 1989.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technological**, v.10, n.45, p.139-157. 1999.

HELLER, K.J.; Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73 (suppl), p.374S-379S. 2001.

HENRY, J.B. **Diagnosticos clinicos & tratamento por metodos laboratoriais**. 18. ed. São Paulo: Manole, 1995. 330p

HUANG, Y.; KOTULA, L.; ADAMS, M.C. The in vivo assesment of safety and gastrointestinal survival of na orally administred novel probiotic, *Propionibacterium jensenii* 702, iin male Wistar rat model. **Food and chemical toxicology**, v.41, p.1781-1787. 2003.

HUISINGH, D.; BAAS, L. W. Cleaner production: the most effective approach to achieving improved water quality. **European Water Pollution Control**, v..1, n.1, p.24– 23. 1991.

IWUOHA, C.I.; BANIGO, E.O.I.; OKWELUM, F.C. Cyanide content and sensory quality of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) root tuber flour as affected by processing. **Food Chemistry**, v.58, n.4, p.285-288. 1997.

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

JOHN, R. P., NAMPOOTHIRI, K. M., PANDEY, A. Solid-state fermentation for L-lactic production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**, v.41, p.759– 763. 2006.

JORDAN, A. The international Organisational Machinery for Sustainable Development: Rio and the Road Beyond. **The Environmentalist**, v.14, n.1, p.23–33. 1994.

KALANTZOPOULUS, G. Fermented products with probiotics qualities. **Anaerobe**, v.3, n.2-3, p.185-190. 1997.

KAMALU, B.P. Pathological-changes in growing dogs fed on a balanced cassava (*manihot-esculenta crantz*) diet. **British Journal of Nutrition**, v.69, n.3, p.921-934. 1993.

KAMALU, B.P. The adverse effects of long-term cassava (*Manihot esculenta* Crantz) consumption. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.46, n.1, p.65-93. 1995.

KATO, M.S.A.; SOUZA, S.M.C. Conservação de raízes após a colheita. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.13, n.145, p.9-11. 1987.

KE, B. et al. Evaluation of the toxicity and safety of the antioxidant beverage effective microorganisms-X (EM-X) in animal models. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.20, p.313-320. 2005.

KITANO, M. et al. 28-Day repeated dose toxicity study of dried microorganism in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1817-1824. 2004.

KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v.50, n.1-2, p.45-57. 1999.

LACERDA, I.C.A. **Microbiota envolvida na fermentação da mandioca para a produção de polvilho azedo, na região de Conceição dos Ouros-MG**. 2002. Dissertação (Mestrado em microbiologia). Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2002.

LAMO, P.R; MENEZES, T. J. B. Bioconversão das águas residuais do processamento da mandioca para a produção de biomassa. **Coletânea do ITAL**, Campinas, v.10, p.1-14. 1975

LIMA, J.W.C. **Análise ambiental: Processo produtivo de polvilho em indústrias do extremo sul de Santa Catarina**. 2001. 131f. Dissertação, (Mestrado em Engenharia de Produção). Curso de Pós-graduação em Engenharia de Produção. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2001.

LIMA, A. Oliveira. **Metodos de laboratorio aplicados a clinica: tecnica e interpretação**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. 600p.

LOEB, W.F; QUIMBY, F.W. **The clinical chemistry of laboratory animals**. New York: Pergamon, 1989. 519p.

LU, F.C. **Basic toxicology: fundamentals organs and risk assesment**. 3<sup>a</sup> ed. Washington: Taylor & Francis, 1996.

LUCKOW, T. DELAHUNTY, C. Which juice is "healthier"? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, p.751–759. 2004.

MAcCLURE, H.M. et al. The Digestive System. In: BENIRSCHKE, Kurt; et al. **Pathology of laboratory animals**. New York: Springer-Verlag, 1978. p.175-230.

MANTE, E.S.; SAKYI-DAWSON, E. AMOA-AWUA, W.K. Antimicrobial interactions of microbial species involved in the fermentation of cassava dough into agbelima with particular reference to the inhibitory effect of lactic acid bacteria on enteric pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v.89, n.1, p.41-50. 2003.

MARCON, M.J.A. **Avaliação do processo produtivo para melhoria da qualidade do polvilho azedo**. 2004. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MATTILA-SANDHOLM, T. et al. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, n.2-3, p.173-182. 2002.

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 Microbiology**, v.82, n.2, p.111-120. 2003.

MILLER, Otto. **Laboratório para o clínico**. 8.ed. São Paulo: Atheneu, 1995. 607p.

MOLIN, G. Probiotic in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum*. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.73(suppl), p.380S-385S. 2001.

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

MORLON-GUYOT, J. et al. *Lactobacillus manihotvorans* sp. nov., a new starch-hydrolising lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.4, p.1101-1109. 1998.

MOURA, R.A. **Técnicas de laboratório**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1987. 510p.

NAGASHIMA, S. Determinação espectrofotométrica de cianeto com ácido isonicotínico e ácido barbitúrico. **Environmental Analytical Chemistry**, v.10, p.99-106. 1981.

NAKAMURA, I.M.; MORAES, I.O.; MARTUCCI, E.T. Considerações sobre tecnologia da fécula de mandioca fermentada: produção, propriedades físico-químicas e aplicações. **Científica**, v. 4, p.196-202. 1976.

NOUT, M.J.R., SARKAR, P.K. Lactic acid food fermentation in tropical climates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.76, n.1-4, p.395-401. 1999.

NSOFOR, L.M. et al. Evaluation of pure bacterial culture from fermented cassava as soy-yogurt starter: a research note. **Food Research International**, v.29, n.5-6, p.549-553. 1996.

OBILIE, E.M.; TANO-DEBRAH, K.; AMOA-AWUA, W.K. Souring and breakdown of cyanogenic glucosides during the processing of cassava into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, n.1, p.115-121. 2004.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Guideline for testing of chemicals**. Test N° 407. Repeated dose 28-day oral toxicity study in Rodents, 1995. 8 p.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **Guideline for testing of chemicals**. Test N° 420. Acute Oral Toxicity- Fixed dose procedure, 2001.14 p.

OHKOUCHI, Y.; INOUE, Y. Impact of chemical components of organic wastes on L(+)-lactic acid production. **Bioresource Technology**, v.28, p.546–553. 2007.

OKAFOR, N.; IJIOMA, B.; OYOLU, C. Studies on the microbiology of cassava retting for foo-foo production. **Journal of Applied Bacteriology**, v.56, n.1, p.1-13. 1984.

OKAFOR, N.; UMEH, C.; IBENEGBU, C. Amelioration of garri, a cassava-based fermented food by the inoculation of microorganisms secreting amylase, lysine and linamarase into cassava mash. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.14, n.6, p.835-838. 1998.

OKE, O.L. The role of hydrocyanic acid in Nutrition. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.11, p.170-198. 1969.

OKE, O.L. Toxicity of cyanogenic glycosides. **Food chemistry**, v.81, n.6, p.97-109. 1980.

OLUWOLE, O.S.A.; ONABOLU, A.O.; SOWUNMI, A. Exposure to cyanide following a meal of cassava food. **Toxicology Letters**, v.135, n.1-2, p.19-23. 2002.

ONABOLU, A.O. et al. Processing factors affecting the level of residual cyanohydrins in gari. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, n.9, p.966-969. 2002.

OSUNTOKUN, B.O. Cassava diet, chronic cyanide intoxication and neurophaty in the Nigerian Africans. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v.36, p.141-173. 1981.

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

OYEWOLE, O.B.; ODUNFA, S.A. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. **Journal of Applied Bacteriology**, v.68, n.2, p.145-152. 1990.

PADMAJA, G. Cyanide detoxification in cassava for food and feed uses. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.4, p.2999-339. 1995.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.81-87. 2000.

PANTAROTO, S.; CEREDA, M.P. Linamarina e sua decomposição no ambiente. In: CEREDA, Marney Pascoli (Coord). **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargil, v.4, p 38-47, 2001 (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas v.4).Cap.2.

PARADA, J.L., FABRIZIO, S.V., MARTINEZ, A. Microbiological and technological aspects of cassava-starch fermentation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.12, n.1, p.53-56. 1996.

PARISE, L. V.; SMITH, S.S.; COLLER, B.S. Platelet morphology, biochemistry, and function. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. 6.ed. New York: McGraw-Hill, 2001. pp.1357-1408.

RAKIN, M. et al. Contribution of lactic acid fermentation to improve nutritive quality vegetable juices enriched with brewer's yeast autolysate. **Food Chemistry**, v.100, p.599–602. 2007.

RAVEL, R.. **Laboratorio clinico : aplicações clinicas dos dados laboratorios**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c1997. 616p.

RIVERA, H.H.P. **Fermentação de amido de mandioca (Manihot esculenta Crantz): Avaliação e caracterização do polvilho azedo La Serena.** 1996. 100 f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 1996.

SALMINEN, S. et al. Demonstration of safety of probiotics- a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, p.93-106. 1998.

SANNI, A. I.; MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J.P. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* e *L.fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, n.1-2, p.53-62. 2002.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration an survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907. 2000.

SHATTIL, S.J.; ABRAMS, C.S.; BENNETT, J.S. Acquired qualitative platelet disorders due to diseases, drugs, and foods. In: BEUTLER, Ernest et al. **Williams Hematology**. 6. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. pp. 1583-1603.

SILLER, H.; WINTER, J. Treatment of cyanide-containing wastewater from the food industry in a laboratory-scale fixed-bed methanogenic reactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.49, n.2, p.215-220. 1998.

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E. P.; PILON, P. Alimentos e bebidas obtidos pela fermentação natural da fécula de mandioca. **Higiene Alimentar**, v.13, n.66-67, p.44-47. 1999.

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, n.68/69, p.26-31,.2000.

SILVEIRA, I.A. et al. Isolamento e caracterização da microbiota ácido láctica envolvida no processo fermentativo para produção de polvilho azedo. **Pró Homine: Revista Científica da Unilavras**, Ano 2, v. 2, p.7-14, 2003. Disponível em:<<http://www.unilavras.edu.br>>, Acesso em: 10 novembro de 2004.

SINGH, S. K., AHMED, S. U., PANDEY, A. A Metabolic engineering approaches for lactic acid production. **Process Biochemistry**, v. 41, p.991-1000. 2006.

SOARES, L.M.V.; RODRIGUES-AMAYA, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. **Journal of Association of Official Analytical Chemists**, USA, v.72, n.1, p.22-26. 1989

SRIROTH, K. et al. Cassava starch granule structure-function properties: influence of time and conditions at harvest on four cultivars of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p.161-170. 1999.

STATSOFT. STATISTICA (data analysis software system), version 6. 2001.  
[www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

TSAI, C.-C. et al. Toxicity evaluation for an *Enterococcus faecium* strain TM39 in vitro and in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, v.42, p.1601-1609. 2004a.

TSAI, C.-C. et al. Evaluation of the toxicity of *Lactobacillus acidophilus* LAP5 in a 28-day feeding study in wistar rats. **Journal Food Safety**, v.24, p.268-280. 2004b.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon**, v.38, n.1, p.11-36. 2000.

VIEIRA, L.M. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina - 2003/2004 - Mandioca. Instituto CEPA/SC. Disponível em: <http://www.icepa.com.br>. Acesso em: 11 de janeiro de 2005a.

VIEIRA, L.M. Mandioca – Apesar dos pesares, 2004 foi bom para o agricultor. Informe Conjuntural. 16/12/2004. Instituto CEPA/SC. Disponível em: <http://www.icepa.com.br>. Acesso em: 11 de janeiro de 2005b.

VILELA, G. G.; BACILA, H.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552 p.

VILELA, E.R.; FERREIRA, M.G. Tecnologia de produção e industrialização do amido da mandioca. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.13, n.145, p.69-73. 1987.

WESTBY, A.; CEREDA, M.P. Production of fermented cassava starch (polvilho azedo) in Brazil. **Tropical Science**, v.34, n.2, p.203-210. 1994.

WESTBY, A. Cassava utilization, storage and small-scale processing. In: HILLOCKS, R.G.; THRESH, J.M.; BELLOTTI, A.C. eds, **Cassava: biology, production and utilization**. Chapter 14. CAB International, p.281-300. 2002.

WOLFORD, S.T.et al. Reference range data base for serum chemistry and hematological values in laboratory animals. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.18, p.161-188. 1986.

WOOD, B.J.B. Industrial evolution of fermented foods. **Food Biotechnology**, v.5, n.3, p.279-291. 1991.

## **ANEXOS**