

Juliane Mascarenhas Pereira

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS, ANTIMICROBIANAS E
APLICAÇÃO DAS ÁGUAS SOBRENADANTES DA
FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutora em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Regina Amante

Coorientador: Prof. Dr. Leandro José Dallagnol

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Juliane Mascarenhas
Características funcionais, antimicrobianas e aplicação
das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca
/ Juliane Mascarenhas Pereira ; orientadora, Edna Regina
Amante ; coorientador, Leandro José Dallagnol. -
Florianópolis, SC, 2016.
174 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. Mandioca. 3. Águas
Residuais. 4. Ácidos Orgânicos. 5. Atividade
Antimicrobiana. I. Amante, Edna Regina . II. Dallagnol,
Leandro José . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. IV. Título.

Juliane Mascarenhas Pereira

**CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS, ANTIMICROBIANAS E
APLICAÇÃO DAS ÁGUAS SOBRENADANTES DA
FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA**

Esta tese foi julgada adequada para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 03 de março de 2016.

Roseane Fett, Dr.

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos

Banca examinadora:

Edna Regina Amante, Dra.
PGCAL/CCA/UFSC – Presidente

Alicia de Francisco de Casas, Dra.
PGCAL/CCA/UFSC

Deise Helena Baggio Ribeiro, Dra.
PGCAL/CCA/UFSC

Elessandra da Rosa Zavareze, Dra.
UFPeI

Marcos Stroschein, Dr.
IFSC

Pedro Luís Manique Barreto, Dr.
PGCAL/CCA/UFSC

Ao meu marido André,

Aos meus Pais Judith e Jair,

Aos meus irmãos Letícia e Jardel,

Aos meus sobrinhos Samuel, Davi e Martín

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por que há acasos que não consigo explicar!

À minha família, pelo apoio e amor incondicional dos meus pais Judith e Jair, dos meus irmãos Jardel e Letícia e do meu cunhado Fabrizio, os quais sempre estiveram muito presentes e dedicados! Aos meus sobrinhos Samuel, Davi e Martín que tornam os meus dias mais alegres e porque olhando para eles tenho esperança de um mundo melhor! Amo vocês!

Ao meu marido André! Amigo e companheiro incansável! Obrigada pela paciência e compreensão! Por estar sempre ao meu lado e ser a primeira pessoa a segurar a minha mão para eu não cair... Te amo!

A todos os professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelos ensinamentos, pela amizade e pela atenção que nunca faltou, em especial à minha orientadora Edna Regina Amante, pela confiança, amizade, paciência, por ser esta fonte inesgotável de conhecimento e de bondade! Obrigada por todos os momentos de convivência maravilhosa que jamais esquecerei!

Ao Professor Leandro Dallagnol por ter me recebido tão bem na Universidade Federal de Pelotas, ter aceitado me co-orientar e ser este pesquisador brilhante e uma pessoa maravilhosa de conviver.

Aos Professores Alícia de Francisco Casas, Deise Helena Baggio Ribeiro, Elessandra da Rosa Zavareze, Marcos Stroschein e Pedro Luís Manique Barreto por terem aceitado de imediato o convite para participarem da banca examinadora e por terem sido tão generosos na avaliação e nas sugestões, enriquecendo o debate e engrandecendo o horizonte a ser trilhado sobre o tema abordado.

À Professora Deise Baggio pela grande parceria! Por ter sido muito mais que orientadora em uma pesquisa... Foi muito lindo trabalhar contigo! E não foi cansativo... foi muito bom!

À Professora Alicia de Francisco por toda a colaboração com as análises microscópicas.

Ao Professor Pedro pela amizade, bons momentos de convivência, ensinamentos e por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento de parte desta pesquisa e também aos seus alunos, em especial à Gabriela Rocha e ao Matheus Maciel, por estarem sempre a disposição para me ajudar.

À Maristela Martins por ser um dos presentes que o curso de doutorado me deu... Não sei a quem atribuir nosso encontro em Floripa... Acho que se chama “destino” mesmo! Uma amizade para a vida toda... Obrigada por tudo!

À Mariazinha e ao Sr. Hélio por toda a amizade e apoio durante este período!

Aos amigos e colegas do Laboratório de Frutas e Hortaliças, Luis Carlos Oliveira, Ana Carolina Aquino, Milene Marquezi, Evellin Balbinot, Professora Carmen Müller, Professora Edna, Daiana Cardoso, Vanessa Gervin, Suliana Andrade, e demais pesquisadores, que passaram pelo laboratório neste período, pelos grandes momentos de alegria e de aflição compartilhados! Por termos sido sempre o ombro amigo uns dos outros... Graças a vocês construí um lar neste laboratório... Obrigada pelos cafés gurias e mates Evellin! Vocês foram e são muito importantes na minha vida! Muito obrigada por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Interação Planta-Patógeno da UFPel Bruna Pozzebon, Keilor Dornelles, Paulo Pazdiora, Priscila Meneses, Fábio Araújo e Tatiane Souto, aos funcionários Sérgio e Rosária e à Professora Cândida Farias pela amizade e ajuda sempre que precisei!

Ao Sérgio, secretário do PPGCAL - UFSC, pela sua atenção em todos os momentos e pela amizade.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos pela oportunidade.

*A todos que torceram por mim, **muito obrigada!***

*"Se você só fizer o que sabe, nunca será mais do que você é
agora"*

(Mestre Shifu do Filme kung Fu Panda)

Pereira, Juliane Mascarenhas. **Características funcionais, antimicrobianas e aplicação das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca.** 2016. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RESUMO

O amido de mandioca fermentado e seco ao sol, no Brasil, é conhecido como polvilho azedo e é um produto típico da América do Sul. Durante o processo de fermentação, tanques preenchidos com amido de mandioca ficam submersos por uma lâmina de água (aproximadamente 20 cm), onde ocorrem inúmeras reações químicas, impulsionadas pela presença de vários micro-organismos, principalmente bactérias ácido-láticas e leveduras. Durante este processo, há a formação de diversos compostos como: ácidos orgânicos de cadeia curta, aromáticos, vitaminas, peptídeos, entre outros. Porém, ao final do processo, esta água é considerada um resíduo com elevada carga orgânica, sendo geralmente descartado no ambiente, o que vai de encontro aos preceitos das tecnologias limpas. Neste contexto, este estudo objetivou encontrar alternativas para agregar valor à cadeia produtiva do polvilho azedo, buscando informações a respeito das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) quanto ao potencial antimicrobiano. Para isso, dividiu-se o estudo em quatro etapas. No primeiro momento, a ASFAM foi caracterizada quanto aos ácidos orgânicos presentes (ácidos lático, acético, propiônico, butírico), relacionando-os com a atividade antibacterina sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, utilizando os padrões dos ácidos orgânicos para comparação. Na segunda etapa, ASFAMs de três fontes diferentes foram caracterizadas quanto ao perfil de ácidos orgânicos e quanto à atividade antifúngica sobre cepas de *B. cinerea*, *M. fructicola* e *C. gloeosporioides*, utilizando padrões dos ácidos encontrados na amostra para comparação. Na terceira etapa, realizou-se a concentração de três ASFAMs por *spray drying*, utilizando como encapsulante duas maltodextrinas com DEs 5 e 15 e comparou-se a morfologia das micropartículas obtidas com as micropartículas envolvidas no processo de fermentação e com as partículas de maltodextrinas que lhes deram origem. Na quarta e última etapa, três ASFAMs foram concentradas por *spray drying*, utilizando três maltodextrinas (DEs 5, 15 e 20), sendo as micropartículas obtidas, avaliadas quanto à morfologia e quanto às propriedades antimicrobianas sobre o fungo *C. gloeosporioides*. Observou-

se que os testes antibacterianos realizados com a ASFAM resultaram na redução do crescimento bacteriano, não sendo possível a visualização de colônias de *E. coli* após 1,5 h e de *S. aureus* após 24 h de incubação, em teste de crescimento em caldo nutriente. Quando comparada com a ação dos ácidos orgânicos, de forma isolada, a ASFAM teve um efeito mais rápido e eficaz sobre *E. coli*, enquanto que, para o *S. aureus*, verificou-se que a ação antimicrobiana é dependente do tempo de contato. Nos testes antimicrobianos realizados sobre os fungos, observou-se que as três ASFAMs tiveram efeito significativo sobre os três fungos, sobretudo na análise de germinação conidial, podendo-se atribuir a alguns ácidos esta ação, visto que os ácidos acético, propiônico e butírico, assim como o mix de ácidos, também obteve efeito significativo na redução da germinação dos três fungos testados. No entanto, quando se analisou os resultados de crescimento micelial, concluiu-se que as ASFAMs têm um efeito mais amplo e eficaz, quando comparadas aos padrões dos ácidos. Analisando a estrutura das micropartículas, observou-se uma tendência à formação de uma rede regular envolvendo as partículas de maltodextrinas com características diferentes dos grânulos de amido de mandioca nativos ou fermentados e secos ao sol e das partículas de maltodextrinas, mostrando-se como um novo material que deve ser considerado em aplicações como biofilmes ativos, por exemplo. Avaliando o potencial antifúngico das micropartículas sobre o *C. gloeosporioides*, verificou-se que a ação da micropartícula é dependente da origem da ASFAM e, neste estudo, somente os sólidos obtidos da ASFAM 1, reduziram a germinação conidial. Tanto na análise de crescimento micelial como na análise de germinação conidial, houve diminuição na eficácia das micropartículas, quando comparadas às ASFAMs. Os resultados deste estudo indicam para a possibilidade da utilização destes compostos naturais como alternativas para o controle da deterioração bacteriana e fúngica. Outros trabalhos podem ser desenvolvidos para aperfeiçoar as técnicas de obtenção dos sólidos, focando principalmente na cinética de liberação dos ácidos orgânicos.

Palavras-chave: Mandioca. Polvilho Azedo. Águas Residuais. Ácidos Orgânicos. Atividade Antimicrobiana.

Pereira, Juliane Mascarenhas. **Functional characteristics, antimicrobial and application of supernatant waters of fermentation of cassava starch.** 2016. Dissertation (Doctorate in Food Science) – Food Science Postgraduate Program, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC.

ABSTRACT

Sundried fermented cassava starch is known as sour cassava starch in Brazil and it is a typical product of South America. During the fermentation process, tanks filled with cassava starch are kept submerged by a water blade (approximately 20 cm), where numberless of chemical reactions take place, boosted by the presence of various microorganisms, mainly lactic acid bacteria and yeast. During this process, the formation of several compounds such as: short chain organic acids, aromatics, vitamins, peptides, among others take place. However, in the end of the process, this water is considered a waste with elevated organic load, being usually discarded in the environment, which contradicts the precepts of clean technologies. In this context, this study aimed at finding alternatives to add value to the production chain of sour cassava starch, searching for information about the supernatant waters of the fermentation of cassava starch (ASFAM) in relation to antimicrobial potential. This study was divided into four stages. At first, the ASFAM was characterized in terms of organic acids (lactic acid, acetic, propionic, butyric), relating them with the antibacterial activity on strains of *S. aureus* and *E. coli*, using the patterns of organic acids for comparison. In the second stage, ASFAMs from three different sources were characterized in terms of profile of organic acids and in relation to antifungal activity on the strains of *B. cinerea*, *M. fructicola* and *C. gloeosporioides*, using patterns of acids found in the sample for comparison. In the third stage, it was carried out the concentration of three ASFAMs by *spray drying*, using as encapsulant two maltodextrines with DEs 5 and 15 and it was compared the morphology of microparticles obtained with the microparticles involved in the process of fermentation and with the particles of maltodextrines, which were originated. In the fourth and last stage, three ASFAMs were concentrated by *spray drying*, using three maltodextrines (DEs 5, 15 and 20), being the microparticles obtained, evaluated in terms of morphology and in relation to antimicrobial properties on the Fungus *C. gloeosporioides*. It was observed that the antibacterial tests carried out with the ASFAM resulted in

the reduction of bacterial growth, not being possible the visualization of colonies of *E. coli* after 1,5 h and *S. aureus* after 24 h of incubation, in the nutrient stock test. When compared with the action of organic acids, singly, the ASFAM had a faster and more efficient effect on *E. coli*, on the other hand, it was verified for the *S. aureus*, that the antimicrobial action is dependent on the contact time. In the antimicrobial test carried out on the fungi was observed that the three ASFAMs had significant effect on the three fungi, mainly in the germination analysis, being possible to attribute this action to some acids, since the acetic, propionic and butyric acids, as well as, with the mix acids, also had significant effect in the reduction of germination of three fungi tested. However, when the results of mycelial growth were analyzed, it was concluded that the ASFAMs have a wider and efficient effect, when compared to patterns of acids. Analyzing the microstructure of microparticles, it was observed a tendency for a formation of a regular net involving the particles of maltodextrines with different characteristics of granules of native or fermented cassava starch and dried under the sun and the particularities of maltodextrines, showing itself as a new material that must be considered in applications with active biofilms, for example. Evaluating the potential of antifungal of microparticles on *C. gloeosporioides*. It was verified that the action of microparticles is dependent of the origin of ASFAM and, in this study, only solids obtained from ASFAM 1, reduced the conidial germination. It was observed that in the analysis of mycelial growth as in the analysis of conidial germination, there was a decreasing in the efficiency of microparticles, when compared to ASFAMs. The results of this study indicate for the possibility of using these natural compounds as alternatives to agrochemical for bacterial and fungi control. Other studies can be developed for improving the techniques of solid obtaining, focused mainly in the kinetics of liberation of organic acids.

Key-words: Cassava. Sour Cassava Starch. Residual Waters. Organic Acids. Antimicrobial Activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Mandioca – A: raízes da cultivar BRS Tapioqueira; B: Lavoura.
..... 31
- Figura 2** - Produção de amido de mandioca por estados no Brasil em 2013.
..... 33
- Figura 3** - Mapa de distribuição da produção de mandioca no Estado de Santa Catarina – área plantada (ha)..... 34
- Figura 4** - Processo de produção de amido de mandioca fermentado..... 36

CAPÍTULO 2

- Figura 1** - Dados experimentais para o crescimento microbiano de *S. aureus* na presença de diferentes ácidos orgânicos nas primeiras 6 h e durante 48 h. A: Ácido láctico; B: Ácido acético; C: Ácido propiônico; D: Ácido butírico e E: Mix (solução composta pelos quatro ácidos em estudo, na mesma concentração). 73
- Figura 2** - Dados experimentais para o crescimento microbiano de *E. coli* na presença de diferentes ácidos orgânicos nas primeiras 6 h e durante 48 h. A: ácido láctico; B: ácido acético; C: ácido propiônico; D: ácido butírico e E: *mix* (solução composta pelos quatro ácidos em estudo, na mesma concentração). 78
- Figura 3** - Teste de difusão em ágar para *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) após 48 h de incubação a 35 °C..... 83
- Figura 4** - Dados experimentais do crescimento microbiano de *S. aureus* na ASFAM nas primeiras 6 h e durante 24 h..... 85
- Figura 5** - Dados experimentais do crescimento microbiano de *E. coli* na ASFAM nas primeiras 6 h e durante 24 h..... 86

CAPÍTULO 3

- Figura 1** - Dados experimentais para o crescimento micelial de *B. cinerea* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 112
- Figura 2** - Dados experimentais para o IVCM de *B. cinerea* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 114
- Figura 3** - Dados experimentais para o crescimento micelial lateral de *B. cinerea* sobre a área da placa com diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 116
- Figura 4** - Dados experimentais para o crescimento micelial de *M. fructicola* sobre a área da placa com diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 118
- Figura 5** - Dados experimentais para o IVCM de *M. fructicola* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 120
- Figura 6** - Dados experimentais para o crescimento micelial lateral de *M. fructicola* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 122
- Figura 7** - Dados experimentais para o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* sobre a área da placa com diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 124
- Figura 8** - Dados experimentais para o IVCM de *C. gloeosporioides* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 126
- Figura 9** - Dados experimentais para o crescimento micelial lateral de *C. gloeosporioides* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos. 128

CAPÍTULO 4

- Figura 1** - Cassava starch fermentation tank. 140
- Figura 2** - Scanning electron micrography of a native cassava starch granule (A): I - 1000X e II - 2000X and sour cassava starch granule (B): I and II - 2000X. 145
- Figure 3** - Scanning electron micrography of maltodextrin DE5 - 500X (A) e DE15 - 450X (B). 146
- Figura 4** - Scanning electron micrography of maltodextrin and solids of the fermentation wasterwater of P1 - São João do Sul (A): I - DE5 (900X) e II -

DE15 (3000X), maltodextrin and solids of the fermentation wastewater of P2 - Ibirama (B): I - DE5 (1000X) e II - DE15 (500X) and maltodextrin and solids of the fermentation wastewater of P3 - Agronômica (C): I - DE5 (1000X) e II - DE15 (400X). Samples were dried in spray dryer using maltodextrin as support..... 147

CAPÍTULO 5

Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas através da evaporação da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM), de diferentes produtores em *spray dryer*, utilizando como carga maltodextrina com diferentes DE. 167

Figura 2 - Efeito das suspensões produzidas a partir da água de fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina, com a concentração de sólidos de 10 vezes a da água de origem, bem como somente destas águas sobre a percentagem de germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*. 18;

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos ácidos orgânicos láctico, acético, propiônico, butírico e *Mix* (solução composta pelos quatro ácidos em estudo, na mesma concentração) sobre *S.aureus* e *E.coli*, após 48 h de incubação a 35 °C. ...70

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana da ASFAM sobre *S. aureus* e *E. coli*84

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Delineamento experimental para verificar a ação antimicrobiana das ASFAMs e dos padrões dos ácidos orgânicos estudados 103

Tabela 2 - Acidez, pH, sólidos totais e sólidos solúveis das águas de fermentação dos amidos de mandioca (ASFAM) oriundas de três produtores do Estado de Santa Catarina..... 106

Tabela 3 - Concentração (mg L^{-1}) de ácidos orgânicos em amostras de água de fermentação de amido de mandioca coletadas em polvilharias do Estado de Santa Catarina. 107

Tabela 4 - Germinação conidial de *B. cinerea*, *M. fructicola* e de *C. gloeosporioides* (%) incubados nas ASFAMs ou nos ácidos orgânicos. .. 111

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - The acidity, pH and total solids of the cassava starch fermentation wastewater obtained from three producer regions in Santa Catarina State. 143

CAPÍTULO 5

Tabela 1 - Efeito de diferentes micropartículas, produzidas a partir da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina no crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *C. gloeosporioides*..... 17;

Tabela 2 - Efeito de diferentes micropartículas, produzidas a partir da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina na germinação conidial de *Colletotrichum gloeosporioides* 162

Tabela 3 - Efeito das suspensões produzidas a partir da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina, em diferentes concentrações, sobre o diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum gloeosporioides*. 169

Sumário

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	25
OBJETIVOS.....	27
Objetivo geral.....	27
Objetivos específicos.....	27
CAPÍTULO 1 - Revisão Bibliográfica.....	29
1.1 A cultura da mandioca.....	31
1.2 Processo fermentativo do amido de mandioca.....	34
1.3 Antimicrobianos naturais.....	39
1.4 Perdas pós-colheita de frutas.....	42
1.4.1 Fungos Fitopatogênicos.....	44
1.5 A utilização de maltodextrina como agente encapsulante.....	45
1.6 Secagem por atomização.....	46
REFERÊNCIAS.....	48
CAPÍTULO 2 - ÁGUA DE FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA COMO ANTIMICROBIANO NATURAL.....	59
Resumo.....	61
Abstract.....	62
1 INTRODUÇÃO.....	63
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	64
2.1 Material.....	64
2.2 Métodos.....	65
2.2.1 Caracterização físico-química da amostra.....	65
2.2.2 Atividade antimicrobiana.....	66
2.2.2.1 Experimento 1: CMI, CMB e Curva de Crescimento de <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> frente a diferentes ácidos orgânicos.....	66
2.2.2.2 Experimento 2: Identificação do potencial antimicrobiano da ASFAM.....	67
- Método de difusão em Agar.....	67
- Método de crescimento em caldo.....	68
3 RESULTADOS.....	68
3.1 Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca.....	68

3.2 Experimento 1: CMI, CMB e Curva de Crescimento de <i>S. aureus</i> e <i>E. coli</i> frente a diferentes ácidos orgânicos	69
3.3 Experimento 2: Identificação do potencial antimicrobiano da ASFAM.	83
4 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS	88

CAPÍTULO 3 -INIBIÇÃO IN VITRO DE *Botrytis cinerea*, *Monilinia fruticola* E *Colletotrichum gloeosporioides* PELAS ÁGUAS SOBRENADANTES DA FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA E SEUS ÁCIDOS ORGÂNICOS..... 93

Resumo	95
Abstract.....	97
1 INTRODUÇÃO.....	99
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1 Material	100
2.2 Métodos.....	101
2.2.1 Caracterização físico-química das ASFAMs	101
2.2.2 Preparo Das Soluções Com Os Padrões Dos Ácidos Orgânicos Para Os Testes Antifúngicos.....	102
2.2.3 Obtenção e isolamento dos patógenos	102
2.2.4 Identificação do potencial antimicrobiano das ASFAMs e dos padrões dos ácidos orgânicos encontrados neste material	103
2.2.5 Análises.....	103
2.2.5.1 Germinação conidial.....	103
2.2.5.2 Crescimento micelial	104
2.2.5.3 Crescimento micelial lateral	105
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
3.1 Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca.....	105
3.2 Identificação do potencial antimicrobiano da ASFAM	107
4 CONCLUSÕES.....	130
REFERÊNCIAS	130

CAPÍTULO 4 - CHARACTERISTICS OF CASSAVA STARCH FERMENTATION WASTEWATER BASED ON STRUCTURAL DEGRADATION OF STARCH GRANULES..... 135

Abstract.....	137
Resumo	138

1 INTRODUCTION	139
2 MATERIALS AND METHODS.....	141
2.1 Materials	141
2.2 Methods	142
2.2.1 Scanning electron microscopy	142
2.2.2 Physicochemical properties	142
2.3 Statistical analysis.....	142
3 RESULTS AND DISCUSSION.....	142
4 CONCLUSION	148
ACKNOWLEDGMENTS	148
REFERENCES	148

CAPÍTULO 5 - OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MICROPARTÍCULAS ORIUNDAS DA ÁGUA DE FERMENTAÇÃO DA PRODUÇÃO DO POLVILHO AZEDO ATOMIZADAS EM SPRAY DRYER, UTILIZANDO-SE MALTODEXTRINA COMO CARGA 153

Resumo	155
Abstract.....	156
1 INTRODUÇÃO.....	157
2 MATERIAL E MÉTODOS	158
2.1 Obtenção das micropartículas	159
2.2 Análises físico-químicas das ASFAMs.....	159
2.3 Análise de microscopia eletrônica de varredura nas micropartículas	159
2.4 Análises antimicrobianas	15:
2.4.1 Delineamento experimental: crescimento de <i>C. gloeosporioides</i>	15:
2.4.2 delineamento experimental: germinação de <i>C. gloeosporioides</i>	162
2.4.3 Preparo das suspensões	163
2.4.4 Análises.....	163
2.4.4.1 Índice de velocidade de crescimento micelial.....	163
2.4.4.2 Germinação conidial	164
2.4.5 Estatística	165
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	165
3.1 Caracterização físico-química da ASFAM	165
3.2 Caracterização morfológica das micropartículas das ASFAM ...	165

3.3 Identificação do potencial antimicrobiano das micropartículas das ASFAM	168
4 CONCLUSÕES	172
REFERÊNCIAS	172
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	175

INTRODUÇÃO

A valorização e a minimização de resíduos têm como princípio básico, o conhecimento das características químicas dos mesmos, sustentando aplicações que venham a convertê-los em matérias primas para novos produtos. Dentro dos conceitos das tecnologias limpas, a composição dos resíduos representa importante informação, deixando o sistema de tratamento de resíduos líquidos, sólidos e gasosos com o mínimo do balanço de massa das empresas, maximizando as aplicações para novos produtos e processos (AMANTE, 1997)

O Brasil é um importante produtor tanto de matérias primas amiláceas, quanto de amidos de diferentes fontes. Na produção de amidos os processos empregados são por via úmida, o que representa a geração de milhares de litros de águas residuais por tonelada de amido produzido. Tradicionalmente estas águas são tratadas em sistema de tratamento de efluentes, pelas chamadas tecnologias corretivas ou “*end-of-pipe technologies*”, o que atende às exigências da legislação ambiental, mas não se enquadram nas exigências das tecnologias preventivas e tecnologias limpas.

A produção de mandioca no Brasil está entre as maiores do mundo ocupando a terceira posição mundial. Em 2010, o Brasil produziu 24,35 milhões de toneladas desta raiz (FAO, 2010), sendo os principais Estados produtores o Pará, o Paraná e a Bahia. A fração desta produção de mandioca que foi destinada à extração do amido, no mesmo ano, somou 583,85 mil toneladas, sendo o Paraná responsável por 71% da produção no País.

As águas da produção do amido de mandioca e do polvilho azedo têm sido estudadas com ênfase na poluição, considerando os sólidos solúveis e suspensos com elevada carga orgânica, o que contribui para a demanda química e bioquímica de oxigênio, nestes efluentes. Estudos visando a caracterização destas águas em seu estado natural e também fermentadas, para a utilização em novos compostos, podem representar a geração de soluções a outros setores industriais ou mesmo para o de alimentos.

Comparativamente aos estudos existentes com a manípueira (água residual da produção do amido de mandioca), poucos pesquisadores têm dado atenção às águas da fermentação do amido de mandioca, na produção do polvilho azedo. A justificativa para estes poucos estudos é devido ao incomparável volume de água residual na produção do amido. De acordo

com Siroth et al. (1999), a produção do amido de mandioca consome de 6 a 10 mil litros de água por tonelada de raiz, enquanto no processo fermentativo, de acordo com Avancini et al. (2007), apenas 120 litros por tonelada de amido.

Apesar do volume, as aplicações para as águas da fermentação do polvilho azedo, inexistem. Outro motivo para esta realidade reside no fato de algumas empresas não disporem do processo seguindo a indicação de manter uma lâmina de água de aproximadamente 20 cm (AVANCINI et al., 2007). No entanto, o setor vem sofrendo a concorrência de amidos modificados quimicamente, o que requer maiores cuidados com a qualidade do produto, mantendo as suas tradições, bem como, a necessidade de uma re-engenharia do processo para buscar a valorização destas águas, que segundo Avancini et al. (2007), podem ser importante alternativa de renda para o setor.

Um exemplo de provável aplicação para estas águas pode ser a proteção de frutas frescas, uma vez que alguns trabalhos já demonstraram (DEMIATE et al., 1999; CÉ, 2009; REGINATTO et al., 2009) que da fermentação predominantemente ácido láctica, alguns compostos antimicrobianos, além dos ácidos orgânicos são produzidos.

O Brasil é um importante produtor e exportador de frutas, sendo o terceiro maior polo produtor mundial, com uma produção anual de cerca de 39,29 milhões de toneladas (FAO 2012), e sofre grandes prejuízos devido às perdas tanto por danos mecânicos quanto por doenças causadas por micro-organismos (RINALDI, 2011). A preocupação com a saúde e com o meio ambiente leva a novas demandas por materiais de origem natural como protetores destas culturas.

Artigos científicos e patentes registradas sobre filmes bioativos com base polimérica sintética ou com base biodegradável como matriz para agentes de defesa sintéticos são abundantes. No entanto, nenhum trabalho foi encontrado usando as águas residuais da fermentação do amido de mandioca, como fonte de compostos antimicrobianos. Caracterizar quimicamente estas águas, avaliar a capacidade antimicrobiana e estudar a sua viabilidade de aplicação representa uma importante contribuição para estudos sobre proteção de frutas.

Tendo em vista este cenário, o presente trabalho propõe a valorização das águas residuais da produção do polvilho azedo, com propriedades antimicrobianas que podem ser aplicadas na proteção de alimentos

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar as propriedades funcionais e aplicações dos sólidos solúveis e suspensos das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca (ASFAM).

Objetivos específicos

- Caracterizar a ASFAM, quanto aos ácidos orgânicos presentes e avaliar a sua atividade antimicrobiana sobre *E. coli* e *S. aureus*.
- Caracterizar as ASFAMs de diferentes origens quanto aos ácidos orgânicos presentes e avaliar a atividade antifúngica sobre *C. gloeosporioides*, *M. fructicola* e *B. cinérea*.
- Obter e caracterizar microscopicamente os concentrados elaborados a partir da ASFAM de diferentes polvilharias do Estado de Santa Catarina, através do uso de maltodextrinas como carga e secos em *spray dryer*.
- Verificar o efeito dos concentrados de ASFAMs de diferentes origens obtidos em *spray dryer*, através do uso de maltodextrinas, com diferentes DEs, sobre *C. gloeosporioides in vitro*.

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1.1 A cultura da mandioca

A *Manihot esculenta* Crantz, conhecida como mandioca, macaxeira, aipim ou tapioca no Brasil, como *cassava* em países que falam inglês, *como yuca* na América Latina (espanhol) e como *manioc* em países africanos (francês), é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família das Euforbiáceas (Figura 1). A parte mais importante da planta é a raiz. Rica em amido, utilizada na alimentação humana e animal ou como matéria prima para diversas indústrias. Originária da América do Sul, provavelmente do Brasil, a mandioca já era cultivada pelos índios, por ocasião da descoberta do país. É considerada um dos principais alimentos energéticos, para cerca de 500 milhões de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde é cultivada em terras marginais por agricultores carentes, muitos deles, mulheres, em pequenas áreas com solos pobres e com baixo nível tecnológico. E para estas pessoas a produção de mandioca é vital garantindo a segurança alimentar das suas famílias e a geração de renda (FAO, 2016, EMBRAPA, 2013; FILHO; BAHIA, 2013).

Figura 1 - Mandioca – A: raízes da cultivar BRS Tapioqueira; B: Lavoura.



Fonte: EMBRAPA (2013).

De fácil adaptação, a mandioca é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do País, em termos de área cultivada, sendo o sexto em valor de produção (EMBRAPA, 2013).

A produção mundial de mandioca foi de 280 milhões de toneladas em 2013. O continente africano foi responsável por 57,1 % desta produção,

seguido pelo asiático (32,5 %) e pelo sul americano (14,5 %). A Nigéria é o país com a maior produção mundial (19,5 %), seguido pela Tailândia (10,9 %) e Indonésia (8,6 %) enquanto o Brasil é o quarto maior produtor mundial respondendo por 7,7 % da produção mundial (FAO, 2014).

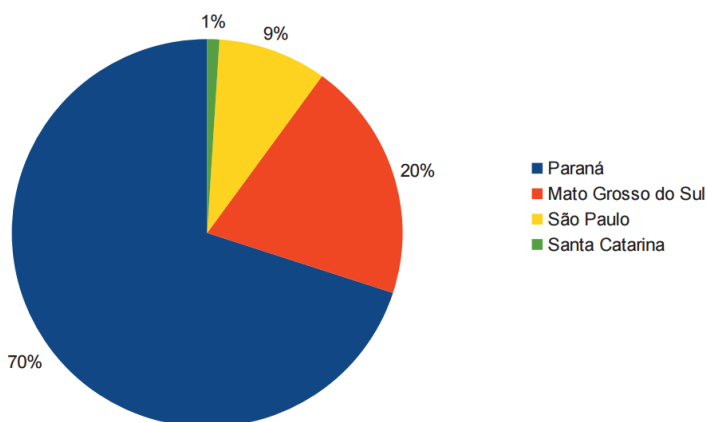
A produtividade média mundial cresceu à taxa de 1,3 % a.a. entre 1990 e 2008. No mesmo período, a Tailândia teve um incremento de 3,0 % a.a., enquanto que no Brasil o crescimento foi de 0,8 % a.a. (FAO, 2010). A Tailândia, principal produtor e exportador de amido de mandioca tem investido nos últimos anos para elevar os níveis de produtividade (FELIPE; ALVES; CAMARGO, 2010).

Diferentemente da Ásia, que possui uma produção com a finalidade industrial, da África e de países da América do Sul como a Bolívia, Colômbia e Paraguai, onde a mandioca tem como finalidade a subsistência, no Brasil, além de o produto ser base alimentar, consumido na forma *in natura* ou processado, também é uma importante matéria prima agroindustrial para a indústria de amido e farinha de mandioca se destacando a industrialização em grande escala, principalmente com as fecularias do Centro-Sul do país (FELIPE; ALVES; CAMARGO, 2010).

Em 2015 a produção brasileira foi estimada em mais de 22,7 milhões de toneladas (Tabela 1) e em 2016 estima-se uma pequena redução (0,2%), devido aos estoques elevados de farinha e amido no Centro-Sul do país (IBGE, 2016). Esta raiz é explorada comercialmente para diversos fins, dentre os quais a extração de amido ou fécula para a produção de amido de mandioca fermentado (polvilho azedo). A distribuição da produção brasileira com a cultura da mandioca nos estados brasileiros se dá principalmente no Pará (18,74 %), no Paraná (16,36 %) e na Bahia (13,09 %). A fração desta produção que foi destinada a extração do amido, no mesmo ano, somou 583,85 mil toneladas (IBGE, 2010). Estima-se que, no Brasil, são gerados um milhão de empregos diretos, considerando-se a fase de produção primária e o processamento das raízes de mandioca.

A indústria de amido de mandioca tem como característica a grande concentração da produção em poucos estados, como é possível observar na Figura 2. No ano de 2011, o Estado do Paraná produziu 70 % do amido da produção brasileira, seguido por Mato Grosso do Sul (20 %), São Paulo (9 %) e Santa Catarina (1%).

Figura 2 - Produção de amido de mandioca por estados no Brasil em 2013.



Fonte: CEPEA (2015).

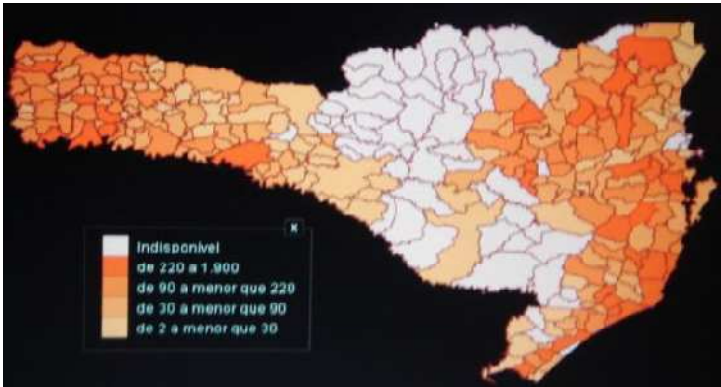
No Estado de Santa Catarina o cultivo de mandioca é realizado em, aproximadamente, 32.000 ha distribuídos em 235 dos seus 293 municípios (Figura 3). A agricultura familiar abrange 90 % da produção, que é beneficiada em aproximadamente 400 unidades industriais distribuídas por 53 municípios. Essas unidades produzem, por ano, 45.000 toneladas de farinha, 12.500 toneladas de amido fermentado e 26.000 toneladas de fécula. Esse setor gera 8 mil empregos diretos no Estado. Com uma produção no valor de 200 milhões de reais, produz 10 milhões de reais em impostos, somente na venda de raízes e no beneficiamento primário (IBGE, 2008; EPAGRI, 2009).

Inúmeros são os produtos fabricados a partir da mandioca. Marcon (2009) citou alguns: farinha de mesa, farinha panificável, polvilho doce e azedo (matéria prima para pães de queijo), biscoitos, massas alimentícias e panificáveis (macarrão, pão, bolachas e bolos), espessantes em sopas, pudins, alimentos infantis, sagu, tapioca, indústrias de carne e embutidos (presunto, salame e mortadela), xaropes de glicose, dextrinas, maltose, maltodextrinas, amidos pré-gelatinizados, oxidados, esterificados, glutamato de sódio, lisina, ácido cítrico, ácido láctico, manitol, sorbitol produtos de cervejarias, bebidas fermentadas, plástico biodegradável, na indústria de papel (dar corpo, acabamento, goma e firmeza do papel), têxteis (engomagem estamperia, espessante de corantes, acabamento, firmeza dos tecidos, lavanderia), ligas cerâmicas, fundições, mineração,

adesivos, tintas, cosméticos, medicamentos, explosivos, indústrias petrolíferas, produção de álcool.

Apesar de serem abundantes os trabalhos realizados com derivados da mandioca, trabalhos buscando a valorização das águas utilizadas no processamento do amido de mandioca fermentado, são raros.

Figura 3 - Mapa de distribuição da produção de mandioca no Estado de Santa Catarina – área plantada (ha).



Fonte: IBGE (2008).

1.2 Processo fermentativo do amido de mandioca

Na legislação brasileira, polvilho ou fécula de mandioca é tido como o produto amiláceo extraído de mandioca, sendo classificado em doce ou azedo, de acordo com a acidez titulável. A acidez deve ser de no máximo 1,0 mL de NaOH mol L⁻¹/100g para polvilho doce e de 5,0 mL de NaOH mol L⁻¹/100g para polvilho azedo (BRASIL, 1978).

O amido de mandioca fermentado (conhecido no Brasil como polvilho azedo, em países Latinos como *almidón agrio* e em países de língua inglesa como *sour cassava starch*) é produzido a partir do amido de mandioca.

O processo de extração do amido, qualquer que seja a técnica empregada, consiste na colheita ou recebimento das raízes, lavagem, descascamento, cominuição e/ou ralação e prensagem da massa sob água corrente. Deste modo, ocorre a liberação dos grânulos de amido, sendo

então extraídos com água, separando-se as fibras das partículas solúveis (EL-DASH; MAZZARI; GERMANI, 1994).

Para isso é muito importante que as fecularias tenham disponibilidade de água com qualidade. A água deve ser potável e isenta de minerais, principalmente sais de ferro, para que o amido produzido seja claro e livre de contaminação (EL-DASH; MAZZARI; GERMANI, 1994).

O amido de mandioca submetido à fermentação natural origina o polvilho azedo (Figura 4). Este processo ocorre em tanques de fermentação (aproximadamente 10 a 20 m³), onde o amido é imerso em água deixando-se uma camada superficial de aproximadamente 20 cm de altura por um período que pode variar de 30 a 90 dias (AVANCINI, 2007). O final do processo é empírico e dá-se pelo aparecimento de espuma e bolhas no interior da massa. Após a etapa de fermentação, o polvilho é colocado para secar ao sol.

Devido ao empirismo adotado na produção deste produto Gomes, Silva e Ricardo (2005) indicam para a existência de irregularidades nas características do amido fermentado que podem ser causadas pelos diferentes períodos de fermentação utilizados.

O processo fermentativo inicia com a produção de açúcar por micro-organismos a partir da hidrólise do amido, esta etapa pode ser acelerada com a adição de glicose (MARCON, 2004; MARCON et al., 2006).

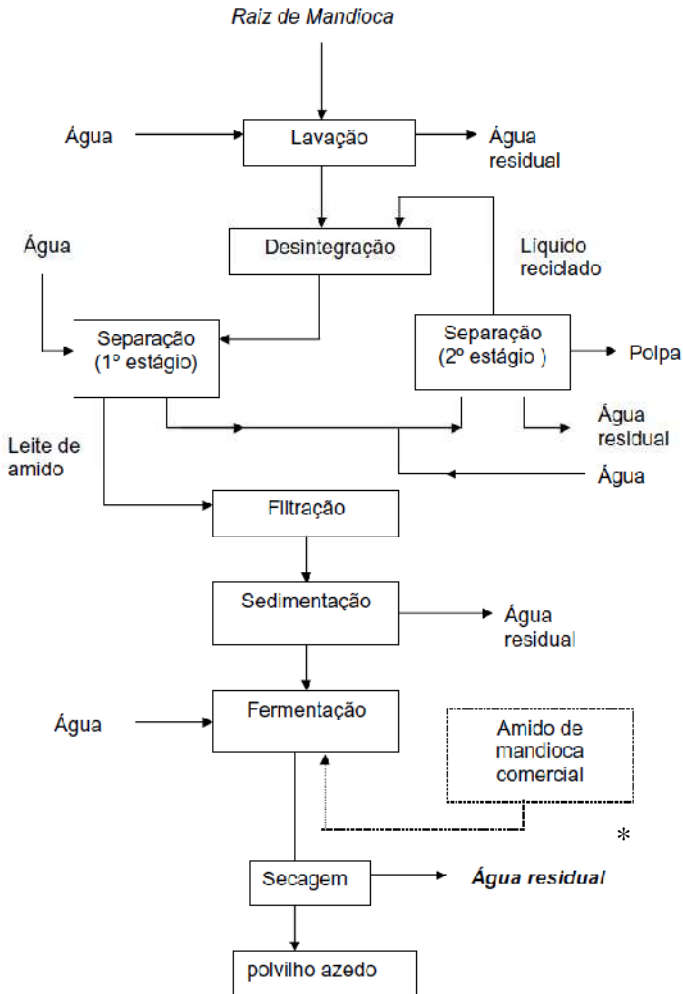
Dentre os micro-organismos presentes no processo de fermentação do polvilho azedo predominam as bactérias ácido-láticas, sobretudo o gênero *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. manihotvorans*), seguido por *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcaceae* *Lactococcus* (MORLON-GUYOT et al., 1998; SILVEIRA et al., 2003; LACERDA et al., 2005).

Estes micro-organismos são conhecidos pela produção de ácidos orgânicos e compostos aromáticos, vitaminas entre outras substâncias durante o processo. *L. plantarum* é conhecido por produzir substâncias antimicrobianas (plantaricina) que são ativas contra determinados agentes patogênicos e algumas cepas que atualmente são comercializadas como probióticos (DE VRIES et al., 2006).

Figura 4 - Processo de produção de amido de mandioca fermentado

(adaptado de Marder et al., 1996)

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



* Água Sobrenadante da Fermentação do Amido de Mandioca (ASFAM) – Material estudado neste trabalho.

Fonte: Avancini (2007).

Durante a fase de fermentação do amido as suas características são modificadas (GOMES; SILVA; RICARDO, 2005). Nesta fase é comum os produtores utilizarem o amido da safra anterior para produzir o polvilho azedo na entressafra. (CEREDA, 1987; WESTBY; CEREDA, 1994; CARVALHO et al., 1996). Após a fermentação, ocorre a diminuição da temperatura de pasta e do pico de viscosidade, em relação ao polvilho doce (CEREDA, 1983).

Para Nakamura e Park (1975), citados por Gomes, Silva e Ricardo (2005) os objetivos principais da fermentação são acrescentar valor nutricional, diminuir a toxicidade e dar ao produto propriedades e aroma característico. Este produto tem servido de matéria prima para a produção de pães e biscoitos sem glúten em vários estudos (MESTRES; ROUAU, 1997; DEMIATE et al., 1999; GUYOT; MORLON-GUYOT, 2001; BALAGOPALAN, 2002), sendo indispensável na fabricação do biscoito de polvilho e do pão de queijo (BIAZOTTO, 2008).

O “polvilho azedo” é o amido modificado mais utilizado para a fabricação de alimentos no Brasil e de suas inúmeras aplicações. A expansão do consumo se deve a uma de suas principais aplicações, a elaboração do pão de queijo, que obteve grande penetração no segmento de *fast food* e vem conquistando espaços em mercados internacionais. No entanto, o processo de produção ainda é “artesanal” e lento, o que o torna um produto caro, porém possui características exclusivas, apesar de irregulares. Neste contexto, o setor polvilheiro está enfrentando uma nova dificuldade que é a competição com amidos modificados quimicamente. Por isso, a importância de estudar os processos na tentativa de encontrar alternativas que possam gerar novos produtos e soluções para este setor.

Poucos são os trabalhos envolvendo a água da fermentação do polvilho azedo. Até a realização dos trabalhos de Avancini (2007), Biazotto (2008), Kurtz (2009) e Reginatto (2009) as propriedades deste material eram desconsideradas, sendo tido como um efluente industrial com elevada carga orgânica.

No entanto, sob os conceitos das Tecnologias Limpas todo o potencial das matérias primas e intermediários em processos industriais deve ser valorizado visando à minimização de resíduos. Esta visão vem mudando a realidade dos resíduos agroindustriais, sendo convertidos em matérias primas ou em produtos, segundo a sua caracterização química (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003).

Segundo Biazotto (2008) a água da fermentação do amido de mandioca constitui-se em um líquido transparente, com aparência similar à

água de coco. Os sólidos solúveis e em suspensão presentes neste resíduo agroindustrial são provenientes do processo de fermentação do amido, hidrólise enzimática e utilização dos produtos de hidrólise.

Oyewole (2001) estudou as leveduras que se encontram na água de fermentação durante todo o processo. Constatou que na etapa inicial há predominância das seguintes cepas: *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *Pichia saitoi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. anomala* e *Zygosaccharomyces bailii*. Mais tarde, no final da fermentação, há predominância de três cepas *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Z. bailii*. O autor verificou que as leveduras têm um papel importante na sobrevivência e na atividade das bactérias produtoras de ácido láctico durante o processo de fermentação da mandioca, uma vez que estão envolvidas na hidrólise do amido, transformando em açúcares simples, os quais são convertidos em ácidos orgânicos pelas bactérias ácido-láticas.

Demiato et al. (1999) estudaram o amido de mandioca fermentado comercial verificando que os ácidos orgânicos predominantes, neste produto, são os ácidos láctico, butírico, acético e propiônico. O ácido láctico corresponde a cerca de 60 a 80 % do total de ácidos. Reginatto et al. (2009) analisaram a presença de ácidos na água, encontrando os ácidos acético, láctico e propiônico.

Avancini (2007) estudou a água residual da fermentação, obtida através de processo realizado em laboratório e em polvilharia, quanto às características químicas, microbiológicas e toxicológicas. Verificou que esta água possui uma baixa quantidade de sólidos totais, variando entre 1.700 a 6.000 mg.L⁻¹) e consequentemente de nutrientes, apresentando as seguintes características químicas: pH entre 3,0 e 3,7; índice de acidez de 21 a 68 mL de NaOH mol L⁻¹100mL⁻¹; 0,19 a 0,62 g de ácido láctico.100 mL⁻¹. Caracterizou, microbiologicamente, ao final do processo obtendo uma contagem de bactérias lácticas de 5,27 a 7,84 log UFC.mL⁻¹, de bactérias mesófilas totais de 6,39 a 8,02 log UFC.mL⁻¹ e bolores e leveduras de 5,92 a 6,99 log UFC.mL⁻¹. Verificou uma baixa toxicidade aguda em camundongos, que alimentados durante 21 dias com concentrações de até 100 % das águas da fermentação não apresentaram sinais de alteração clínica e nem hematológicos significativos.

Kurtz (2009) estudando a água de fermentação do amido de mandioca, através da análise IR-FTIR, identificou a presença de diferentes radicais comparados aqueles contidos nas cadeias de amilose e de amilopectina. Grupos carbonílicos e carboxílicos foram identificados,

comprovando o efeito da fermentação nos sólidos solúveis e suspensos da água residual da fermentação.

Apesar do provável valor agregado que os sólidos totais presentes nestas águas, em torno de 0,2 %, podem vir a apresentar, são necessários que os processos de evaporação sejam estudados visando adequar este material para novas aplicações. Uma alternativa pode ser o uso de cargas, para além de incrementar o teor de sólidos na água, buscar a proteção destas partículas e a valorização deste material.

1.3 Antimicrobianos naturais

O controle de patógenos em pós-colheita de frutas e hortaliças, sem o uso de agrotóxicos, tem sido estudado como uma forma alternativa ao uso dos mesmos. O interesse por métodos de controle ambientalmente seguros e biodegradáveis, está aumentando e ganhando atenção considerável (TRIPATHI; DUBEY, 2004).

As substâncias antimicrobianas naturais constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. As plantas produzem um amplo número de substâncias com potencial antimicrobiano, podendo ser eles isoflavonóides, indóis, fitoesteróis, polissacarídeos, ácidos, sesquiterpenos, alcalóides, glucanas, taninos, vitaminas e minerais. Estas substâncias, em pequenas concentrações, devem possuir atividade letal ou inibitória, prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes, não apresentarem efeitos indesejáveis ao hospedeiro e devem ser estáveis quimicamente (COWAN, 1999).

Um método que tem obtido sucesso no controle de fitopatógenos, em diferentes frutas e hortaliças aumentando a vida útil destes produtos, é a aplicação de revestimentos biodegradáveis com ação antimicrobiana (GUERRA, 2005; PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005; CÉ, 2009; RITA et al., 2011)

Os revestimentos podem atuar nos alimentos como carreadores de agentes com função específica como antioxidante, antimicrobiana, corante, aromática, entre outras. Inúmeras são as pesquisas que têm gerado informações a respeito do potencial de uso dos revestimentos incorporados de agentes ativos para a manutenção e prolongamento da vida útil de alimentos, podendo ser, estes agentes, de diversas origens, tanto vegetal como animal (PENA; TORRES, 1991; NATRAJAN; SHELDON, 2000; OUSSALAH et al., 2004; GUERRA et al., 2005; PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005; SATHIVEL, 2005; SINGH et al., 2006; MIN;

KROCHTA, 2007; GERALDINE et al., 2008; JOFRÉ; AYMERICH; GARRIGA, 2008; ROJAS-GRAÜ; TAPIA; MARTIN-BELLOSO, 2008; SOARES et al., 2008).

Os revestimentos antimicrobianos estão divididos em dois grupos: sistêmicos e de contato. No primeiro, o agente migra para o interior do produto, enquanto no segundo eles são efetivos contra o crescimento microbiano superficial. Em ambos, o contato entre o produto e o agente antimicrobiano é essencial (VERMEIREN; DEVLIEGHERE; DEBEVERE, 2002).

Diversos estudos já foram realizados com filmes ou revestimentos incluídos de ácidos orgânicos e seus sais, sulfitos, nitritos, antibióticos, alcoóis, enzimas e compostos naturais como óleos essenciais e bacteriocinas, especialmente a nisina (NATRAJAN; SHELDON, 2000; GUERRA et al., 2005; PRANOTO; SALOKHE; RAKSHIT, 2005; SINGH et al., 2006; JOFRÉ; AYMERICH; GARRIGA, 2008; CÉ, 2009).

Estudos de derivados do amido de mandioca, conforme publicado por Avancini et al. (2007) e estudado por Kurtz (2009) e Aquino (2015) podem ser promissores para a proteção de frutos pós-colheita. No ambiente de fermentação do amido de mandioca predominam leveduras e bactérias ácido-láticas, sendo que estas exercem atividade antimicrobiana, que estão ligadas a produção de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil e antimicrobianos como reuterinas e bacteriocinas (ADAMS, 1999; CAPLICE; FITZGERALD, 1999; O'SULLIVAN; ROSS; HILL, 2002).

Segundo Reginatto et al. (2009), os ácidos orgânicos que predominam na água residual da fermentação do polvilho azedo são os ácidos láctico, acético e propiônico. Outros ácidos são comuns nas fermentações ácido-láticas como o ácido butírico (DEMIATE et al., 1999). Cereda e Gaj-Lavra (1987) e Silveira et al. (2000) verificaram que a predominância de determinado ácido orgânico é dependente de fatores climáticos, entre eles a temperatura. Em regiões frias a fermentação é mais lenta e predomina a microbiota láctica, enquanto que em regiões quentes, a fermentação é mais rápida e predomina a butírica.

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, inibindo o transporte ativo. O ácido acético é mais inibidor que o láctico podendo inibir leveduras, fungos e bactérias, enquanto o ácido

propiónico pode inibir fungos e bactérias (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Cia (2005) estudou o efeito do ácido acético no desenvolvimento de *C. Gloeosporioides* e verificou através de análises *in vivo* e *in vitro* que este ácido inibe o crescimento micelial e a germinação dos conídios, reduzindo a incidência e a severidade da antracnose em frutos de mamão.

Segundo Caplice e Fitzgerald (1999) a ação antimicrobiana exercida pelos acetaldeído, diacetil e pelo etanol pode ser considerada mínima devido às suas baixas concentrações nestes produtos. No entanto, atribuem à falta de catalase, nestes sistemas, que é responsável pela quebra do peróxido de hidrogênio ao acúmulo desta substância que é gerada na presença de oxigênio, o que poderia inibir alguns micro-organismos pelo forte efeito oxidante nas membranas lipídicas e proteínas celulares (CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

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

As reuterinas, que não são autorizadas para uso no Brasil, 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).

As bacteriocinas são consideradas peptídeos biologicamente ativos, sendo consideradas como substâncias primárias liberadas extracelularmente ou como produtos modificados da síntese ribossomal das bactérias, que apresentam atividade antimicrobiana. O alvo das bacteriocinas é a membrana citoplasmática das bactérias, onde se ligam a receptores específicos (TAAG; DAJANI; WANNAMAKER, 1976; CAPLICE; FITZGERALD, 1999).

Levando em consideração as substâncias produzidas durante a fermentação do amido de mandioca e a importância da cultura e de sua industrialização no Brasil, mais pesquisas envolvendo os seus derivados são necessárias para o desenvolvimento da ciência e evolução do setor.

1.4 Perdas pós-colheita de frutas

Produtos agrícolas perecíveis, a exemplo das frutas tropicais, têm sua vida útil reduzida quando comparados aos duráveis (grãos e cereais), por apresentarem elevado teor de umidade, textura macia facilmente deteriorável e altas taxas respiratórias e de produção de calor. Essas características geram desvantagens quanto ao seu manuseio após a colheita, resultando em perdas decorrentes da falta de comercialização ou de consumo do produto em tempo hábil. Essas perdas podem ocorrer em todas as etapas da cadeia e dependem, principalmente, da perecibilidade, técnicas de cultivo, tipo de embalagem utilizada, meio de transporte e o mercado no qual o produto será comercializado. Perdas apenas na fase de pós-colheita para produtos com mais durabilidade estão na faixa de 5 a 30 %, enquanto que para produtos hortícolas esse número se encontra entre 15 e 100 % (CHITARRA; CHITARRA, 2005). As perdas na pós-colheita também podem ser atribuídas à baixa qualificação da mão de obra dos operadores envolvidos na recepção, movimentação e conservação dos produtos.

No Brasil, estima-se que, entre a colheita e a chegada à mesa do consumidor, ocorram perdas de até 40 % das frutas e hortaliças produzidas. Essas perdas podem ser de natureza quantitativa ou qualitativa, ocasionando assim redução no seu valor comercial (RINALDI, 2011).

Segundo Chitarra e Chitarra (2005), perda significa redução na disponibilidade do alimento para o consumo, o que corresponde à redução na quantidade física do produto alimentício de origem animal ou vegetal. O conceito de “perda de alimento” pode estar associado a diferentes fatores, tais como: perda por peso, devido à transpiração do produto vegetal; perda da qualidade, o que acarreta rejeição tanto do varejista quanto do consumidor no momento da compra; e perda de valor nutricional do produto devido a técnicas inadequadas de armazenamento e/ou manuseio incorreto.

De acordo com Chitarra e Chitarra (2005) as causas primárias, aquelas que afetam diretamente o alimento, podem ser classificadas nos seguintes grupos:

- a) biológicas - consumo do alimento por animais de maior porte, o que causa o desaparecimento direto do alimento;
- b) microbiológicas - danos por fungos e bactérias nos alimentos armazenados.

c) químicas - produtos utilizados na produção, beneficiamento ou processamento que venham a alterar o sabor do produto e/ou a sua constituição.

d) mecânicas - corte, amassado e abrasões.

e) físicas - causadas por excesso de calor ou frio e umidade inadequada.

f) fisiológicas - perdas naturais causadas pelo metabolismo do produto vegetal.

O controle das alterações pós-colheita é importante para o mercado interno e também para exportação. Jacomino et al. (2002) relataram que os principais fatores que depreciam a qualidade pós-colheita do mamão, por exemplo, são o rápido amolecimento e a elevada incidência de podridões, por serem produto altamente perecíveis e delicados.

Frutos com baixo pH na polpa, elevada umidade e composição nutricional, são muito susceptíveis ao ataque por fungos, que causam podridões e, em muitos casos, a produção de micotoxinas (MOSS, 2002).

Em frutas, como o morango, que são altamente perecíveis, as perdas na pós-colheita podem ser superiores a 50 %. Além das perdas devido ao metabolismo acelerado, que este possui, e aos danos físicos por ser uma fruta muito delicada, o morango é muito suscetível ao ataque de fungos, bactérias, vírus e micoplasmas (CENCI, 2008).

Cappellini, Ceponis e Lightner (1988) realizaram um levantamento em terminais de comercialização em Nova York entre os anos de 1972 e 1985 a respeito das causas de perdas de mamão e damasco. Observaram que as perdas estavam associadas a injúrias mecânicas, estágio de amadurecimento avançado e doenças. Estes autores verificaram que em mamões comercializados, 62 % foram afetados por podridões por antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*), 22 % continham danos na superfície e 48 % estavam em estágio avançado de amadurecimento. Outras causas de perdas incluíram danos causados pelo frio (2 %), amolecimento do fruto (17 %) e outras doenças como a podridão peduncular causada por *Rhizopus*, em 35 % dos frutos comercializados que foram inspecionados. Em damasco, a podridão peduncular por *Rhizopus* atingiu 14 % das frutas estudadas, 62 % sofreram descoloração, 40 % foram afetados por danos físicos e, em 30 % ocorreu o amolecimento.

Devido às doenças causadas por fitopatógenos em frutas e hortaliças apresentarem grande importância, por serem, ainda, grandes responsáveis pela deterioração destes produtos é que é de extrema urgência e importância

o estudo de métodos que reduzam as perdas decorrentes do ataque de fungos.

1.4.1 Fungos Fitopatogênicos

Dentre as causas de perdas de frutas, as doenças fúngicas merecem atenção devido aos danos que podem causar na pós-colheita. O crescimento microbiano em superfícies é a causa mais comum de deterioração de frutas processadas (TORRES; KAREL, 1985). Os fungos mais importantes em frutas tropicais são: *Monilinia fructicola*, *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Gliocladium roseum*, *Sclerotium rolfsii*, *Cladosporium* spp., *Rhizopus* sp., *Mucor*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Phoma* e *Penicillium* (SILVEIRA et al., 2005).

O *Colletotrichum gloeosporioides* causa a doença chamada antracnose em frutíferas, Forma micélio aéreo, com coloração que varia do cinza claro ao cinza escuro. Os conídios são formados em massas de cor salmão, são retos, cilíndricos, de ápice obtuso, base truncada e dimensões de 12-17 x 3,5-6 mm. Esta espécie é muito heterogênea em meio de cultura, especialmente quanto às características miceliais. Conseguem sobreviver em pecíolos e folhas velhas, de onde se disseminam pela chuva ou pelo vento para as flores e frutos novos e permanecem latentes até a maturação dos frutos (TAVARES, 2004).

Dantas et al. (2003) estudaram as perdas pós-colheita de mamão e de laranja causadas por doenças fúngicas na Central de Abastecimento de Recife, PE. Os autores verificaram que os principais patógenos foram o *C. gloeosporioides*, causador da antracnose e da podridão peduncular em mamão e o *Lasiodiplodia*, causador da podridão peduncular em laranja. Os autores concluíram que a grande diversidade de doenças pós-colheita provenientes de infecções latentes e/ou ativas constatadas, sugere a necessidade do emprego de medidas de controle mais efetivas durante as fases de produção e pós-colheita. Incluindo práticas de sanitização e métodos que induzam resistência dos frutos aos patógenos, visando reduzir essas perdas, que podem ser superiores a 75 % na fase de comercialização do mamão e 50 % na de laranja.

O fungo *Monilinia fructicola*, caracteriza-se pela formação de esporos sexuais denominados ascósporos, dentro de uma estrutura chamada asco. Este fungo é o causador da podridão parda, principal doença das frutas de caroço, sendo o patógeno que causa maiores perdas à cultura do pessegueiro.

A podridão parda enquadra-se no grupo das doenças pós-colheita quiescentes sendo extremamente destrutivo, principalmente por causar a morte de flores, atacando também folhas e brotos, além de podridões em frutos tanto no pomar quanto durante a comercialização (CAMPOS et al., 1995). Ocorre em praticamente todos os pomares, causando lesões circulares, marrons e encharcadas com a colonização dos tecidos vizinhos pelo fungo. Com o passar do tempo, os frutos infectados ficam recobertos por esporos de coloração parda acizentada, mantendo-se nos pomares em frutos mumificados, tanto em ramos como no solo (CAMPOS et al., 2005; MARTINS et al., 2005).

O fungo *Botrytis cinérea*, causador da podridão cinzenta em diversos frutos é um dos principais problemas na pós-colheita de morango e uvas no Brasil. Este fungo coloniza as folhas e cálices como um organismo endofítico e, quando, em condições ideais de umidade e temperatura esporula nos tecidos infectando flores e frutos. É mais drástico em frutos maduros, pois este patógeno apresenta uma fase de infecção quiescente, fazendo com que frutos aparentemente sadios na colheita desenvolvam a podridão durante o período de pós-colheita (EMBRAPA, 2012).

Em frutos verdes, os sintomas são caracterizados pela presença de pequenas lesões marrons levemente depressivas. Em frutos maduros, essas lesões tornam-se recobertas por um crescimento acinzentado constituído por estruturas do patógeno, que rapidamente tomam toda superfície do fruto. Com a evolução dos sintomas, os frutos podem apodrecer completamente ou ainda assumir a forma de mumificados (TÓFOLI e DOMINGUES, 2005).

A busca por alternativas para controlar o *Botrytis cinerea* em pós-colheita vai ao encontro das necessidades atuais dos produtores de morango, visto que não existem produtos registrados no Ministério da Agricultura para o controle do mofo cinzento em pós-colheita de morango, o que culmina no uso indevido de agrotóxicos na pré-colheita, gerando pseudofrutos com uma alta concentração de resíduos na etapa de comercialização. Como métodos alternativos estuda-se o uso de compostos naturais ou biodegradáveis, derivados de animais ou plantas, que possuem poder de indução à resistência natural ou poder fungistático. Estes métodos alternativos vêm ganhando destaque e importância entre a comunidade científica e os fitopatologistas (ZAICOVSKI et al., 2006; MAZARO et al., 2008b).

1.5 A utilização de maltodextrina como agente encapsulante

A procura por materiais de fácil solubilidade para a contenção de compostos funcionais coloca os carboidratos como os mais utilizados para encapsulação, graças à sua capacidade de se ligar aos compostos aromáticos, além de sua diversidade e baixo custo (AZEREDO, 2005).

A maltodextrina, $[(C_6H_{12}O_5)_n H_2O]$, consiste em um sacarídeo, não doce, constituído de uma cadeia de unidades de D-glicose unidas por ligações α , 1-4, possuindo dextrose equivalente (DE) entre 3 e 20. Pode ser obtida de diferentes fontes botânicas de amido, através da hidrólise parcial (ALEXANDER, 1992).

Valores de DE menores do que 20 são mais adequadas para a formulação de microcápsulas, já que são menos higroscópicas evitando a aglomeração das partículas (REINECCIUS, 1988). Esta é uma medida essencialmente empírica da quantidade de açúcar redutor presente no produto e é expressa em base seca (ALEXANDER, 1992). Para medir a DE de uma maltodextrina são usados como padrão o amido (DE=0) e a glicose (DE=100) (STORTZ; STEFFENS, 2004). A DE indica o poder de redução, a estabilidade e a funcionalidade da molécula.

Uma importante característica das maltodextrinas é a baixa viscosidade mesmo em concentrações elevadas. Outras características a serem ressaltadas são a propriedade de barreira ao oxigênio e a estabilidade oxidativa, que segundo Anandaraman e Reineccius (1986), é melhorada conforme o aumento do DE da molécula.

As maltodextrinas são encontradas na forma de pó branco ou solução concentrada de sacarídeos com uma ampla distribuição de massas moleculares entre poli e oligossacarídeos. Não possui propriedade emulsificante (hidrofílica e lipofílica). Como encapsulante, forma uma película que protege o material volátil, possui efeito antioxidante, por proteger fisicamente e, retém voláteis na faixa de 65 a 80 % (ASCHERI; MARQUEZ; MARTUCCI, 2003).

Genericamente, uma mistura da maltodextrina indicada e o material a encapsular é seca em sistema de atomização ou *spray dryer*.

1.6 Secagem por atomização

O termo atomização relacionado ao processo de secagem em *spray drier* é devido à divisão da solução ou suspensão em milhões de partículas individuais formando uma névoa ou “spray” dentro da câmara de secagem. Durante o contato entre as gotículas e o ar aquecido ocorre um rápido

processo de evaporação a partir das superfícies das partículas (MASTERS, 1979).

A secagem por *spray drying* é a técnica mais empregada para a obtenção de micropartículas. Consiste em um processo contínuo onde, em um único ciclo de operação, ocorrem diferentes etapas como: a alimentação da solução ou suspensão no atomizador; a atomização; a mistura do *spray* com o ar de secagem; a evaporação do solvente e, por último a separação do produto seco (POPPELWELL et al., 1995; BRAGA, 2005).

Os parâmetros do processo de secagem que afetam as propriedades dos produtos e que podem ser modulados são: a vazão da bomba peristáltica, diâmetro do bico atomizador, vazão do ar de secagem, pressão do ar comprimido, temperatura de entrada e de saída além de diferenças nas propriedades físicas e químicas do material de alimentação (DUFFIE; MARSHALL Jr., 1953; BRAGA, 2005).

A atomização, em pequenas gotas, resulta na secagem da substância em poucos segundos, com temperatura de entrada do ar de até 200 °C. No entanto, com o resfriamento evaporativo e com os sistemas corretamente projetados para rapidamente removerem as partículas secas das zonas aquecidas, raramente as partículas adquirem temperaturas superiores a 80 °C não chegando a comprometer a qualidade do produto seco. Este método de desidratação pode originar produtos de alta qualidade, mesmo aqueles altamente sensíveis ao calor como leite, ovos e café (FELLOWS, 2006).

Este processo apresenta como principais vantagens a possibilidade de transformar líquidos em sólidos; a secagem de compostos sensíveis ao calor com uma baixa degradação e alteração de nutrientes, aroma, sabor e cor, além de insumos biológicos e farmacêuticos; uma alta produtividade e capacidade permitindo produzir em larga escala; um efetivo controle das variáveis; a produção de materiais diretamente na forma de pó com forma, tamanho e densidades controlados pelas condições de processo, com uniformidade; um baixo custo comparado a outros processos e capacidade de microencapsulação de aromas e corantes (ROSA; TSUKADA; FREITAS, 2006).

No processo de *spray-drying* ocorre um grande consumo de energia, sendo este a maior desvantagem deste método de secagem. O grande consumo de energia é devido a necessidade de fornecer calor para a evaporação, em um curto espaço de tempo, além de perder grande quantidade de calor no ar de exaustão. Uma estratégia simples para economizar energia está em aumentar a concentração de sólidos dispersos

na solução ou suspensão, até o limite em que ela ainda possa ser bombeada (BRAGA, 2005).

Conhecer o material de interesse, bem como o material de cobertura são fatores determinantes para a eficiência no processo. Reineccius e Anandaraman (1986) empregaram maltodextrinas com diferentes números de equivalentes de dextrose e observaram um aumento da retenção de óleo essencial de laranja quanto maior o número de equivalentes contidos no polímero.

Rosenberg, Kopelman e Talmon (1990) atomizaram diferentes ésteres utilizando goma arábica, em diferentes formulações, para a encapsulação e observaram que a retenção daqueles compostos depende da composição da cápsula e das condições de secagem.

A proteção que o material de parede oferece ao núcleo das micropartículas depende das propriedades internas e externas da estrutura e da distribuição do núcleo. Para estudar as superfícies e estruturas destes materiais, têm sido empregadas, com sucesso, as técnicas de microscopia óptica, eletrônica de varredura e confocal (LAMPRECHT; SCHAEFER; LEHR, 2000; BRAGA, 2005).

REFERÊNCIAS

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

AQUINO, A.C. **Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação de amido de mandioca: ácidos orgânicos e suas relações com as propriedades do polvilho azedo**. 2015. 228 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015

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

ALEXANDER, J.R. Maltodextrins. Production, properties and application. In: SCHENCK, E.W; HEBEDA, R.E. **Starch Hydrolysis Products**, vhc, New York, 1992, p.233-275.

ANANDARAMAN, S.; REINECCIUS, G. A. Stability of encapsulated orange peel oil. **Food Technology**, v.40, p.88-93, 1986.

ASCHERI, D. P. R.; MARQUEZ, M. O. M.; MARTUCCI, E. T., Microencapsulação de óleo essencial de laranja: seleção de material de parede. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 23, p. 1-6, 2003.

AVANCINI, S. R. P. **Caracterização físico-química, microbiológica e toxicológica das águas de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007, 104f.

AVANCINI, S.R.P.; FACCIN, G.L.; VIEIRA, M.A.; ROVARIS, A.A.; PODESTÁ, R.; TRAMONTE, R.; SOUSA, N.M.A.; AMANTE, E.R. Cassava starch fermentation wastewater: characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chemical Toxicology**,v.45, p.2273-2278, 2007.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p.89-97, 2005.

BALAGOPALAN, C. Cassava utilization in food, feed and industry. Chapter 15, p. 301-318. **Cassava: Biology, Production and Utilization**. CAB International. 2002.

BIAZOTTO, L.M. **Utilização das águas da fermentação do polvilho azedo na elaboração de uma nova bebida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2008, 88f.

BRAGA, G.K. **Determinação das especificações do processo de *spray drying* na obtenção de micropartículas biodegradáveis para a liberação sustentada de princípios ativos com aplicação odontológica**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005, 96f.

BRASIL. **Leis, decretos, etc. Decreto nº 12.486. 20 de outubro de 1978. Normas Técnicas Especiais relativas a Alimentos e Bebidas**. D.O. do Estado de São Paulo, p. 3-25, 21 de outubro, 1978.

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.

CAPPELLINI, R.A.; CEPONIS, M.J.; LIGHTNER, G.W. Disorders in apricot and papaya shipments to the New York market 1972-1985. **Plant Disease**, v.72, p.366-368, 1988.

CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; RIBEIRO, V.E., CARVALHO, H.P. Polvilho Azedo: Aspectos físicos, químicos e microbiológicos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.31, n.2, p.129-137, 1996.

CÉ, N. **Utilização de filmes de quitosana contendo nisina e natamicina para cobertura de kiwis e morangos minimamente processados**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009, 95f.

CENCI, S. A. **Para reduzir perdas com o morango**. Artigo Técnico. Revista IBRAF, 11. ed., p.41-43, 2008.

CEREDA, M. P. Padronização para ensaios de qualidade da fécula de mandioca fermentada (polvilho azedo). II – Ensaios de absorção de água. **Boletim Sociedade Brasileira Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.297-304, 1983.

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

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**, v.6, n.1, p.29-33. 1987.

CHITARRA, M.I.F.; CHITARRA, A.D. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005, 187f.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v.2, n.4, p. 564-582, 1999.

DANTAS, S.A.F.; OLIVEIRA, S.M.A.; MICHEREFF, S.J.; NASCIMENTO, L.C.; GURGEL, L.M.S.; PESSOA, W.R.L.S. Doenças fúngicas pós-colheita em mamões e laranjas comercializados na central de abastecimento do recife. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, p.528-533, 2003.

DE VRIES, M.C.; VAUGHAN, E.E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M. Lactobacillus plantarum – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

DEMIATE, I.M., BARANA, A.C., CEREDA, M.P., WOSIACKI, G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.131-135, 1999.

DUFFIE, J.A.; MARSHALL Jr., W.R. Factor influencing the properties of spray dried materials. **Chemical Engineering Progress**, v.49, n.8, p.417-423, 1953.

ECKERT, J. W. Postharvest Pathology. In: PANTASTICO, E. R. E. **Post harvest physiology, handling and utilization of tropical and subtropical fruits and vegetables**. Welpport, Connecticut: The avi Publishing Company, 1975. p.393-414.

EL-DASH, A.; MAZZARI, M. R.; GERMANI, R. **Tecnologia de farinhas mistas: uso de farinha mista de trigo e mandioca na produção de pães**. Brasília: Embrapa-SPI, 1994. 88p.

EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Mandioca. Disponível em: <http://www.cnpmf.embrapa.br/index.php?p=pesquisas-culturas_pesquisadas-mandioca.php&menu=2>. Acesso em 16 de fev. de 2013.

EPAGRI – Empresa de pesquisa agropecuária e extensão rural de Santa Catarina S.A. Mandioca em Santa Catarina: Importância, aspectos gerais e estratégias de trabalho. XI Reunião Técnica da Mandioca, Rio Pardo, 2009.

FAOstat. Disponível em: <http://faostat.fao.org/>. Acesso em: 10 de fev. de 2013.

FAO. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/gcnds/index>. Acesso em 11/04/2016.

FELIPE, F.I.; ALVES, L.R.A.; CAMARGO, S.G.C. Panorama e perspectivas para a indústria de fécula de mandioca no Brasil. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, v.6, p.134-146, 2010.

FELLOWS, P.J. **Tecnologia do Processamento de Alimentos**. Porto Alegre: ed. Artmed, 2006. 602p.

FILHO, G. de A. F.; BAHIA, J. J.S. Mandioca. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/mandioca.htm>> Acesso em: 16 de fev. de 2013.

GERALDINE, R.M.; SOARES, N.F.F.; BOTREL, D.A.; GONÇALVES, L.A. Characterization and effect of edible coatings on minimally processed garlic quality. **Carbohydrate Polymers**, v.72, p.403-409, 2008

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

GUERRA, N.P.; MACÍAS, C.L.; AGRASAR, A.T.; CASTRO L.P. Development of a bioactive packaging cellophane using nisaplin[®] as biopreservative agent. **Letters in Applied Microbiology**, v.40, p.106-110, 2005.

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

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comunicação social, 09 de janeiro de 2013. Levantamento sistemático da produção agrícola. Disponível em:

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2304&id_pagina=1>. Acesso em: 16 de fev. 2013.

JACOMINO, A.P.; KLUGE, R.A.; BRACKMANN, A.; CASTRO, P.R.C. Amadurecimento e senescência de mamão com 1-metilciclopropeno. **Scientia Agrícola**, v.59, n.2, p. 303-308, 2002.

JOFRÉ, A., AYMERICH, T.; GARRIGA, M. Assessment of the effectiveness of antimicrobial packaging combined with high pressure to control *Salmonella* sp. in cooked ham. **Food Control**, v.19, p.634-638, 2008.

KIRK, P.M.; CANON, P.F.; DAVID, J.C.; STALPERS, J.A. **Dictionary of the fungi**. ed. Wallingford: CABI Bioscience, 2001. 655 p.

KURTZ, D.J. Valorização e Minimização de Resíduos na Produção do Tradicional Polvilho Azedo. Relatório de Pesquisa do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica. Florianópolis, 2009.

LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.2, p.213-215, 2005.

LAMPRECHT, A.; SCHAEFER, U.F.; LEHR, C.-M. Characterization of microcapsules by confocal laser scanning microscopy: structure, capsule wall composition and encapsulation rate. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v.49, p.1-9, 2000.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Biorresource Technology**, v.87, p.167-198, 2003.

MARCON, M. J. A. **Proposta para o mecanismo de expansão do polvilho azedo com base nas características físico químicas**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009, 187f.

MARCON, M.J.A. **Efeito do processo fermentativo pelo método tradicional e com adição de glicose, sobre a qualidade do polvilho azedo.** Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004, 149f.

MARCON, M.J.A.; VIEIRA, M.A.; SANTOS, K.; SIMAS, K.N., AMBONI, R.D.M.C.; AMANTE, E.R. The effect of fermentation on cassava starch microstructure, **Journal of Food Process Engineering**, v.29; p.362-372, 2006.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**.3.ed. New York: John Wiley e Sons Inc, 1979, 687p.

MESTRES, C.; ROUAU, X. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.74, p.147-155, 1997.

MIN, S.; KROCHTA, J.M. Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55 p.2964-2969, 2007.

MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J.P.; POT, B.; JACOB DE HAUT, I.; RAIMBAULT, M. *Lactobacillus manihotvorans* sp. nov., a new starch-hydrilysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.4, p.1101-1109, 1998.

MOSS, M.O. Mycotoxin review. 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, v.16, p.116-119, 2002.

NATRAJAN, N.; SHELDON, B.W. Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella typhimurium* on fresh broiler skin. **Journal of Food Protection**, v.63, p.1189-1196, 2000.

O'SULLIVAN, L.; ROSS, R.P.; HILL, C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**, v.84, p.593-604, 2002.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SALMIÉRE, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Antimicrobial and antioxidant effects of milk-protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.5598-5605, 2004.

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.

PENA, D.C.R.; TORRES, J.A. Sorbic acid and potassium sorbate permeability of an edible methylcellulose-palmitic acid films: water activity and pH effects. **Journal of Food Science**, v.56, n.2, p.497-499, 1991.

POPPLEWELL, L.M.; BLACK, J.M.; NORRIS, L.M.; PORZIO, M. Encapsulation system for flavors and colors. **Food Technology**, v.49, p.76-82, 1995.

PRANOTO, Y.; SALOKHE, V.M.; RAKSHIT, S.K. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. **Food Research International**. v.38, p.267-272, 2005.

REGINATTO, V. ; MARCON, M.J.A.; XAVIER, J.M.; SCUSSEL, V.M.; AMANTE E.R.; KURTZ, D. Modification of the sour cassava starch production process to improve organic acids in the wastewater. In: 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production, 2009, São Paulo. Proceedings of the 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo: UNIP, 2009.

REINECCIUS, G.A. Spray-drying of food flavors. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**, Washington, DC: ACS, p.55-66, 1988.

RINALDI, M. M. Perdas pós-colheita devem ser consideradas. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2011. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/noticias/artigosmidia/publicados/306/>>. Acesso em: 14 de janeiro de 2013.

RITA, F.; SALLES, L.B.; BARBOZA, R.A.; OLIVEIRA, M.C.; PRESTES, R.A.; ALMEIDA, D.M.; Atividade antimicrobiana de biofilme

com óleos essenciais para conservação pós-colheita de tomate cv rasteiro. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.5, p.466-474, 2011.

ROJAS-GRAÜ, M.A.; TAPIA, M.S.; MARTIN-BELLOSO, O. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. **Lebensmittel- Wissenschaft und-Technologie**, v.41, p.139-147, 2008.

ROSA, E. D.; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações. In. 5^a Jornada científica da FAZU/Faculdades Associadas de Uberlândia, 2006, Anais... Uberaba, MG – FAZU, 2006.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; Y. TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.38, p.1288-1294, 1990.

SATHIVEL, S. Chitosan and protein coatings affect yield, moisture loss, and lipid oxidation of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during frozen storage. **Journal of Food Science**, v.70, n.454-E459, 2005.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E.P.; SCHWAN, R.F.; PILON, L. 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.; CARVALHO, E.P.; PÁDUA, I.P.M.; DINÍZIO, F.L.; MARQUES, S.C. Isolamento e caracterização da microbiota ácido láctica envolvida no processo fermentativo para produção de polvilho azedo. **Pró Homine: Revista Científica da Unilavras**, v.2, n.2, p.7-14, 2003.

SILVEIRA, N.S.S.; MICHEREFF, S.J.; SILVA, I.L.S.S.; OLIVEIRA, S.M.A. Doenças fúngicas pós-colheita em frutas tropicais: patogênese e controle. **Caatinga**, Mossoró, v.18, n.4, p.283-299, 2005.

SINGH, R.P.; HODSON, D.P.; JIN, Y.; HUERTA-ESPINO, J.; KINYUA, M.G.; WANYERA, R.; NJAU, P.; WARD, R.W. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from

race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. **CAB Reviews: perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v.1, n.54, p.1-13, 2006.

SOARES, N.F.F.; SILVA, W.A.; SILVEIRA, M.F.A.; PIRES, A.C.S.; MEDEIROS, E.A.A. Conservação de maçã minimamente processada através de revestimento comestível incorporado com ácido ascórbico. In: V Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, Anais... Lavras. V Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças, v.1. p.119, 2008.

SRIROTH, K.; SANTISOPASRIB, V.; PETCHALANUWATC, C.; KUROTJANAWONGA, K.; PIYACHOMKWAND, K.; OATES, C.G. 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.

STORTZ, E.; STEFFENS, K-J. Feasibility study for determination of the dextrose equivalent (DE) of starch hydrolysis products with near-infrared spectroscopy (NIRS). **Starch/Stärke**, v.56, p.58-62, 2004.

TAAG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v.40, n.3, p.722-756, 1976.

TAVARES, G.M. **Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.) na pós-colheita**. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2004. 55p.

TORRES, J.A.; KAREL, M. Microbial stabilization of intermediate food surfaces. III. Effects of surface preservative concentration and surface pH control on microbial stability of an intermediate moisture cheese analog. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.9, n.2, p.107-119, 1985.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N.K. Exploitation of natural products as alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, v.32, p. 235-245, 2004.

VERMEIREN, L.; DEVLIEGHERE, F.; DEBEVERE, J. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. **Food Additives and Contaminants**, v.19, p.163-171, 2002.

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

CAPÍTULO 2

ÁGUA DE FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA COMO ANTIMICROBIANO NATURAL

Água de fermentação do amido de mandioca como antimicrobiano natural

Resumo

O amido de mandioca quando submetido à fermentação natural resulta em dois produtos: o primeiro é o amido fermentado e o segundo é, até o momento, um resíduo, aqui denominado de água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM). Após a etapa de fermentação, o amido fermentado é seco ao sol, denominando-se polvilho azedo, sendo este processo de fermentação muito estudado. No entanto, a água residual, rica em compostos orgânicos, requer maior investigação, pois são raros os estudos considerando a valorização destas águas como um novo material. O objetivo deste estudo foi quantificar os ácidos orgânicos presentes neste efluente e avaliar a atividade antimicrobiana, visando uma possível aplicação deste resíduo. O estudo avaliou o efeito da ASFAM e dos padrões dos ácidos orgânicos (ácidos láctico, acético, propiônico e butírico) de forma isolada e em conjunto sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* pelos métodos de difusão em ágar, cultivo em meio líquido e pela curva de crescimento microbiano. Os resultados indicaram a existência de efeito antimicrobiano para as duas bactérias em ambos os testes realizados, tanto com os padrões puros como com a ASFAM. Após 1,5 h e 24 h de incubação com a ASFAM não foi possível realizar a contagem de *E. coli* e *S. aureus*, respectivamente, pelas técnicas empregadas. A ASFAM tem um efeito mais rápido e mais eficiente sobre *E. coli*, quando comparada aos ácidos testados de forma isolada e este efeito é relacionado com o aumento da concentração dos ácidos orgânicos. Por outro lado, para *S. aureus*, o aumento da concentração não acelerou a ação antimicrobiana que se mostrou ser dependente do tempo de contato. Sugere-se que os efeitos apresentados também podem ser decorrentes da existência de sinergismo entre os ácidos ou pela ação de algum outro composto ou molécula na ASFAM que potencialize a sua ação antimicrobiana, uma vez que esta não foi ainda completamente caracterizada.

Palavras-chave: Águas residuais. Atividade antimicrobiana. Ácidos orgânicos. Polvilho azedo.

Cassava starch fermentation water as a natural antimicrobial

Abstract

Cassava starch when submitted to natural fermentation originates two products: the first one is fermented starch and the second one is, until now, a waste, here named supernatant water of fermentation of cassava starch (ASFAM). After the fermentation stage, the fermented starch is dried under the sun, named sour cassava starch, being the process of fermentation associated to this product widely studied. However, residual water of this process, rich in organic compounds, requires further research, because the studies involving this raw material are scarce. This study aimed at evaluating the antimicrobial activity of this water and the organic acids present in it, aiming at a possible application in new materials. This study evaluated the effect of ASFAM and the present organic acids (lactic acid, acetic, propionic and butyric) singly or group on the development of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The antimicrobial activity of residual water was investigated by the method of diffusion in agar and through the growing test. The results indicate the existence of antimicrobial effect of residual water for both tests carried out with both bacteria. Thus, the studies were continued using the acids singly. The tests of Minimum Inhibitory Concentration (CMI) and Minimum Bactericidal Concentration (CMB) and Survival Bacterial Curve were carried out. The results indicate that ASFAM has a faster and more destructive effect on *E.coli*, when compared to acids tested singly or group. The ASFAM eliminated *E. coli* in 1.5 h and *S. aureus* in 24 h incubation.

Keywords: Residual waters. Antimicrobial activity. Organic acids. Sour cassava starch.

1 INTRODUÇÃO

O amido de mandioca fermentado (polvilho azedo) é um produto típico do Brasil e de outros países da América Latina como a Argentina, Colômbia e Equador. É obtido através da fermentação natural do amido de mandioca nativo. O processo de fermentação ocorre em tanques de aproximadamente 10 a 20 m³, onde o amido é imerso em água, deixando-se uma camada superficial de pelo menos 20 cm de altura, por um período que pode variar de 30 a 90 dias (AVANCINI, 2007). O final do processo é empírico e dá-se pelo aparecimento de espuma e bolhas no interior da massa. Então, o amido fermentado é colocado para secar ao sol e a água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) que atualmente tem como destino o descarte no ambiente. Por estas indústrias, geralmente de pequeno ou médio porte com característica familiar, terem a tendência a se aglomerarem em microrregiões, o grande volume do efluente descartado nos rios e mananciais é considerado um contaminante ambiental com uma elevada demanda bioquímica e química de oxigênio. No entanto, este resíduo apresenta uma composição muito interessante com potencial para uso em novos produtos (AQUINO et al., 2015).

Neste processo, a microbiota selvagem se desenvolve e é responsável pela produção de enzimas amilolíticas e de ácidos orgânicos que atacam as superfícies dos grânulos (CEREDA, 1987). Dois grupos de microorganismos são predominantes no processo de fermentação do polvilho azedo. O primeiro grupo é constituído de algumas leveduras como *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Pichia saitoi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, e *Zygosaccharomyces bailii*, uma vez que estão envolvidas na hidrólise do amido (OYEWOLE, 2001). O segundo grupo é formado por bactérias ácido-láticas, destacando-se o gênero *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. manihotvorans*), seguido por *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus* (MORLON-GUYOT et al., 1998; GUYOT; MORLON-GUYOT, 2002; SILVEIRA et al., 2003; LACERDA et al., 2005). Estas bactérias são conhecidas pela produção de ácidos orgânicos, compostos aromáticos e vitaminas, entre outras substâncias durante o processo (DE VRIES et al., 2006). Dessa forma, os ácidos orgânicos estão naturalmente presentes na composição dos alimentos oriundos de fermentação em sua forma não dissociada, apresentando elevada atividade antimicrobiana (LINDSAY, 2010), sendo uma forma natural de manter os alimentos seguros (DAVIDSON, 1997; NAZER, 2015).

O resíduo deste processo, a ASFAM, tem sido estudado por alguns pesquisadores (AVANCINI et al., 2007; BIAZOTTO, 2008; AQUINO et al., 2015; AQUINO, 2015), porém nenhum estudo envolvendo a capacidade antimicrobiana deste material foi encontrado na literatura, tornando-se importante a realização de novas pesquisas em busca da identificação dos compostos presentes e com potencial antimicrobiano. Testes para verificar a eficácia de cada composto contido na ASFAM podem contribuir para atribuir uma finalidade a este resíduo que futuramente poderá melhorar a realidade de toda a cadeia produtiva do polvilho azedo.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar a composição de ácidos orgânicos na ASFAM, determinar sua concentração bactericida e bacteriostática, frente a duas cepas bacterianas de importância em intoxicações alimentares, *Staphylococcus aureus* e *Eschechia coli*, utilizando como comparativo o comportamento destes micro-organismos frente a soluções padrões de ácidos orgânicos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Neste estudo, foi utilizada uma amostra de ASFAM, obtida pelo processo de fermentação tradicional (225 dias de fermentação), coletada em polvilharia localizada na região Sul do Estado de Santa Catarina, Brasil. Esta foi transportada para o laboratório, filtrada em pano dessorador logo após a chegada, acondicionada em frascos esterilizados e armazenada em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No dia anterior à realização dos testes antimicrobianos, a água foi micro-filtrada em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de $0,22\text{ }\mu\text{m}$ (Allcrom, São Paulo, Brasil) em ambiente asséptico, garantindo a esterilização da amostra sem a perda dos componentes solúveis.

Para a determinação dos ácidos orgânicos presentes na amostra e para a elaboração das soluções de ácidos utilizadas para a realização das análises microbiológicas, foram utilizados os ácidos: láctico (pureza 90%) e butírico (pureza $\geq 99,5\%$) da marca Fluka (Buchs, Suíça), acético (pureza $\geq 99,8\%$) e propiônico (pureza $\geq 99,8\%$) da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O metanol com grau HPLC foi adquirido da J. T. Barker (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA). A água utilizada para todas as

análises foi destilada e purificada em equipamento Simplicity (resistividade 18,2 MΩ cm, Millipore, EUA).

Para a realização das análises microbiológicas foram elaboradas soluções estoques de todos os ácidos com uma concentração de 10%. A solução *mix* foi elaborada a partir dos padrões de ácido láctico, acético, propiônico e butírico na proporção de 1:1:1:1, também com uma concentração final de 10%, sendo composta por 2,5% de cada ácido em questão. A partir destas soluções foram elaboradas todas as soluções avaliadas.

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização físico-química da amostra

O pH foi determinado através da leitura em um potenciômetro da marca Quimis modelo Q 400 A (Diadema, São Paulo, Brasil), em triplicata. A acidez total titulável (ATT) foi determinada através do método oficial 950.07 da AOAC (2010).

Os sólidos totais (ST) foram determinados por gravimetria, em triplicata, com a pesagem de 10 mL da amostra em placas de Petri, previamente secas e taradas, que foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar (Marca Fabbe, São Paulo) a 60 °C até peso constante.

Os sólidos solúveis totais (°Brix) foram determinados utilizando-se um refratômetro digital portátil (Quick-BrixTM 90, Columbus, Ohio, Estados Unidos).

A identificação e a quantificação dos ácidos orgânicos presentes no resíduo foram realizadas conforme o método descrito por Aquino et al. (2015) utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipado com uma bomba quaternária e um desgaseificador (LC-20AT), um injetor automático (SIL-10A), com um loop de 20 µL, um detector de arranjos de diodo (SPD-M20A) operando no comprimento de onda de 220 nm, controlados por uma estação de trabalho (CBM-20-A), com sistema de aquisição de dados LC Solutions Software, todos fabricados pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão).

Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna C18, Hichrom (150 x 4,6 mm - Berkshire, UK). As fases móveis utilizadas, com fluxo isocrático de 0,6 mL.min⁻¹, foram constituídas por solução de KH₂PO₄ 0,02

mol.L⁻¹ com pH 2,88 ± 0,2 (ajustado com ácido fosfórico) e de metanol, 98:2 para os ácidos láctico, acético e propiônico (ZOTOU; LOUKOU; KARAVA, 2004), e 60:40 para o ácido butírico.

2.2.2 Atividade antimicrobiana

O efeito antimicrobiano foi estudado nas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). As bactérias foram ativadas em 5 mL de caldo BHI (infusão de cérebro e coração), mantidas em estufa bacteriológica (Marca Edutec) a 35 °C por 24 h antes do início dos testes. Para tanto, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento foi estudado o comportamento dos micro-organismos frente aos padrões dos ácidos orgânicos presentes na ASFAM, identificaram-se a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CMB) destes ácidos. A partir dos resultados obtidos, realizou-se a curva de crescimento microbiana destas bactérias submetidas às CMI e CMB de cada ácido. No segundo experimento foram realizados dois testes de inibição de crescimento focados no potencial bacteriostático e bactericida da ASFAM.

2.2.2.1 Experimento 1: CMI, CMB e Curva de Crescimento de *E. coli* e *S. aureus* frente a diferentes ácidos orgânicos

Para a determinação da CMI e da CMB dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli*, uma alçada destas bactérias foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de caldo nutriente sendo incubados em estufa bacteriológica por 1,5 h a 35 °C, resultando em uma turvação correspondente a 0,5 da escala de McFarland, ou seja, em uma concentração inicial de 10⁶ UFC mL⁻¹, conforme é recomendado na metodologia descrita para os Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactérias de Crescimento Aeróbio (Norma M7-A6, NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS).

Aos tubos foram adicionados 100 µL da solução dos ácidos orgânicos em estudo. As concentrações finais das soluções dos ácidos foram preparadas levando-se em consideração a diluição no caldo nutriente. Foram testadas 12 concentrações (0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00 e 2,00%) de todos os ácidos. Como controle positivo

e negativo foram utilizados ciprofloxacino ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) e água Milli-Q, respectivamente. Os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica (marca TECNAL, Modelo TE820) com agitação horizontal a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. As avaliações foram realizadas logo após a inoculação e após 24 e 48 h de incubação, em duplicatas, contando-se o número de colônias formadas, através do espalhamento em superfície no meio PCA e mantidas em estufa por 24 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. O experimento foi repetido três vezes.

Neste estudo, considerou-se como a CMB a ausência de crescimento de colônias bacterianas, após 48 h de incubação na diluição 10^{-1} , e a CMI caracterizou-se pela estabilização da contagem logarítmica de colônias bacterianas após 48 h de incubação.

O comportamento da curva de crescimento microbiano foi estudado em frascos com 50 mL de Caldo Nutriente inoculados com as bactérias teste na concentração inicial de 10^5 UFC mL^{-1} . Aos frascos foram adicionados concentrações dos ácidos orgânicos correspondentes as CIM e CBM e ciprofloxacino ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$) e água Milli-Q como controle positivo e negativo, respectivamente e incubados em estufa bacteriológica com agitação (Marca TECNAL, Modelo TE820) a $35 \text{ }^\circ\text{C}$. As contagens microbianas foram realizadas no momento da adição das amostras e após 1, 2, 4, 6, 12, 24 e 48 h de incubação, em duplicatas, em superfície no meio PCA e mantidos em estufa por 24 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.2.2 Experimento 2: Identificação do potencial antimicrobiano da ASFAM

- Método de difusão em Agar

Foram realizadas as sementeiras das cepas pelo método de plaqueamento em profundidade com meio de cultura Muller-Hinton na densidade de 10^6 UFC mL^{-1} . Após a solidificação dos meios, através da técnica de perfuração em Ágar, foram feitos três poços com 5 mm de diâmetro em cada placa, onde foram depositados em cada poço $32 \text{ } \mu\text{L}$ da ASFAM, do controle negativo (água Milli-Q) e do controle positivo (antibiótico ciprofloxacino $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$). Em duplicatas, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica com temperatura de $35 \text{ }^\circ\text{C}$ e as avaliações foram realizadas após 24 h, medindo-se o halo de inibição formado em cada poço com paquímetro digital, marca Lee Tools, China.

- Método de crescimento em caldo

Com este teste comparou-se o desenvolvimento microbiano das cepas em estudo, quando inoculadas em caldo nutriente contendo ASFAM.

Foram preparados três frascos com caldo nutriente, conforme a indicação do fabricante, o primeiro com água Milli-Q (controle negativo), o segundo com adição de ciprofloxacino ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$), controle positivo), no terceiro, a água Milli-Q foi substituída pela ASFAM. Todos os caldos foram filtrados através de membrana de PTFE de $0,22 \mu\text{m}$ (Allcrom, São Paulo, Brasil) em ambiente asséptico. Em seguida, os meios foram inoculados com as cepas de *S. aureus* e *E. coli* na concentração de 10^5 UFC mL^{-1} e os frascos foram mantidos em banho-maria a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação constante por 24 h. No instante da inoculação e após 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 6; 12 e 24 h foi realizada a inoculação das amostras através da técnica de plaqueamento em superfície em placas de Petri contendo PCA, em duplicata. Após 24 h a $35 \text{ }^\circ\text{C}$, as placas foram avaliadas contando-se o número de colônias formadas. O experimento foi repetido três vezes.

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca

A amostra de água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca utilizada para a realização dos testes antimicrobianos apresentou pH igual a $3,49 \pm 0,01$, ATT igual a $13,53 \pm 0,06 \text{ mL de NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}/10\text{mL}$, sólidos totais somando $0,49 \pm 0,02 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ e sólidos solúveis totais de $1,40 \pm 0,00 \text{ }^\circ\text{Brix}$.

Avancini (2007) avaliou a água residual da fermentação, obtida através de processo realizado em laboratório e em polvilharia, quanto às características químicas, microbiológicas e toxicológicas. Verificou-se que esta água possui uma baixa quantidade de sólidos totais, variando entre 1,7 a $6,0 \text{ g L}^{-1}$) e, conseqüentemente de nutrientes, apresentando as seguintes características químicas: pH entre 3,0 e 3,7; índice de acidez de 21 a $68 \text{ mL de NaOH N. } 100\text{mL}^{-1}$; 0,19 a $0,62 \text{ g de ácido láctico. } 100\text{mL}^{-1}$.

Na ASFAM estudada, as concentrações dos ácidos orgânicos, foram determinadas em mg L^{-1} , sendo a de ácido láctico igual a $1332,78 \pm 6,86 \text{ mg L}^{-1}$; de ácido acético igual a $1764,04 \pm 9,51 \text{ mg L}^{-1}$; de ácido propiônico

igual a $1572,16 \pm 5,36 \text{ mg L}^{-1}$; e de ácido butírico igual a $4836,22 \pm 6,95$, totalizando $9505,2 \text{ mg L}^{-1}$.

Assim, a composição dos ácidos orgânicos na amostra de ASFAM utilizada neste estudo foi percentualmente de 0,13% de ácido láctico, 0,18% de ácido acético, 0,16 % de ácido propiônico e 0,48 % de ácido butírico, sendo a concentração total destes ácidos de 0,95 %.

Aquino (2015) realizou um estudo detalhado em relação às concentrações de ácidos orgânicos presentes nestas águas e concluiu que as concentrações dos ácidos podem variar principalmente com o período de fermentação. Outros fatores como: local, temperatura durante a fermentação, tipos de tanques, uso de inóculo, entre outras práticas podem influenciar na composição final de ácidos orgânicos. O autor, analisando diferentes águas de fermentação de amido de mandioca, encontrou valores de ácido láctico entre <LOD a $2922,11 \text{ mg L}^{-1}$, de ácido acético entre $147,70$ e $1764,04 \text{ mg L}^{-1}$, de ácido propiônico entre <LOD e $1572,16 \text{ mg L}^{-1}$ e de ácido butírico entre $15,92$ e $4836,22 \text{ mg L}^{-1}$.

Demiato et al. (1999) estudaram o amido de mandioca fermentado comercial verificando que os ácidos orgânicos predominantes neste produto são os ácidos láctico, butírico, acético e propiônico. O ácido láctico correspondeu a cerca de 60 a 80% do total de ácidos. Reginatto et al. (2009) analisaram a presença de ácidos no mesmo tipo de amostra, encontrando os ácidos acético, láctico e propiônico como os mais prevalentes.

3.2 Experimento 1: CMI, CMB e Curva de Crescimento de *S. aureus* e *E. coli* frente a diferentes ácidos orgânicos

Os resultados dos estudos das CMIs e CMBs das soluções de padrão dos ácidos orgânicos láctico, acético, propiônico, butírico e *mix* de todos os ácidos, podem ser observados na Tabela 1.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 1, é possível verificar que todos os ácidos encontrados na ASFAM apresentaram atividade antimicrobiana sobre *E. coli* e *S. aureus*, quando testados de forma isolada ou em conjunto. Pode-se observar que a *E.coli* é mais sensível aos ácidos acético, propiônico, butírico e ao *mix* quando comparado ao *S. aureus* e este, por sua vez, é mais sensível ao ácido láctico, quando comparado a *E. coli*.

Tabela 1- Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Bactericida (CMB) dos ácidos orgânicos láctico, acético, propiônico, butírico e *Mix* (solução composta pelos quatro ácidos em estudo, na mesma concentração) sobre *S.aureus* e *E.coli*, após 48 h de incubação a 35 °C.

Ácidos	CMI e CMB (%)			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	CMI	CMB	CMI	CMB
Lático	0,050	0,150	0,100	0,200
Acético	0,100	0,150	0,050	0,075
Propiônico	0,100	0,250	0,050	0,075
Butírico	0,100	0,250	0,050	0,100
<i>Mix</i>	0,100	0,250	0,050	0,100
Controle negativo*	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente

*Controle negativo: água Milli-Q.

A maior resistência aos ácidos orgânicos apresentada pelo *S. aureus* quando comparada a *E. coli* pode ser relacionada à constituição química da parede celular destes micro-organismos. De acordo com Goering (2014), o principal componente da parede celular das bactérias é um polímero misto de açúcares e aminoácidos, um peptidoglicano (mureína). Nas bactérias Gram positivas, como *S. aureus*, a mureína forma uma camada espessa, podendo variar de 20 a 80 nm, tornando a parede celular mais rígida, suportando maiores pressões quando comparada às bactérias Gram negativas, como a *E. coli*, onde a camada de mureína é mais fina, variando de 5 a 10 nm, e mais complexa, pois apresenta uma camada externa de lipopolissacarídeos e lipoproteínas, proteínas, fosfolipídeos e porina, que as tornam mais vulneráveis ao meio.

Tem-se assumido que a forma não dissociada dos ácidos orgânicos contribui de modo significativo para o seu efeito antimicrobiano, pois nesta forma estes podem, facilmente, penetrar na membrana lipídica da célula bacteriana, e uma vez dentro do citoplasma celular, com pH neutro, dissociam em ânions e prótons, causando problemas para as bactérias, as quais devem manter o pH do citoplasma próximo à neutralidade para sustentar as macromoléculas funcionais. E com a exportação de prótons ocorre o consumo de adenosina trifosfato (ATP) celular em excesso que resulta no esgotamento da energia celular (RICKE, 2003; DAVIDSON, 2001). No entanto, os mecanismos de ação dos ácidos orgânicos não são totalmente compreendidos e não devem ser atribuídos somente a ação do pH, pois estão relacionados, também, com a natureza dos ácidos (BACK et al., 2009; EDELSON-MAMMEL et al., 2006; LEE et al., 2002; BARKER, PARKER, 2001.)

No presente estudo foi verificado que a concentração de 0,15% de ácido láctico teve ação bactericida para *S. aureus* após 12 h de incubação (Figura 1 A) e para *E. coli* após 4 h (Figura 2 A). Wang et al. (2015) pesquisaram o mecanismo de ação do ácido láctico sobre *E. coli*, *S. enteritidis* e *L. monocytogenes* e encontraram uma CMB de 0,25 % para a *E. coli*. Estes autores relacionaram a ação do ácido láctico ao rompimento da membrana citoplasmática e ao dano da estrutura intracelular das bactérias comprometendo a atividade das proteínas bacterianas, causando mudanças morfológicas e fisiológicas a estas células. Oliveira et al. (2010) verificaram as CMI's de 0,6 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de ácido láctico e de ácido acético, respectivamente, para o *S. aureus*.

Back et al. (2009) estudaram a ação antimicrobiana de alguns ácidos orgânicos, entre eles os ácidos láctico, acético e propiônico, em concentrações de 1 mol L^{-1} sobre *E. sakazakii* e verificaram que os três ácidos apresentaram um forte efeito de inibição no desenvolvimento desta bactéria. Nazer et al. (2005) observaram a ação bactericida dos ácidos láctico a 60 m mol L^{-1} (0,54 %) e acético a 50 m mol L^{-1} (0,3 %) sobre *Salmonella* sv. *Typhimurium*, respectivamente. No estudo realizado por OH et al. (1993) foi evidenciada a ação do ácido láctico a 0,25 % sobre *L. monocytogenes*.

Fraiese et al. (2013) observaram que a sensibilidade do *S. aureus* ao ácido acético é dependente da cepa e constatou que concentrações de 0,312 e 0,625% podem ser consideradas como CMI, dependendo da cepa em teste. Utyama (2003) relatou que a CMB do ácido acético sobre *E. coli* e *S. aureus* foi de 0,25%. Benassatti et al. (1994) concluiu que o ácido acético foi eficaz contra as mesmas bactérias em concentrações superiores a 0,5%. No presente estudo, não foi observado o crescimento, ao final de 48 h de incubação, de colônias de *E. coli* com a concentração de 0,075% e de *S. aureus* com 0,15% de ácido acético (Tabela 1).

Com o ácido propiônico houve a redução da contagem de colônias de *S. aureus* quando adicionado a 0,10 % e, as mesmas, não foram observadas ao final de 48 h de incubação quando a concentração foi de 0,25 % (Figura 1 C). A *E. coli* foi mais sensível a este ácido, não sendo visualizado o crescimento de colônias quando utilizada a concentração de 0,075 % (Figura 2 C). Concentrações próximas às encontradas neste estudo foram descritas por Wang et al. (2014), onde a adição de 25 m mol L^{-1} (0,18 %) de ácido propiônico resultou em um decréscimo de 1 \log_{10} na concentração de *S. aureus* e a inibição completa ocorreu com 100 m mol L^{-1} (0,74 %). Este autor também encontrou uma sensibilidade maior para *E. coli*, que teve seu

crescimento diminuído com 10 m mol L^{-1} (0,07 %) e foi eliminada com 50 m mol L^{-1} (0,37 %) deste ácido. BASF Corporation (1998), citado por Haque et al. (2009), atribui a concentração de 0,25 % de ácido propiônico como a CMI para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

O ácido propiônico na forma não dissociada é solúvel em lipídeos e, por isso, possui facilidade para penetrar às células microbianas (HAQUE et al., 2009). Wang et al. (2014) estudaram o mecanismo de ação do ácido propiônico e concluíram que o mecanismo letal deste pode ser atribuído à redução do pH citoplasmático.

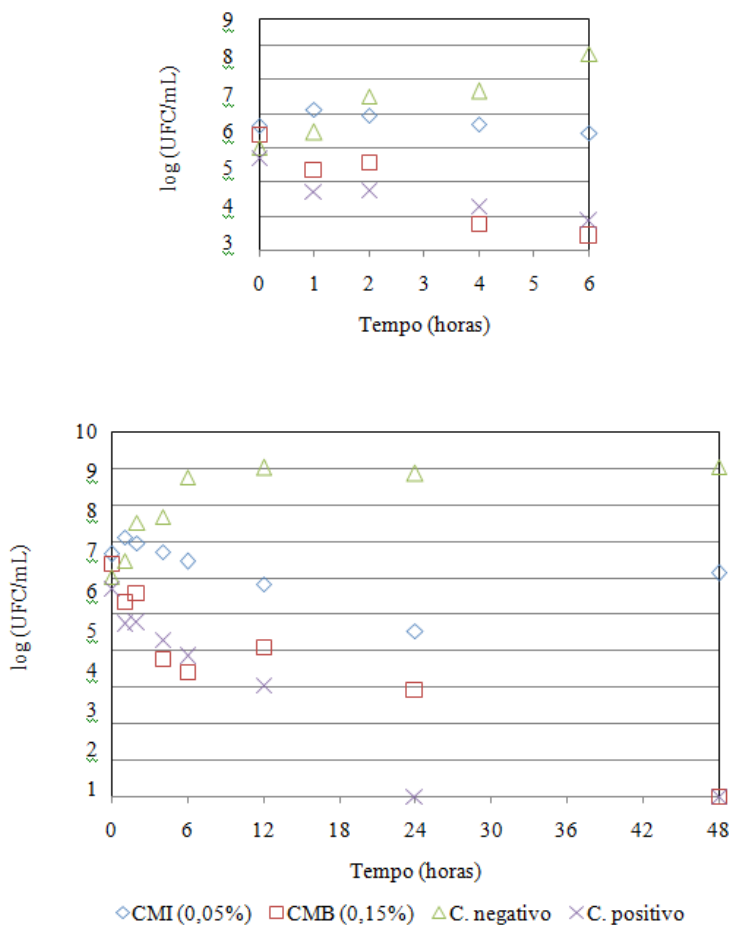
Estudos envolvendo o ácido butírico são mais escassos e, provavelmente, o interesse em pesquisar este ácido seja menor em comparação com outros ácidos orgânicos devido ao seu odor desagradável. Neste trabalho verificamos que a concentração de 0,1 % do ácido butírico é a concentração bacteriostática de *S. aureus* (Figura 1 D) e bactericida para *E. coli* (Figura 2 D). A concentração de 0,25 % apresenta efeito letal para *S. aureus*. Sun et al. (1998) pesquisaram a ação antimicrobiana deste ácido em várias bactérias, entre elas a *E. coli* e constataram que a concentração de 5 m mol L^{-1} (0,04 %) diminuiu o crescimento e a de 10 m mol L^{-1} (0,09 %) foi considerada bactericida para esta bactéria. Estes autores revelaram uma grande dependência da eficácia do ácido butírico ao pH do meio, observando que em pH maior que 5,5 há inibição no crescimento das bactérias, no entanto é substancialmente menor em relação ao pH 5,0. Em pH 6,0 as cepas foram pouco afetadas, mesmo na concentração de 40 m mol L^{-1} (0,35 %).

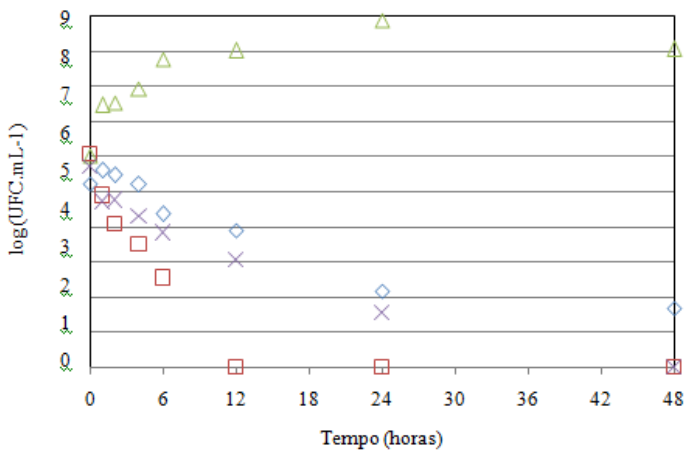
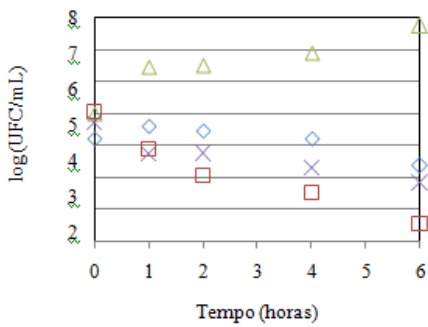
O mecanismo de ação do ácido butírico em células bacterianas pode ser explicado pela sua difusão para o interior da célula quando o meio ionizado excede 2-3 mM, podendo resultar: (a) na acidificação do citoplasma, (b) na dissociação da força motriz devido ao direcionamento da síntese de ATP e formação de prótons a partir da re-ionização do ácido butírico e (c) em efeitos tóxicos desconhecidos sobre enzimas ou na regulação gênica (SUN et al. 1998).

Figura 1 - Dados experimentais para o crescimento microbiano de *S. aureus* na presença de diferentes ácidos orgânicos nas primeiras 6 h e durante 48 h. A: Ácido lático; B: Ácido acético; C: Ácido propiônico; D: Ácido butírico e E: Mix (solução composta pelos quatro ácidos em estudo, na mesma concentração).

* CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: Concentração Mínima Bactericida; C. negativo: água Milli-Q; C. positivo: Solução de ciprofloxacino (0,05 mg mL⁻¹)

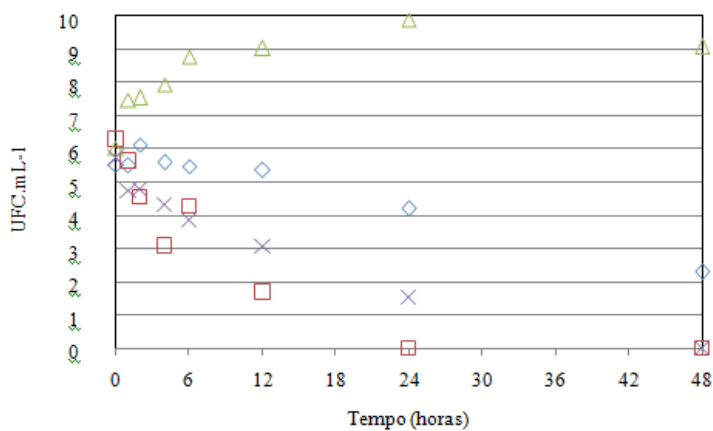
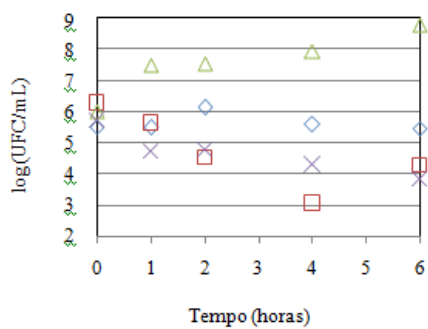
1A



1 B

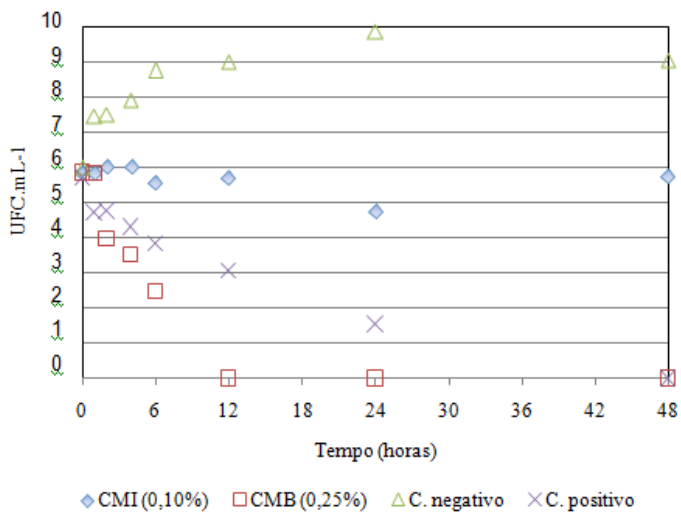
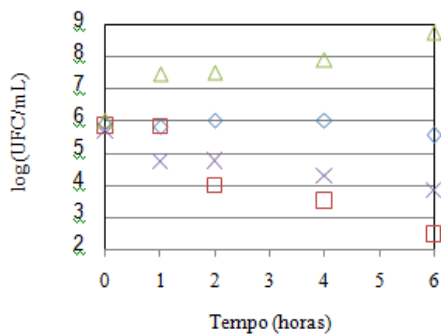
◇ CMI (0,1%) □ CMB (0,15%) △ C. negativo × C. positivo

1 C



◇ CMI (0,10%) □ CMB (0,25%) △ C. negativo × C. positivo

1 D



1 E

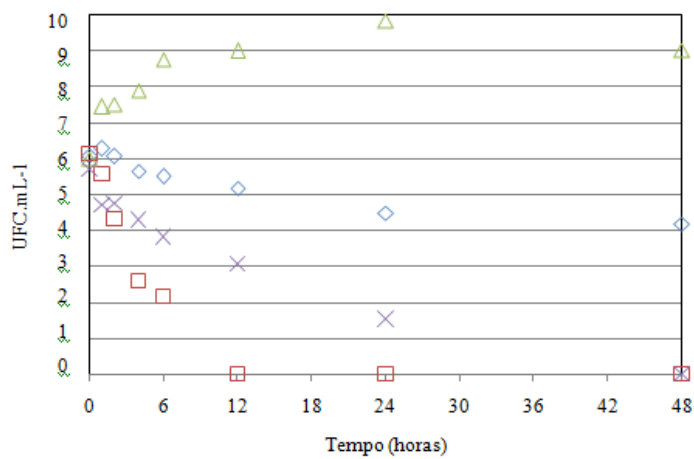
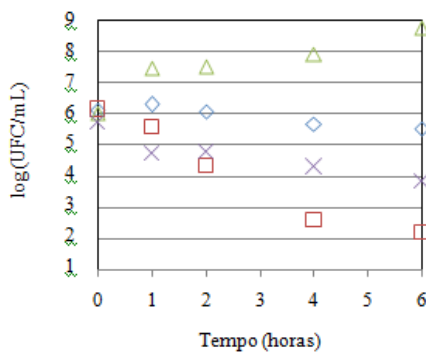
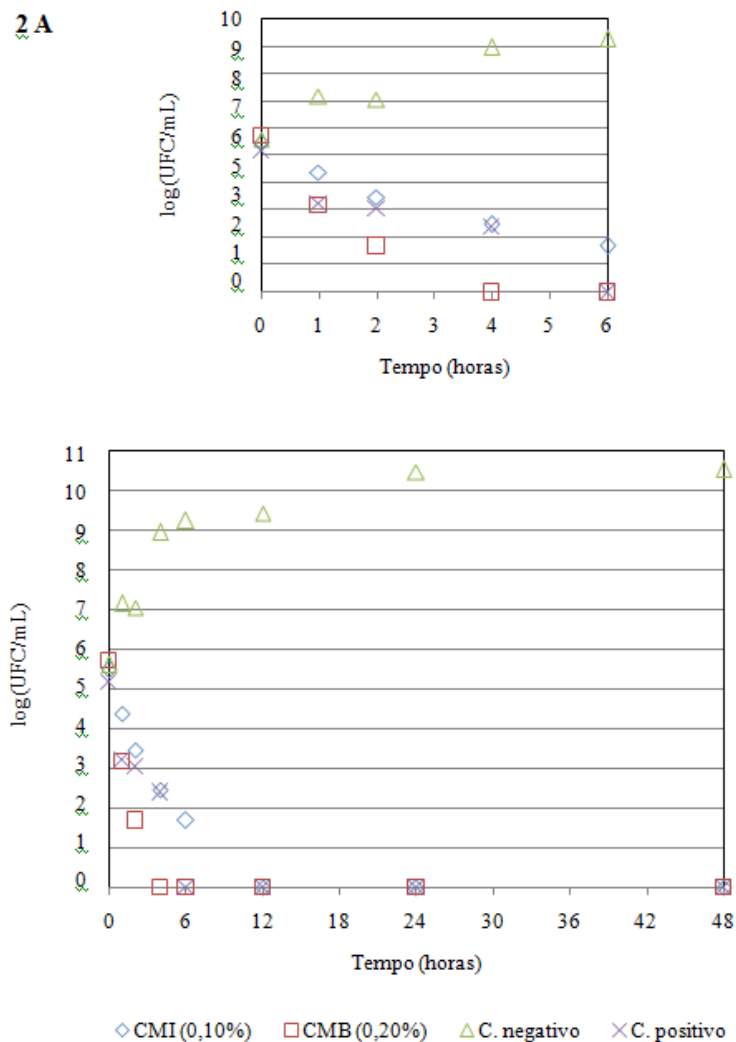


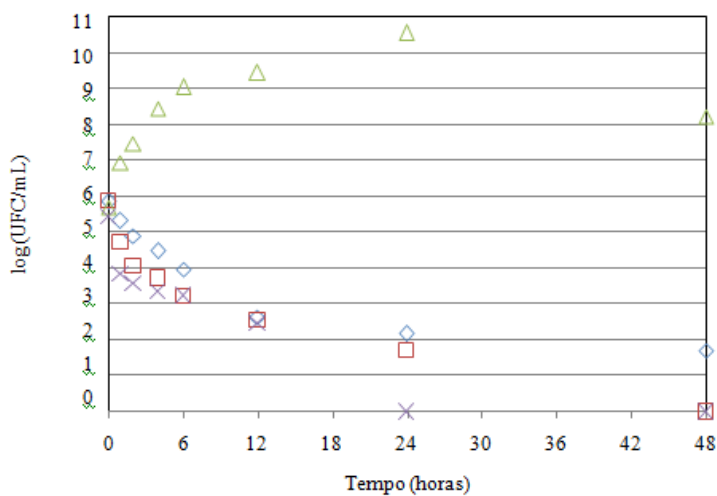
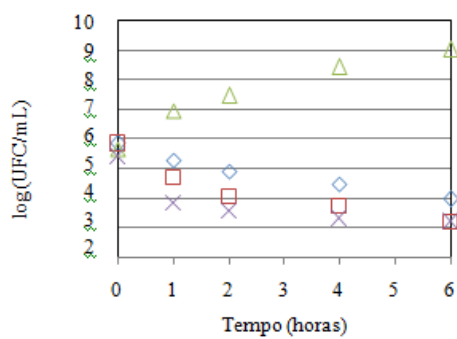
Figura 2 - Dados experimentais para o crescimento microbiano de *E. coli* na presença de diferentes ácidos orgânicos nas primeiras 6 h e durante 48 h. A: ácido láctico; B: ácido acético; C: ácido propiônico; D: ácido butírico e E: *mix* (solução composta pelos quatro ácidos em estudo, na mesma concentração).

* CMI: Concentração Mínima Inibitória; CMB: Concentração Mínima Bactericida; C. negativo: água Milli-Q; C. positivo: ciprofloxacino (0,05 mg mL⁻¹)

2A

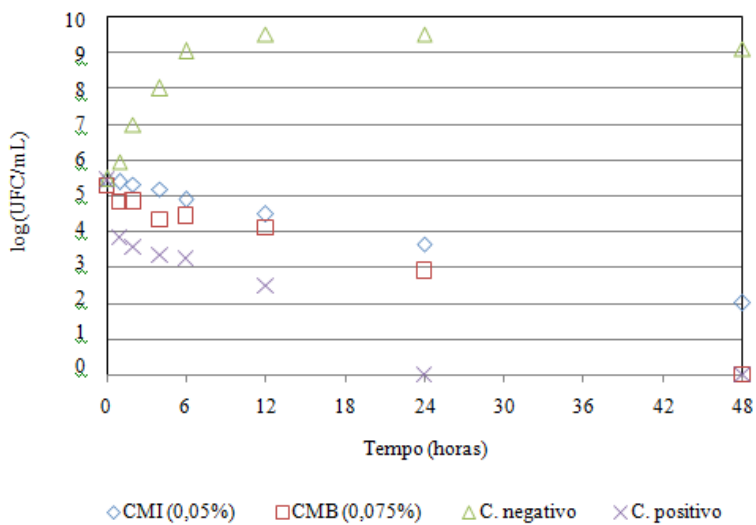
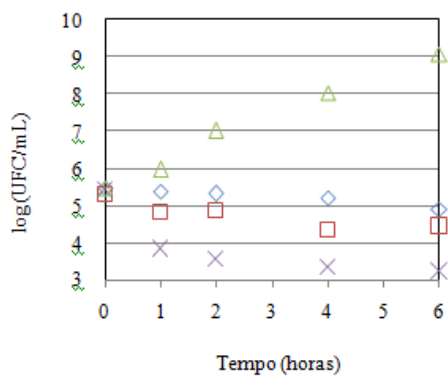


2B

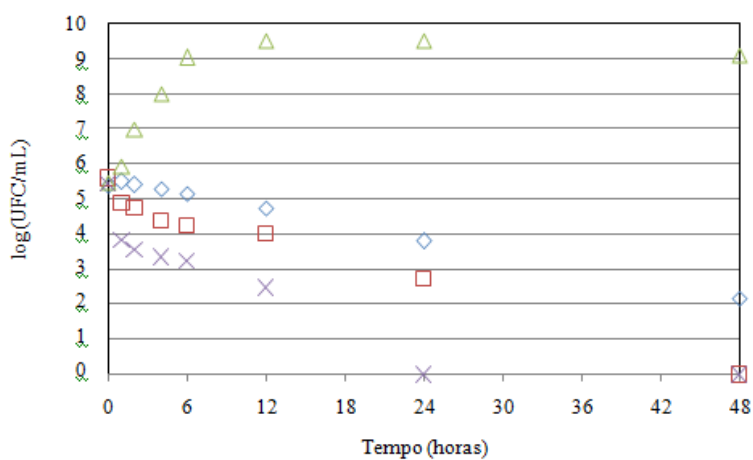
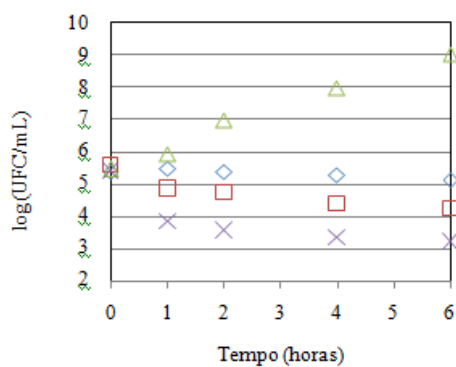


◇ CMI (0,05%) □ CMB (0,075%) △ C. negativo × C. positivo

2 C

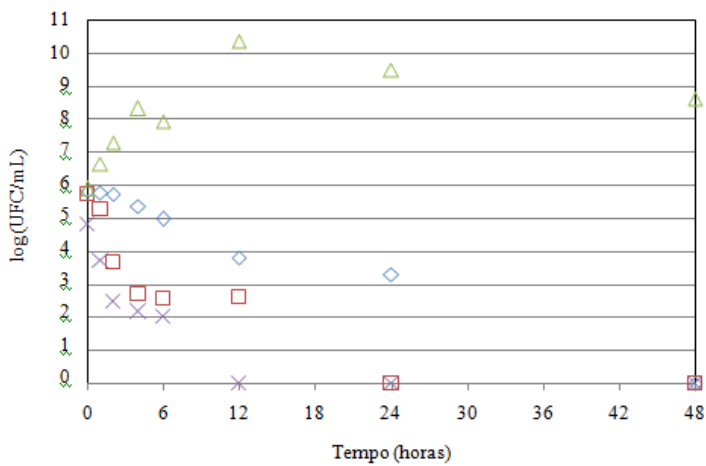
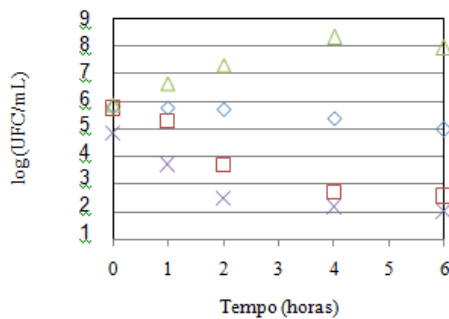


2D



◇ CMI (0,05%) □ CMB (0,10%) △ C. negativo × C. positivo

2 E



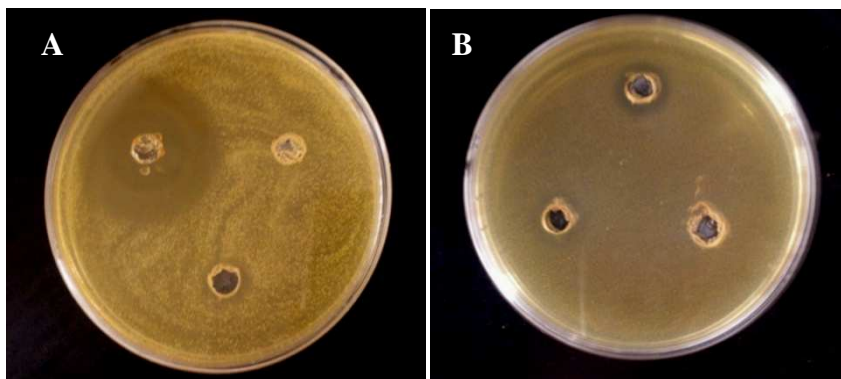
◇ CMI (0,05%) □ CMB (0,10%) △ C. negativo × C. positivo

3.3 Experimento 2: Identificação do potencial antimicrobiano da ASFAM.

Assim como a composição dos ácidos orgânicos na amostra de ASFAM, outro fator importante que deve ser considerado para a eficácia da ASFAM é o pH do meio, uma vez que este é um dos fatores determinantes para o desenvolvimento microbiano. No teste de crescimento microbiano o valor do pH no tubo com o caldo nutriente e ASFAM foi de 5,0, já que nos controles negativos e positivos, o valor do pH foi de 9,0 e 7,0, respectivamente.

A partir do teste de difusão em ágar, pode-se prever que a ASFAM apresenta ação antimicrobiana sobre as cepas estudadas (Tabela 2). Observou-se a presença de um halo de inibição ao redor dos poços preenchidos com o resíduo em estudo, indicando que a atividade antimicrobiana sobre o *S. aureus* (Figura 3 A) ocorreu com a formação de halo no período de até 48 h de incubação e para a *E. coli* ocorreu em 24 h e aumentou durante as 48 h de incubação (Figura 3 B).

Figura 3 - Teste de difusão em ágar para *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) após 48 h de incubação a 35 °C



T: ASFAM em teste;

+: controle positivo (ciprofloxacino 0,05 mg mL⁻¹);

-: controle negativo (água Milli-Q).

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana da ASFAM sobre *S. aureus* e *E. coli*

	Halo de inibição (mm)			
	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h
ASFAM	0,0	3,5	3,0	4,5
Controle positivo	17,0	9,0	3,5	3,0
Controle negativo	0,0	0,0	0,0	0,0

Controle positivo (ciprofloxacino 0,05 mg mL⁻¹);

Controle negativo (água Milli-Q).

Assim como no teste de difusão em ágar, os testes de crescimento em caldo, também demonstraram a atividade antimicrobiana da ASFAM. Os testes de crescimento microbiano em caldo são considerados mais precisos quando comparados aos de difusão em ágar, pois nestes ocorre uma maior interação entre o agente antimicrobiano e as bactérias.

O *S. aureus* (Figura 4) apresentou uma resistência maior aos agentes antimicrobianos da ASFAM em relação a *E. coli* (Figura 5). Neste estudo o desenvolvimento da *E. coli* foi totalmente cessado com a incubação por 1,5 h e o *S. aureus* em 24 h.

Pode-se explicar a ação da ASFAM exercendo um efeito mais lento, porém não menos intenso sobre o *S. aureus*, quando comparado a *E. coli*, observando o efeito individual dos ácidos sobre esta cepa. O *S. aureus*, apesar de ser sensível a concentrações baixas do ácido láctico (CMI a 0,05 % e CMB a 0,15 %), somente após 48 h não foi possível a determinação de colônias visíveis (Figura 1 A). As soluções dos ácidos acético (CMB 0,15 %), butírico (CMB 0,25 %) e o *mix* foram as que, isoladamente, exercem os efeitos mais rápidos sobre o *S. aureus* (12 h).

Com a ASFAM ocorreu a formação de halo em 48 h e o *S. aureus* não foi quantificado no teste de crescimento em caldo com 24 h de incubação. Apesar da concentração total de ácidos de 0,95 % na ASFAM ser bastante superior aquela testada no *mix* (0,1 %), o tempo de incubação para a inibição do crescimento não diminuiu, ou seja, o tempo de contato na solução antimicrobiana é mais relevante para a inibição do crescimento do *S. aureus* do que a concentração total de ácidos.

Figura 4 - Dados experimentais do crescimento microbiano de *S. aureus* na ASFAM nas primeiras 6 h e durante 24 h.

Controle positivo: ciprofloxacino (0,05 mg mL⁻¹); Controle negativo: água Milli-Q.

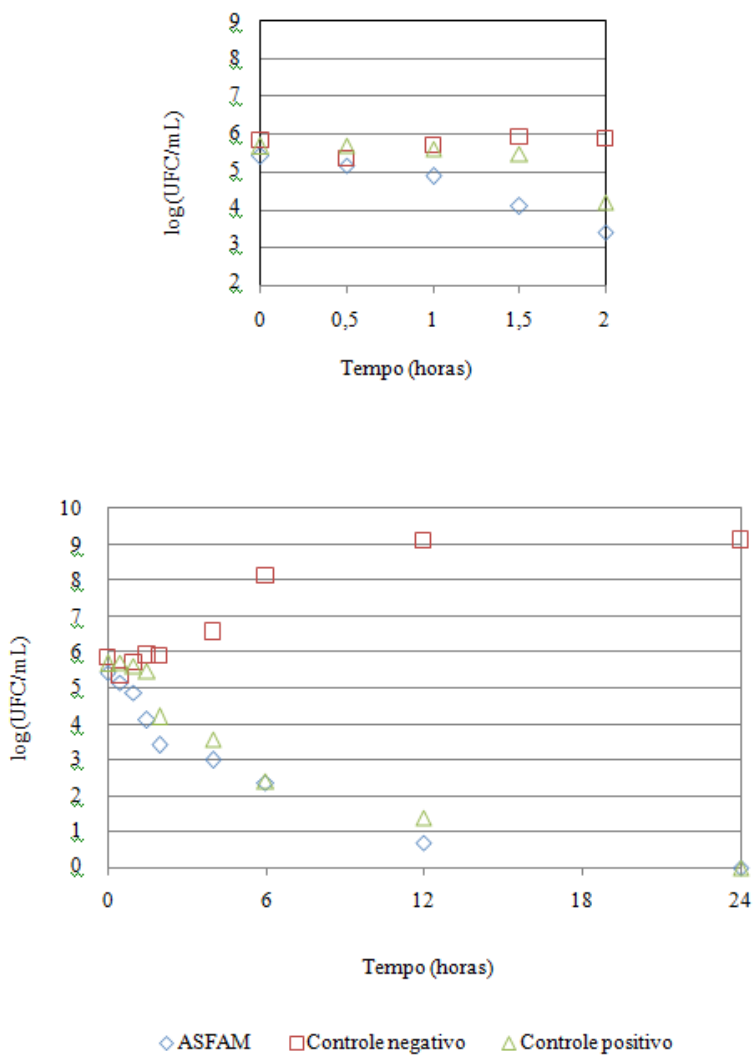
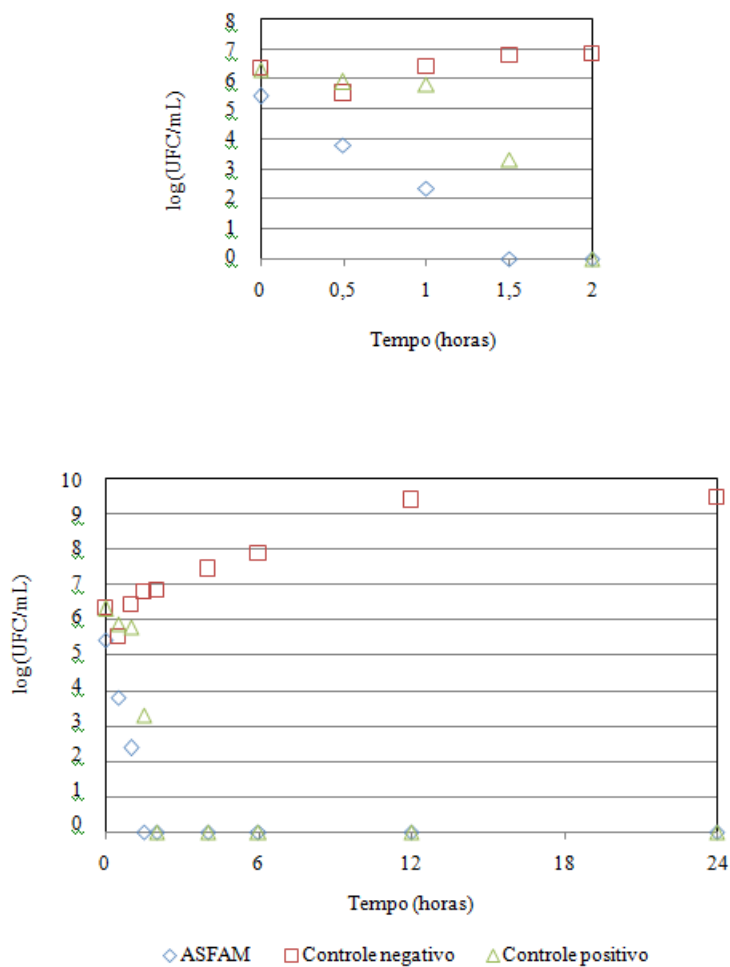


Figura 5 - Dados experimentais do crescimento microbiano de *E. coli* na ASFAM nas primeiras 6 h e durante 24 h.

Controle positivo: ciprofloxacino (0,05 mg mL⁻¹); Controle negativo: água Milli-Q.



Tendo em vista estes resultados podemos atribuir o efeito antimicrobiano mais lento da ASFAM a composição dos ácidos orgânicos desta amostra e à estrutura mais resistente das paredes celulares da bactéria *S. aureus*. Provavelmente o resíduo tenha levado um maior tempo para permeá-la, explicando o maior tempo para cessar o seu desenvolvimento em relação à *E. coli*.

Verificamos a atividade antimicrobiana da ASFAM sobre a *E.coli* como o melhor agente antimicrobiano estudado neste trabalho, sendo superior inclusive ao controle positivo para esta cepa. Observando os ácidos isoladamente, pode-se verificar que a *E. coli* foi mais sensível ao ácido láctico (CMB 0,2 %), não sendo possível a contagem após 4 h de incubação. Os demais ácidos tiveram ação antimicrobiana letal somente em incubação por 48 h, no entanto as concentrações de CMI e CMB dos ácidos acético, propiônico, butírico e *mix* foram muito mais baixas do que a encontrada na ASFAM.

Com base no exposto pode ser afirmado que a concentração dos ácidos tem influência direta no tempo de inibição da *E. coli*. Quanto maiores as concentrações mais rápida se dá a morte bacteriana. No entanto, devido à intensidade da atividade antimicrobiana da ASFAM acredita-se ser possível que ocorra alguma interação entre estes ácidos ou com algum outro agente antimicrobiano presente nestas águas da fermentação do amido de mandioca.

4 CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, neste estudo, confirmou-se a atividade antimicrobiana da ASFAM frente a *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC 25922). Pode-se atribuir esta propriedade aos ácidos orgânicos presentes neste material, levando em consideração que todos os ácidos estudados possuem atividade antimicrobiana, mesmo em concentrações inferiores as encontradas na ASFAM. No entanto, registrou-se que a ASFAM tem um efeito inibitório mais rápido sobre *E. coli*, quando comparado aos ácidos testados e que, possivelmente, este efeito está diretamente relacionado a concentração dos ácidos presentes ou a um efeito sinérgico entre os ácidos ou ainda à existência de algum outro composto ou molécula na ASFAM que potencializa esta ação, uma vez que sua composição não foi completamente caracterizada. Por outro lado, este estudo revelou que para *S. aureus*, o aumento da concentração dos ácidos presentes na ASFAM não foi determinante para a aceleração do efeito

antimicrobiano e que este efeito se mostrou dependente do tempo de contato. Estas informações podem servir como base para estudos visando a aplicação das águas obtidas da fermentação do amido de mandioca em produtos como biofilmes ou coberturas para proteção de alimentos.

REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. WILLIAN, H.; GEORGE, W.L. (Eds.), Current through revision 3, 2010, 18 th ed., Gaithersburg, Maryland, 2005.

AQUINO, A.C. **Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação de amido de mandioca: ácidos orgânicos e suas relações com as propriedades do polvilho azedo**. 2015. 228 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015

AQUINO, A.C.M.S.; AZEVEDO, M.S.; RIBEIRO, D.H.B.; COSTA, A.C.O.; AMANTE, E.R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, v.172, p.725-730, 2015.

AVANCINI, S. R. P. **Caracterização físico-química, microbiológica e toxicológica das águas de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

AVANCINI, S.R.P.; FACCIN, G.L.; VIEIRA, M.A.; ROVARIS, A.A.; PODESTÁ, R.; TRAMONTE, R.; SOUSA, N.M.A.; AMANTE, E.R. Cassava starch fermentation wastewater: characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chemical Toxicology**,v.45, p.2273-2278, 2007.

BACK, S.Y.; JIN, H.H.; LEE, S.Y. Inhibitory effect of organic acids against *Enterobacter sakazakii* in laboratory media and liquid foods. **Food Control**, v.20, p.867-872, 2009.

BARKER, C.; PARK, S.F. Sensitization of *Listeria monocytogens* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1594-1600, 2001.

BENASSATTI, H.E.; MARFIL, L.M.; OCCHIONERO, M. Acido acético: su capacidad desinfectante. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.28, n.3, p.411-419, 1994.

BIAZOTTO, L.M. **Utilização das águas da fermentação do polvilho azedo na elaboração de uma nova bebida**. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

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

DAVIDSON, P.M. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In: Doyle, M., Beuchat, L. (Ed.), **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 2^a ed. ASM Press, Washington, p. 520–556, 2007.

Davidson, P. M. Food microbiology–fundamentals and frontiers. In M. P. Doyle, L. R. Beuchat, & T. J. Montvile (Eds.), **Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds**. 2^a ed. ASM Press, Washington p. 593-627, 2001.

DE VRIES, M.C.; VAUGHAN, E.E.; KLEEREBEZEM, M.; DE VOS, W.M. *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. **International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

DEMIATE, I.M.; BARANA, A.C.; CEREDA, M.P.; WOSIACKI, G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.131-135, 1999.

EDELSON-MAMMEL, S.; PORTEOUS, M.K.; BUCHANAN, R.L. Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating the cells to an acidic environment. **Journal of Food Science**, v.71, p.201-207, 2006.

FRAISE, A.P.; WILKINSON, C.R.; BRADLEY, C.R.; OPPENHEIM, B.; MOIEMEN, N. The antibacterial activity and stability of acetic acid. **Journal of Hospital Infection**, v.84, p.329-331, 2013.

GOERING, R.V.; **Microbiologia Médica de Mins**. Tadução de Acir Costa Fernandes. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, 538 p.

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

HAQUE, M.N.; CHOWDHURY, R.; ISLAMAND, K.M.S.; AKBAR M. A. Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. **Bangladesh Journal of Animal Science**.v.38, p.115-122, 2009.

LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A.. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.2, p.213-215, 2005.

LEE, Y.L.; CESARIO, R.; OWENS, J.; SHANBROM, E.; THRUPP, L.D. Antibacterial activity of citrate and acetate. **Nutrition**, v.18, p.665-666, 2002.

LINDSAY, R. C. Aditivos Alimentares. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 537-584.

MORLON-GUYOT, J.; GUYOT, J.P.; POT, B.; JACOB DE HAUT, I.; RAIMBAULT, M. *Lactobacillus manihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrlysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermnetation. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, n.4, p.1101-1109, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M7-A6**: metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico: norma

aprovada. 6. ed. Anvisa, v. 23, n.2. Substituí a Norma M7-A5 v. 20, n. 2. Disponível em
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2013.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.L.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 391-398, 2005.

OH, D.H.; MARSHALL, D.L. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.20, p.239-246, 1993.

OLIVEIRA, C.E.V.; STAMFORD, T.L.M.; NETO, N.J.G.; SOUZA, E.L. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in broth and meat broth using synergies of phenolics and organic acids. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, p.312-316, 2010.

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.

REGINATTO, V.; KURTZ, D.; MARCON, M.J.A.; XAVIER, J.J.M.; SCUSSEL, V. M.; AMANTE, E.R. **Modificação do Processo de Produção de Polvilho Azedo Visando o Aumento na Concentração de Ácidos Orgânicos na Água Residuária**. 2º International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo, 2009.

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

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; PÁDUA, I.P.M.; DINÍZIOGOERING, R.V.; **Microbiologia Médica de Mins**. Tradução de Acir Costa Fernandes. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, 538 p.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.L.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to

inhibit the growth of *Salmonella* sv. Typhimurium: a synergistic effect? **Food Microbiology**, v. 22, n. 5, p. 391-398, 2005.

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

SILVEIRA, I.A.; CARVALHO, E.P.; PÁDUA, I.P.M.; DINÍZIO

, F.L.; MARQUES, S.C. Isolamento e caracterização da microbiota ácido láctica envolvida no processo fermentativo para produção de polvilho azedo. **Pró Homine: Revista Científica da Unilavras**, v.2, n.2, p.7-14, 2003.

SUN, C.Q.; O'CONNOR, C.J; TURNER, S.J.; LEWIS, G.D.; STANLEY,R.A.; ROBERTON, A.M. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: implications for neonates fed on suckled milk. **Chem Biol Interact.** v.113 n.2, p.117-31, 1998.

UTYAMA, I.K.A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectivas na terapêutica de feridas.** 2003. 148 f. Dissertação (Mestrado em enfermagem), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

WANG, C.; CHANG, T.; YANG, H.; CUI, M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella* Enteritidis, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.47, p.231-236, 2015.

WANG, Y.; DAI, A.; HUANG, S.; KUO, S.; SHU, M.; TAPIA, C.P.; YU, J.; TWO, A.; ZHANG, H.; GALLO, R.L.; HUANG C.-M. Propionic acid and its esterified derivative suppress the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300. **Beneficial Microbes**. v.5, n.2, p.161-168, 2014.

ZOTOU, A.; LOUKOU, Z.; KARAVA, O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 60, n. 1/2, p. 39-44, 2004.

CAPÍTULO 3

**INIBIÇÃO IN VITRO DE *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* E
Colletotrichum gloeosporioides PELAS ÁGUAS SOBRENADANTES
DA FERMENTAÇÃO DO AMIDO DE MANDIOCA E SEUS
ÁCIDOS ORGÂNICOS**

Inibição *in vitro* de *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* e *Colletotrichum gloeosporioides* pelas águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca e seus ácidos orgânicos

Resumo

Durante a etapa de fermentação do amido de mandioca, processo que origina o polvilho azedo, é gerado um resíduo líquido, neste estudo denominado água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM), que possui uma elevada carga de compostos solúveis e suspensos. Este resíduo é descartado no ambiente e pode gerar danos ambientais. Alternativas para transformar este efluente da agroindústria do polvilho azedo em uma matéria prima estão de acordo com a necessidade de substâncias naturais e não tóxicas para uso na prevenção de doenças na pós-colheita de frutas. O objetivo deste estudo foi quantificar os ácidos orgânicos presentes em ASFAMs com diferentes origens (ASFAM 1, ASFAM 2 e ASFAM 3) e avaliar a atividade antimicrobiana, visando uma possível aplicação deste resíduo. Foi estudado o efeito de três ASFAMs e dos padrões dos ácidos orgânicos (ácidos láctico, acético, propiônico e butírico) de forma isolada ou em conjunto sobre o desenvolvimento e crescimento de *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* e *Colletotrichum gloeosporioides* avaliando-se: 1- a germinação conidial, onde a suspensão conidial foi feita com o resíduo ou com as soluções ácidas; 2- o crescimento micelial, avaliado em placa de Petri contendo BDA onde, sobre o meio, 200 µL do resíduo foram espalhados com uma alça de Drigalski; 3- a inibição do crescimento micelial sobre a área da placa com o resíduo, onde 100 µL do resíduo foram espalhados com uma alça de Drigalski em meia placa. Através dos resultados obtidos, verificou-se que as ASFAMs tiveram efeito antimicrobiano sobre os três fungos estudados. Nos tratamentos com a ASFAM 2, nenhum conídio germinado foi visualizado, resultado igual ao controle positivo. Nos tratamentos com as ASFAMs 1 e 3, para os conídios de *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, também não foi visualizada nenhuma germinação. Os ácidos acético, propiônico, butírico e o mix também foram efetivos na redução da germinação conidial. Nas análises de crescimento micelial observou-se que o crescimento foi estatisticamente menor, em relação ao controle negativo, para todos os fungos nos tratamentos com as ASFAMs e com a solução padrão de ácido butírico. Já o crescimento

micelial lateral foi afetado em todos os tratamentos para as três espécies estudadas.

Palavras-chave: Polvilho azedo. Águas residuais. Atividade antifúngica. *Botrytis cinérea*. *Monilinia fructicola*. *Colletotrichum gloeosporioides*

In vitro inhibition of *Botrytis cinerea*, *Monilinia fruticicola* and *Colletotrichum gloeosporioides* by cassava starch fermentation wastewater and its organic acids

Abstract

During the stage of fermentation of cassava starch, process which originates the sour cassava starch, it is generated a liquid waste, in this study named supernatant water of fermentation of cassava starch (ASFAM), which has an elevated charge of molecules in suspension or solubilized. This waste is rejected in the environment and can generate environmental damages. Alternatives to transform this effluent of agroindustry of sour cassava starch into a raw material meet the necessity of natural and non-toxic substances for use in the prevention of diseases in the post-harvest of fruit. This study aimed at quantifying the organic acids present in the ASFAMs with different origins (ASFAM 1, ASFAM 2 and ASFAM 3) and evaluate the antimicrobial activity, aiming at a possible application of this waste. It has been studied the effect of three ASFAMs and patterns of organic acids (lactic, acetic, propionic and butyric acids) singly or together on the development and growing of *Botrytis cinerea*, *Monilinia fruticicola* and *Colletotrichum gloeosporioides* evaluating: 1- conidial germination, where the conidial suspension was carried out with the waste or with the acid solutions; 2- the mycelial growth, evaluated in Petri dish containing BDA where, upon the environment 200 μL of waste was spread with a Drigalski handle; 3- the inhibition of mycelial growth on the dish area with the waste, where 100 μL of waste were spread with Drigalski handle in half dish. Through the results obtained, it has been verified that the ASFAMs had antimicrobial effect on the three fungi studied. In the treatments with ASFAM 2 none germinated conidia were visualized, equal result to positive control. In the treatments with the ASFAMs 1 and 3, for the conidia of *B. cinerea* and *C. gloeosporioides*, it has not also visualized any germination. The acetic, propionic, butyric and the mix acids were also effective in the reduction of conidial germination. In the analysis of mycelia growth, it has been observed that the growing was statically smaller, in relation to negative control, for all fungi in the treatments with the ASFAMs and with the pattern solution of butyric acid. On the other hand, the lateral mycelial growth was affected in all treatments for the three species studied.

Key-words: Sour cassava starch. Residual waters. Antifungal activity. Organic acids. *Botrytis cinérea*. *Monilinia fruticola*. *Colletotrichum gloeosporioides*

1 INTRODUÇÃO

O processo de produção do polvilho azedo envolve a fermentação natural do amido de mandioca e produz um resíduo líquido, rico em ácidos orgânicos, tradicionalmente empregados na conservação de alimentos, sendo o principal deles, o ácido propiônico, porém os ácidos láctico, acético e butírico também podem exercer ação protetora em alimentos. No entanto, este resíduo ainda pouco estudado é, até o momento, lançado diretamente no ambiente contribuindo para aumentar o risco de danos ambientais.

Muitas propriedades funcionais, já evidenciadas na fermentação do polvilho azedo, podem estar relacionadas aos ácidos orgânicos presentes nas águas residuais da fermentação. Apesar de extensivos estudos do polvilho azedo e suas propriedades (CÁRDENAS; BUCKLE, 1980; CEREDA; BONASSI, 1985, ASCHERI, 1992; CEREDA, 1993; ASCHERI; VILELA, 1995; CARVALHO; CANHOS; VILELA, 1995; PLATA-OVIEDO; CAMARGO, 1995; 1998; MESTRES; ROUAU, 1997; DEMIATE et al., 1999; LACERDA et al., 2005; MARCON et al., 2006; MARCON, 2009; MARCON et al., 2009) não foram encontrados trabalhos considerando a água residual da fermentação do polvilho azedo com potencial antifúngico.

O “setor polvilheiro” é composto, em sua maioria, por pequenas unidades familiares muito rudimentares. No entanto, novas tecnologias têm sido ansiadas pelas pessoas envolvidas neste meio. Logo, alternativas para transformar o resíduo desta agroindústria em uma matéria prima estão de acordo com a necessidade de substâncias naturais e não tóxicas para uso na prevenção de doenças na pós-colheita de frutas.

As pesquisas e o desenvolvimento de produtos naturais para serem utilizados como agrotóxicos no controle da deterioração de frutos por fungos na pós colheita deve ser encorajada já que a toxicidade, pelo menos em níveis de administração oral, é comprovada através do consumo destes por milhares de anos. Pela segurança que os produtos naturais representam para os animais e para o ambiente, a pesquisa e o desenvolvimento de um novo produto representam um custo e um período de tempo muito menor para o registro e disponibilização no mercado, em relação a um produto sintético.

Os fungos *B. cinerea*, *M. fructicola* e *C. gloeosporioides*, são responsáveis pelas perdas de uma grande variedade de frutas e possuem importância em várias culturas da região Sul do Brasil. Estes fungos causam

doenças como o mofo cinzento em morango, a podridão parda em pêssego e a antracnose em mamão, respectivamente.

Visando formular uma fundamentação teórica para os mecanismos de proteção de frutos pós-colheita, este trabalho tem o objetivo de verificar como três espécies de fungos se comportam quando submetidos a diferentes testes antimicrobianos com as águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) de diferentes origens e verificar se a ação antimicrobiana tem relação com os ácidos orgânicos contidos nesta matéria prima, uma vez que não há relatos publicados de uso das propriedades antimicrobianas deste material.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para estudar a capacidade antifúngica, *in vitro*, das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca (ASFAM), foram medidos o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a germinação conidial de três espécies de fungos importantes na pós-colheita de frutas e hortaliças. O experimento foi realizado no Laboratório de Interação Planta-Patógeno do Departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia 'Eliseu Maciel' da Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul.

2.1 Material

Foram estudadas três amostras de águas residuais da produção do amido de mandioca obtidas de três empresas do Estado de Santa Catarina, denominadas: ASFAM 1 – amostra oriunda da cidade de São João do Sul, ASFAM 2 – amostra oriunda da cidade de Ibirama e ASFAM 3 – amostra oriunda da cidade de Agronômica. A coleta seguiu um planejamento considerando a representatividade das empresas mapeadas, o que foi avaliado mediante visitas e coleta de dados quantitativos da produção destes resíduos. As ASFAMs foram acondicionadas em embalagens higienizadas e transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças – UFSC no mesmo dia da coleta. Foram realizadas as análises físico-químicas (pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais) na chegada das amostras, as quais foram armazenadas em freezer a -18 ± 1 °C.

Antes da realização dos testes antimicrobianos, as ASFAMs foram microfiltradas em membranas de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,22 μm (Allcrom, São Paulo, Brasil).

Para a elaboração das soluções padrões dos ácidos utilizados na determinação dos ácidos orgânicos presentes nas amostras e na realização das análises microbiológicas, foram utilizados os ácidos: láctico (pureza 90 %) e butírico (pureza $\geq 99,5$ %) da marca Fluka (Buchs, Suíça), acético (pureza $\geq 99,8$ %) e propiônico (pureza $\geq 99,8$ %) da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O metanol com grau HPLC foi adquirido da J. T. Barker (Mallinckrodt, Phillipsburg, NJ, EUA). A água utilizada para todas as análises foi destilada e purificada em equipamento Simplicity (resistividade 18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}$, Millipore, EUA).

2.2 Métodos

2.2.1 Caracterização físico-química das ASFAMs

O pH das amostras foi determinado através da leitura em um potenciômetro da marca Quimis modelo Q 400 A (Diadema, São Paulo, Brasil), em triplicata. A acidez total titulável foi determinada através do método oficial 950.07 da AOAC (2010).

Os sólidos totais (ST) foram determinados por gravimetria, em triplicata, com a pesagem de 10 mL da amostra em placas de Petri, previamente secas e taradas, que foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar (Marca Fabbe, São Paulo) a 60 °C, até peso constante.

A identificação e a quantificação dos ácidos orgânicos presentes nas ASFAMs foram realizadas conforme o método descrito por Aquino et al. (2015) utilizando-se um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) equipado com uma bomba quaternária e um desgaseificador (LC-20AT), um injetor automático (SIL-10A), com um loop de 20 μL , um detector de arranjos de diodo (SPD-M20A) operando no comprimento de onda de 220 nm, controlados por uma estação de trabalho (CBM-20-A), com sistema de aquisição de dados LC Solutions Software, todos fabricados pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão).

Como fase estacionária, foi utilizada uma coluna C18, Hichrom (150 x 4,6 mm - Berkshire, UK). As fases móveis utilizadas, com fluxo isocrático de 0,6 mL min^{-1} , foram constituídas por solução de KH_2PO_4 0,02 mol L^{-1} com pH $2,88 \pm 0,2$ (ajustado com ácido fosfórico) e de metanol,

98:2 para os ácidos láctico, acético e propiônico (ZOTOU; LOUKOU; KARAVA, 2004), e 60:40 para o ácido butírico.

2.2.2 Preparo Das Soluções Com Os Padrões Dos Ácidos Orgânicos Para Os Testes Antifúngicos

Para comparar o efeito das ASFAMs com os padrões de ácidos, foram elaboradas as soluções dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico nas mesmas concentrações encontradas na ASFAM, utilizando-se a maior concentração de cada ácido entre as ASFAM estudadas (Tabela 3). Para a realização das análises microbiológicas, foram elaboradas soluções estoques de todos os ácidos com uma concentração de 10 %. A solução mix foi elaborada a partir dos padrões de ácido láctico, acético, propiônico e butírico na proporção de 1:1:1:1, também com uma concentração final de 10 %. A partir destas soluções, foram elaboradas todas as soluções testadas.

2.2.3 Obtenção e isolamento dos patógenos

A atividade antimicrobiana das ASFAMs foi estudada sobre as cepas de *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* e *Colletotrichum gloeosporioides*, isoladas de frutos de morango, pêssego e mamão, respectivamente, em fase inicial de desenvolvimento das lesões. Os frutos de morango foram adquiridos diretamente do produtor no município de Morro Redondo (RS), no dia em que foram colhidos, e foram acondicionados em câmara úmida a 25 °C para o desenvolvimento fúngico. Os pêssegos com as lesões características foram colhidos na estação experimental da EMBRAPA Clima Temperado localizada na cidade de Pelotas e os frutos de mamão com as lesões já desenvolvidas foram adquiridos em um supermercado também na cidade de Pelotas (RS).

Por meio de isolamento direto, as estruturas fúngicas características das lesões causadas pelos fungos em estudo foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), com auxílio de estilete, em câmara de fluxo em condições assépticas. Em seguida, as placas foram acondicionadas em estufa a 25 °C com fotoperíodo de 12 h.

2.2.4 Identificação do potencial antimicrobiano das ASFAMs e dos padrões dos ácidos orgânicos encontrados neste material

Para medir o efeito antimicrobiano das ASFAMs e dos padrões dos ácidos orgânicos, foi elaborado um delineamento experimental conforme a Tabela 1.

Os dados foram analisados através do software Assistat 7.7 Beta (2015). Os quais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, com significância de 5 % ($p < 0,05$).

Tabela 1 - Delineamento experimental para verificar a ação antimicrobiana das ASFAMs e dos padrões dos ácidos orgânicos estudados

Tratamento	Variáveis independentes		Variáveis dependentes
	Suspensões/soluções testadas	Cepa	
P1	*ASFAM P1		Crescimento microbiano
P2	ASFAM P2		
P3	ASFAM P3		**IVCM
Ac. lálico	Ác. lálico	<i>B. cinerea</i>	
Ác. acético	Ác. acético	<i>C. gloeosporioides</i>	Crescimento microbiano lateral
Ác. propiônico	Ác. propiônico	<i>M. fruticola</i>	
Ác. butírico	Ác. butírico		
Mix	Mix		
Controle negativo – Água mineral			Germinação conidial
Controle positivo – Estreptomicina			

*ASFAM: Água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca

**IVCM: Índice de velocidade de crescimento micelial

2.2.5 Análises

2.2.5.1 Germinação conidial

Para cada tratamento foi utilizada uma placa de Petri com uma cultura fúngica com 10 a 15 dias de crescimento. Em cada placa, depositaram-se 5 mL de amostra em estudo e 10 µL de Tween 20 e, com uma alça de Drigauski, obteve-se uma suspensão de conídios e micélio. As suspensões foram filtradas em gaze e a quantidade de conídios foi determinada pela contagem em uma câmara de Neubauer, sendo ajustadas para a concentração de 10^5 conídios mL⁻¹. Placas de Petri de polietileno de 90 mm foram divididas em quatro quadrantes e, em cada quadrante, se

depositou uma gota de 40 μL da suspensão conidial, em triplicata. Em seguida, cada placa foi acondicionada aberta dentro de uma caixa tipo gebox desinfetada, forrada com papel umedecido com água esterilizada formando uma câmara úmida. As suspensões foram incubadas a 27 °C, 100 % de UR e fotoperíodo de 12 horas luz. O crescimento fúngico foi paralisado pela adição de 5 μL de lactofenol e 5 μL de Azul de Amann. A geminação conidial foi avaliada após o período de incubação (tempo determinado através de testes preliminares). Para determinar a germinação conidial, avaliou-se microscopicamente (200x) 50 conídios por gota. Conídios germinados foram considerados aqueles que apresentavam apressório sésil ou um tubo germinativo maior do que a largura do próprio conídio. O experimento foi realizado duas vezes para cada fungo em estudo.

2.2.5.2 Crescimento micelial

O teste foi implantado em placas de Petri de polietileno, de 60 mm de diâmetro, contendo meio de cultura nutritivo para crescimento de micro-organismos BDA (Barata-dextrose-ágar). Sobre o meio de cultura foram depositados 200 μL de cada solução em estudo sendo espalhados uniformemente com uma alça de Drigauski. Para o centro de cada placa foi transferido um disco com 8 mm de diâmetro de micélio, repicado de uma colônia com 10 dias de crescimento em meio BDA. Após a repicagem, as placas, vedadas com filme PVC, foram alocadas em sala de crescimento e mantidas a 24 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz, até o micélio atingir mais de 2/3 da placa. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento e o experimento foi repetido duas vezes.

A avaliação do crescimento micelial foi verificada pela quantificação diária da colônia, obtida pela média de duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se paquímetro digital, em milímetros (mm) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo fórmula adaptada por (ARAÚJO et al., 2008) (Equação 1).

$$\text{IVCM} = \sum (D - D_A) / N \quad (1)$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro micelial médio atual;

Da = diâmetro médio anterior;

N = número de dias após a repicagem.

2.2.5.3 Crescimento micelial lateral

O teste de crescimento micelial lateral foi realizado mediante utilização de placas de Petri de polietileno, de 60 mm de diâmetro, contendo meio de cultura nutritivo para crescimento de micro-organismos BDA (barata-dextrose-ágar), as quais foram divididas ao meio. Foram espalhados uniformemente, com alça de Drigauski, 100 μ L de cada solução em um dos lados da placa. Para o centro do hemisfério da placa sem solução, foi transferido um disco de micélio com 8 mm de diâmetro, repicado de uma colônias com 10 dias de crescimento em meio BDA. Após a repicagem, as placas foram vedadas com filme PVC e mantidas em sala de crescimento, a 24 °C, com fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas 3 repetições por tratamento e o experimento foi repetido duas vezes. O crescimento lateral foi avaliado visualmente a cada 24 horas observando-se a área do hemisfério da placa, contendo as soluções em estudo, atingida pelos micélios (0; 12,5; 37,5; 62,5 e 87,5 %).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca

Na Tabela 2 podem ser observados os resultados de pH, acidez titulável, sólidos totais e de sólidos solúveis das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca, oriundas de três produtores do Estado de Santa Catarina, as quais foram utilizadas para a realização dos testes antimicrobianos.

Tabela 2 - Acidez, pH, sólidos totais e sólidos solúveis das águas de fermentação dos amidos de mandioca (ASFAM) oriundas de três produtores do Estado de Santa Catarina.

Amostra	pH	Acidez titulável (mL de NaOH 0,1 Mol L ⁻¹ /10mL)	Sólidos totais (g 100mL ⁻¹)	Sólidos solúveis (° Brix)
ASFAM 1	3,40±0,00 ^c	15,02±0,00 ^a	0,17±0,01 ^a	0,4
ASFAM 2	3,50±0,01 ^b	9,50±0,06 ^b	0,15±0,00 ^b	0,8
ASFAM 3	3,61±0,01 ^a	9,69±0,05 ^b	0,16±0,01 ^{ab}	1,0

* Para cada análise realizada os valores comparam as médias dos diferentes produtores de amido de mandioca fermentado, médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

ASFAM 1 – Origem: São João do Sul; ASFAM 2 – Origem: Ibirama; ASFAM 3 – Origem: Agronômica.

Os amidos de mandioca apresentam características similares, porém diferenças ocorrem devido às condições edafoclimáticas em que são produzidos, resultando em grânulos com grandes diferenças de tamanho, o que pode afetar a ação enzimática durante a fermentação. Esta pode ser uma das causas que modificam as características dos sólidos solúveis e suspensos da água de fermentação, de acordo com o local em que são produzidos.

Outra diferença entre as regiões são as espécies de micro-organismos recorrentes, que podem contribuir para a variação de alguns parâmetros, especialmente a acidez, que corresponde ao pKa específico dos ácidos orgânicos desenvolvidos na fermentação do amido de mandioca.

Os sólidos totais contidos na água de fermentação do amido de mandioca, provavelmente são constituídos por fragmentos de moléculas de amilose e de amilopectina, além de ácidos orgânicos e de células residuais de micro-organismos.

Avancini (2007) estudou a água residual da fermentação, obtida através de processo realizado em laboratório e em polvilharia, quanto às características químicas, microbiológicas e toxicológicas. Verificou que esta água possui uma baixa quantidade de sólidos totais, variando entre 0,17 a 0,6 g 100 mL⁻¹) e, conseqüentemente de nutrientes, apresentando as seguintes características químicas: pH entre 3,0 e 3,7; índice de acidez de 21 a 68 mL de NaOH mol L⁻¹ 100mL⁻¹; 0,19 a 0,62 g de ácido láctico 100mL⁻¹.

Os ácidos orgânicos foram identificados e quantificados nas amostras com base nos seus tempos de retenção. O método se mostrou

linear ($R > 0,99$) nas concentrações de 12,5; 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; e 400,0 mg L^{-1} para as soluções padrões de ácido láctico, ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico. A taxa de recuperação foi de 101,5 % para o ácido láctico, 100,3 % para o ácido acético, 97,9 % para o ácido propiônico e de 92,6% para o ácido butírico. Os valores de LOD e LOQ foram 1,9 e 6,3 mg L^{-1} para o ácido láctico, 1,9 e 6,5 mg L^{-1} para o ácido acético, 3,7 e 12,2 mg L^{-1} para o ácido propiônico e 1,0 e 3,1 mg L^{-1} para o ácido butírico, respectivamente, nas condições de trabalho aplicadas.

As concentrações dos ácidos orgânicos determinadas nas ASFAMs coletadas e utilizadas nos ensaios podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração (mg L^{-1}) de ácidos orgânicos em amostras de água de fermentação de amido de mandioca coletadas em polvilharias do Estado de Santa Catarina.

Polvilharias	mg L^{-1}			
	Ácido láctico	Ácido acético	Ácido propiônico	Ácido butírico
ASFAM 1	365,4 ± 5,7	2046,7 ± 1,9	499,1 ± 2,8	2403,78 ± 54,2
ASFAM 2	185,9 ± 5,8	832,7 ± 5,3	900,8 ± 3,7	3272,29 ± 46,8
ASFAM 3	86,3 ± 1,0	1205,3 ± 1,3	677,5 ± 2,2	2754,67 ± 22,0

^a: média ± desvio padrão.

3.2 Identificação do potencial antimicrobiano da ASFAM

A partir dos testes de germinação, de crescimento micelial e de crescimento micelial em direção ao composto antimicrobiano (crescimento lateral), é possível confirmar que as ASFAMs estudadas apresentaram ação antimicrobiana sobre todas as cepas analisadas.

Através da análise dos resultados apresentados na Tabela 4, verifica-se que nos ensaios de germinação estudando as três ASFAMs houve a inibição total da germinação dos conídios dos fungos *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*. Sobre a *M. fructicola*, a ASFAM 2 também inibiu a germinação de 100 % dos conídios, enquanto nos tratamentos com as ASFAMs 1 e 3 houve 5 e 2 % de germinação, respectivamente.

Observando a ação dos padrões dos ácidos de forma isolada sobre as três cepas estudadas (Tabela 4), verifica-se que os ácidos acético, butírico e o mix foram os que tiveram maior eficácia no controle da germinação dos conídios. A ASFAM 2 possui maior quantidade do ácido butírico, quando

comparada às demais águas, podendo-se atribuir a este ácido a ação inibitória sobre a germinação da *M. fructicola* por esta ASFAM.

Nos tratamentos com ácido láctico houve maior da germinação de *B. cinerea*. No entanto, sobre as demais cepas, tanto o ácido láctico quanto o ácido propiônico reduziram significativamente a germinação.

Nas Figuras 1, 2 e 3 pode-se observar o crescimento micelial, o IVCM e o crescimento lateral, respectivamente, do *B. cinerea* em meios de cultura contendo as ASFAMs e os ácidos orgânicos isolados. Verificou-se que as três águas estudadas reduziram o crescimento dos micélios, a velocidade de crescimento, bem como o avanço destes em direção a área das placas contendo os resíduos, nas primeiras 96 h de incubação, quando comparadas ao controle negativo.

Quando estudados isoladamente os tratamentos com o ácido butírico e com o mix, foram verificadas respostas semelhantes aos tratamentos com as águas residuais para a análise de crescimento e IVCM.

Na Figura 3 foi observado que as soluções de ácido butírico e de mix diminuiram o avanço do micélio durante as 192 h de incubação e o ácido propiônico, até as 144h. Os ácidos láctico e acético não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle negativo.

Nas Figuras 4, 5 e 6 estão apresentados os resultados de crescimento micelial, o IVCM e o crescimento lateral, respectivamente, da *M. fructicola*. Foi possível verificar que o crescimento micelial (Figura 4) foi mais influenciado pela ASFAM 1 e pelo ácido butírico, sendo que, ao calcular o IVCM (Figura 5), foi verificado que, para os mesmos tratamentos, houve uma diminuição na velocidade de crescimento, principalmente nas primeiras horas de incubação.

Para o crescimento micelial lateral da *M. fructicola* em direção aos tratamentos com as ASFAMs ou ao ácido butírico (Figura 6) houve uma diminuição significativa, no mesmo nível, em relação ao controle negativo. Embora menos intensas, também ocorreram quedas nos crescimentos, em relação ao controle negativo, nos tratamentos com os ácidos acético, láctico e propiônico.

Nas Figuras 7, 8 e 9 estão apresentados os resultados de crescimento micelial do *C. gloeosporioides*. Para este micro-organismo, os tratamentos tiveram efeitos semelhantes aos causados no *B. cinerea*. Com exceção dos ácidos butírico e mix que demonstraram um efeito menor no controle do crescimento lateral deste fungo quando comparado à sua ação sobre o *B. cinerea*.

Várias abordagens têm sido realizadas para estudar a eficácia dos efeitos antimicrobianos dos ácidos sobre as células. Estes efeitos têm sido comparados levando em consideração o pH, a concentração, o comprimento da cadeia, o tipo e o grau de ramificação para inibir ou matar uma grande variedade de micro-organismos, já que estes são os parâmetros que influenciam no crescimento ou na inibição de muitos micro-organismos. Com a adição de ácidos aos alimentos ocorre o abaixamento do pH e, embora os fungos em geral sejam os micro-organismos mais resistentes a pHs baixos, a ação antimicrobiana depende da espécie e das características do ácido como concentração, tipo e efeito tampão. Então, tem-se considerado que a ação dos ácidos orgânicos sobre fungos é mais efetiva como microbiostática do que como microbiocida (DOORES, 2005).

Segundo ADAMS (1999), os ácidos orgânicos têm sido considerados como responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, síntese do DNA e metabolismo energético dos micro-organismos. Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem causar alteração na permeabilidade da membrana, com o bloqueio do substrato do sistema de transporte de elétrons. Os ácidos lipofílicos fracos como láctico, acético ou propiônico são capazes de permear a membrana celular de micro-organismos em seu estado não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzindo íons H⁺ que diminuem o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. Por sua vez, os ânions dos ácidos impedem a síntese de DNA fazendo com que a proteína não se replique (CHOCT, 2004).

O efeito tóxico do ácido acético sobre micro-organismos não está relacionado somente à diminuição do pH, mas também à forma não dissociada deste que pode atravessar a membrana dos conídios e penetrar na célula microbiana e exercer o seu efeito tóxico no protoplasma celular (SHOLBERG et al., 2000). Vários trabalhos tiveram resultados positivos na utilização de ácido acético no controle de doenças na pós-colheita. Cia (2005) verificou que a concentração de 2,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ácido acético suprimiu totalmente a germinação de *C. gloeosporioides* *in vitro*. Sholberg e Gauge (1995) observaram que baixas concentrações deste ácido no ar são eficazes no controle de *B. cinerea*, sem causar efeito fitotóxico em maçãs. Shouberg, Cliff e Moyls (2001) observaram que o ácido acético controla a *P. expansum* em frutos de maçã sem causar danos aos frutos. Moyls et al. (1996) relataram que este ácido pode ser uma alternativa para estender a vida útil de uvas, pelo controle do *B. cinerea*. O uso na forma de vinagre

também é efetivo para reduzir a contaminação por *B. cinerea* em cerejas (SHOLBERG et al., 1998) e uvas (SHOLBERG; REYNOLDS; GAUNCE, 1996) e por *M. fructicola* em damasco e ameixas (LIU; CHU; ZHOU, 2002).

Luchese e Harrigan (1990) e El-Gazzar, Rusul e Marth (1987) verificaram que em meios de cultura contendo ácido láctico ocorreu a intensificação da produção de aflatoxina por *A. parasiticus*, sendo que o nível desta micotoxina foi dependente do pH do meio. Woolford (1975) relatou que o ácido láctico é um excelente inibidor do desenvolvimento de esporos bacterianos em pH 5,0. No entanto, não é efetivo contra leveduras e fungos.

Ghosh e Häggblom (1985) estudaram a ação do ácido propiônico e do ácido butírico sobre *A. flavus* e sobre a produção de aflatoxinae verificaram uma redução no crescimento deste fungo e paralização na produção da aflatoxina. Verificaram também que o ácido propiônico é mais eficiente no controle deste fungo quando comparado ao ácido butírico.

Tabela 4 - Germinação conidial de *B. cinerea*, *M. fructicola* e de *C. gloeosporioides* (%) incubados nas ASFAMs ou nos ácidos orgânicos.

Tratamento	Micro-organismo analisado (tempo de incubação)		
	<i>B. cinerea</i> (24 h)	<i>M. fructicola</i> (48 h)	<i>C. gloeosporioides</i> (24 h)
P1	0,0 ^c	5,0 ^d	0,0 ^d
P2	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^d
P3	0,0 ^c	2,0 ^d	0,0 ^d
Ác. láctico	86,7 ^a	74,5 ^b	74,5 ^b
Ác. acético	0,0 ^c	5,8 ^d	5,83 ^d
Ác. propiônico	16,5 ^b	25,5 ^c	25,5 ^c
Ác. butírico	0,0 ^c	1,3 ^d	0,0 ^d
Mix	0,0 ^c	2,2 ^d	0,0 ^d
Controle negativo	20,8 ^b	100,0 ^a	100,0 ^a
Controle positivo	0,0 ^c	0,0 ^d	0,0 ^{d*}

* Os valores comparam as médias dos diferentes produtores de amido de mandioca fermentado com as soluções elaboradas com os padrões dos ácidos orgânicos nas concentrações idênticas as maiores entre as ASFAMs, médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

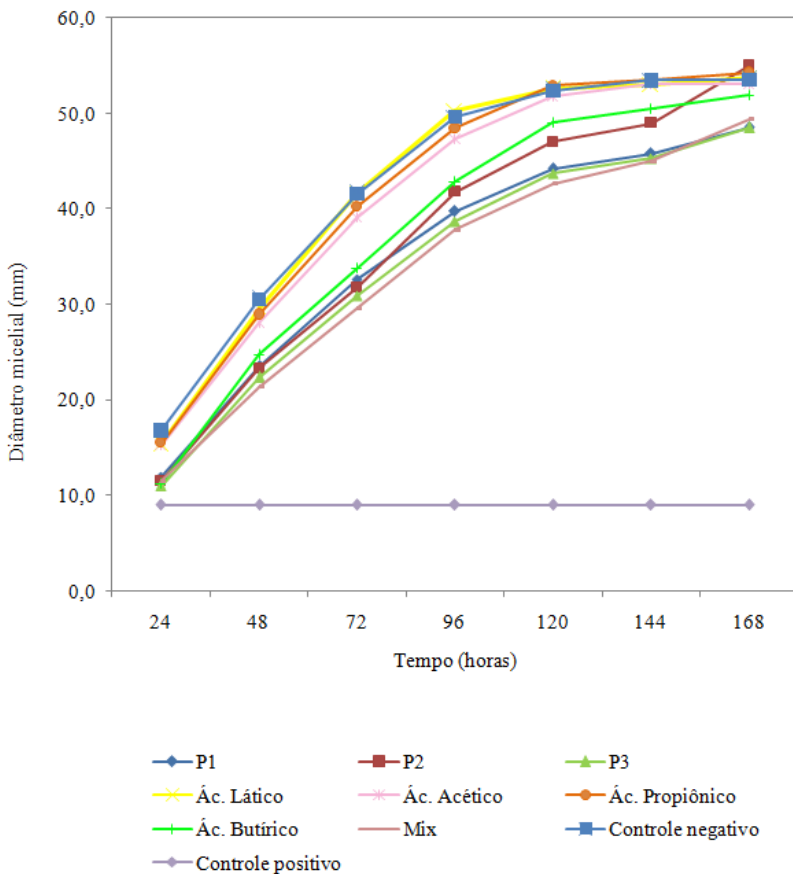
**P1: ASFAM de São João do Sul; P2: ASFAM de Ibirama; P3: ASFAM de Agrônômica; Controle negativo: água mineral; Controle positivo: estreptomina.

*** Soluções dos padrões dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico nas concentrações em mg L^{-1} : 365,46; 2046,73; 900,85 e 3272,29, respectivamente.

**** Mix: solução elaborada com os padrões de todos os ácidos, nas mesmas concentrações.

Figura 1 - Dados experimentais para o crescimento micelial de *B. cinerea* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.



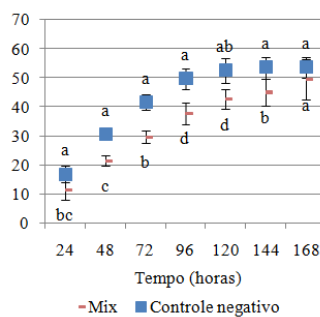
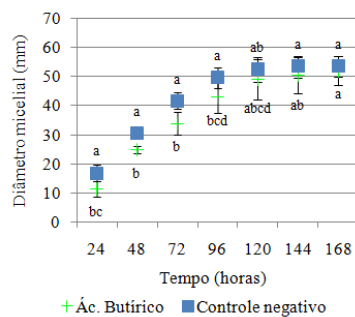
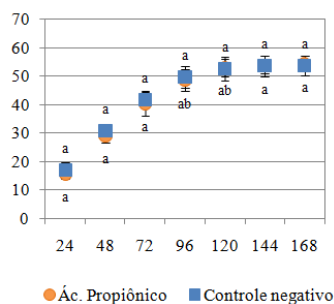
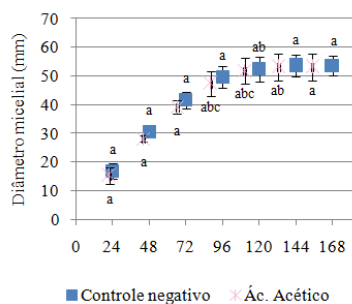
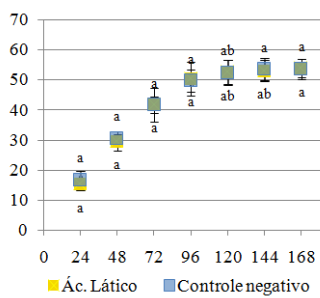
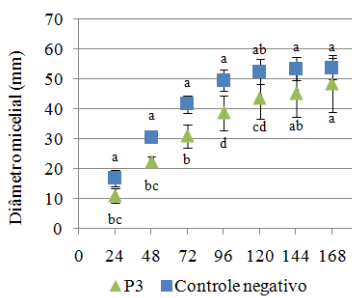
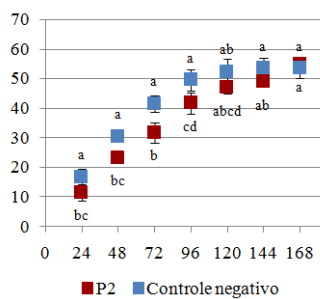
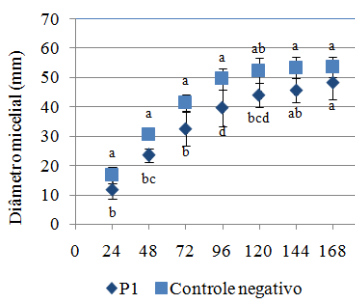
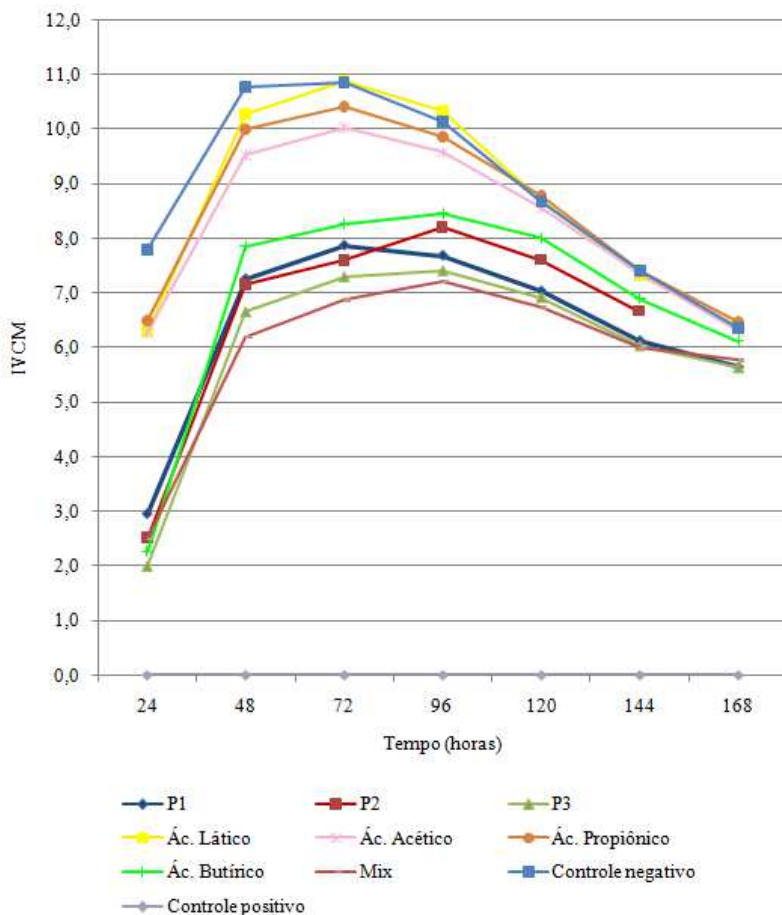


Figura 2 - Dados experimentais para o IVCM de *B. cinerea* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.



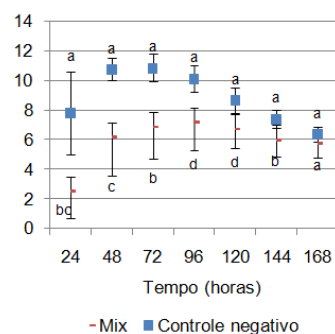
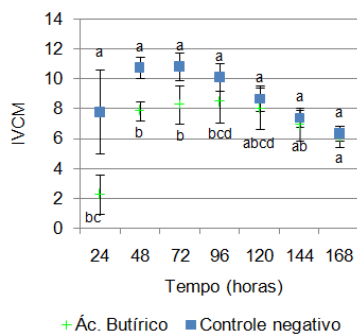
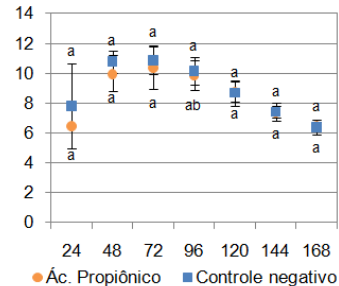
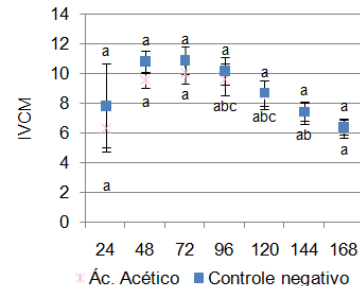
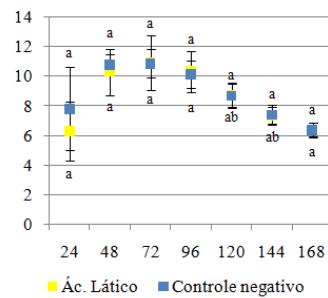
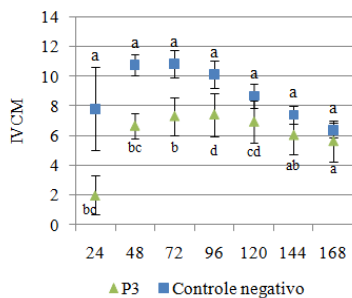
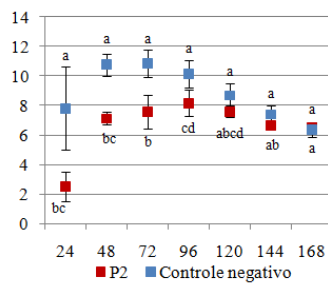
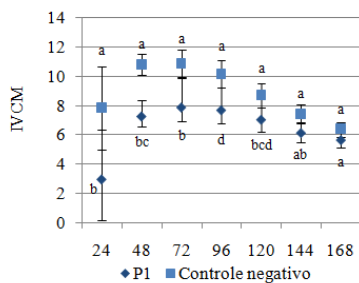
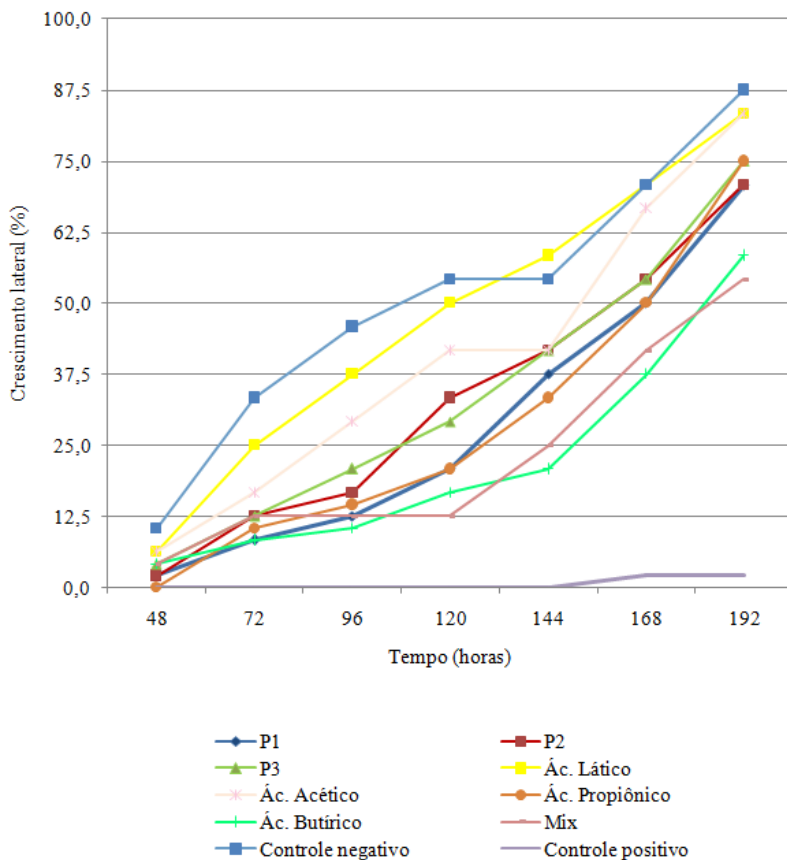


Figura 3 - Dados experimentais para o crescimento micelial lateral de *B. cinerea* sobre a área da placa com diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.



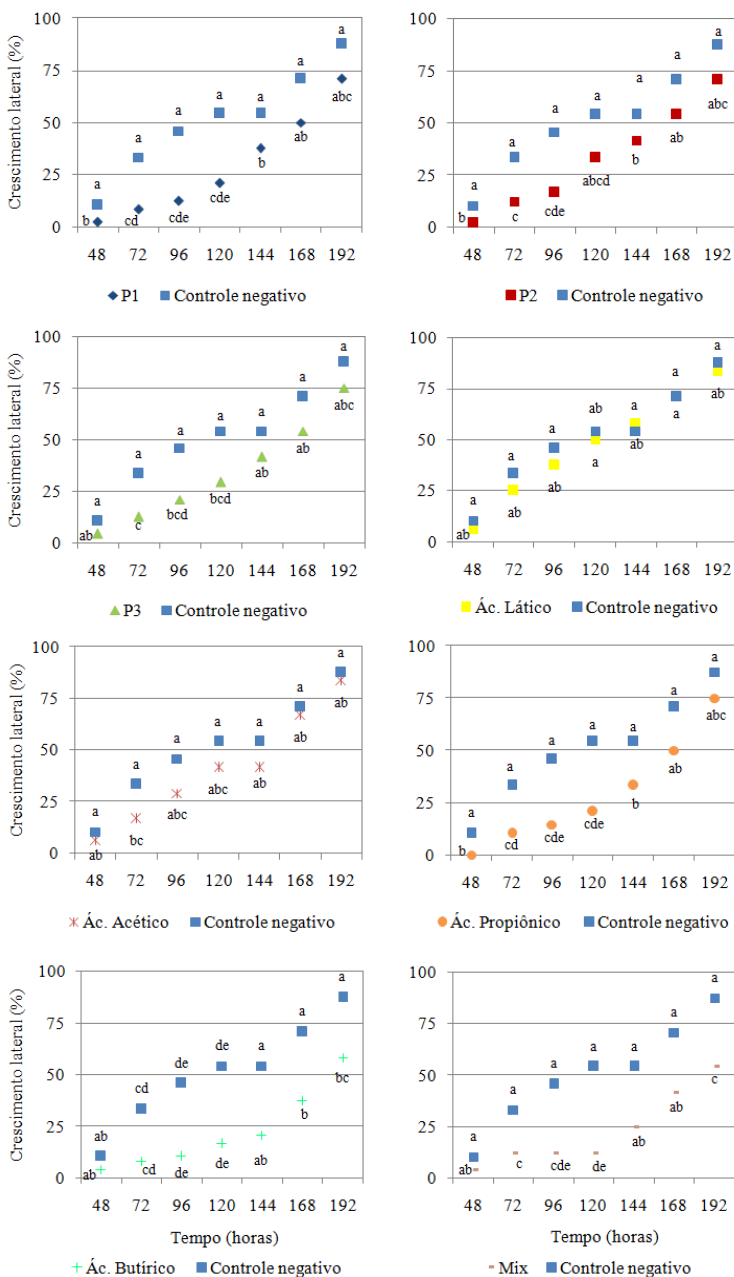
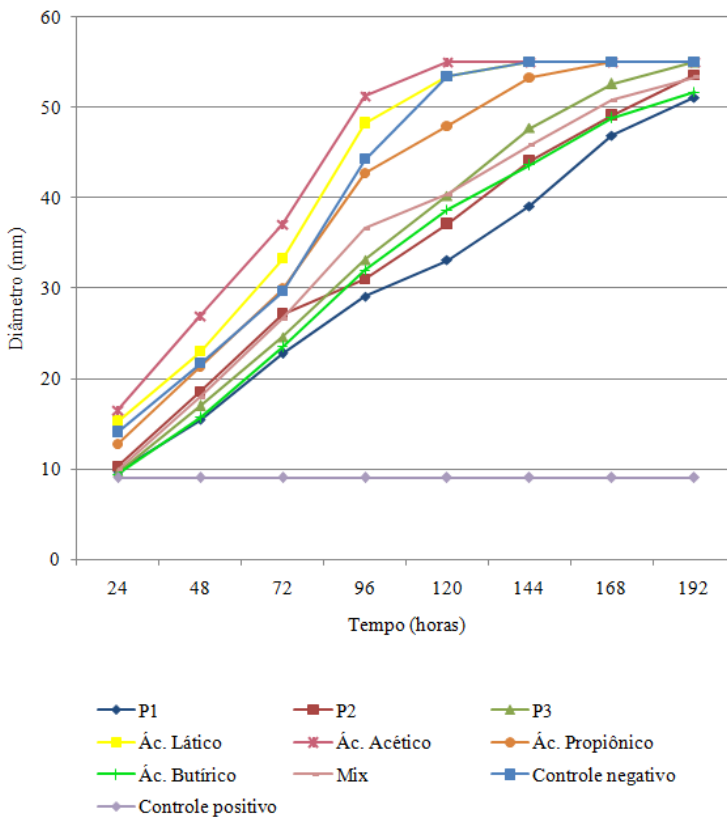
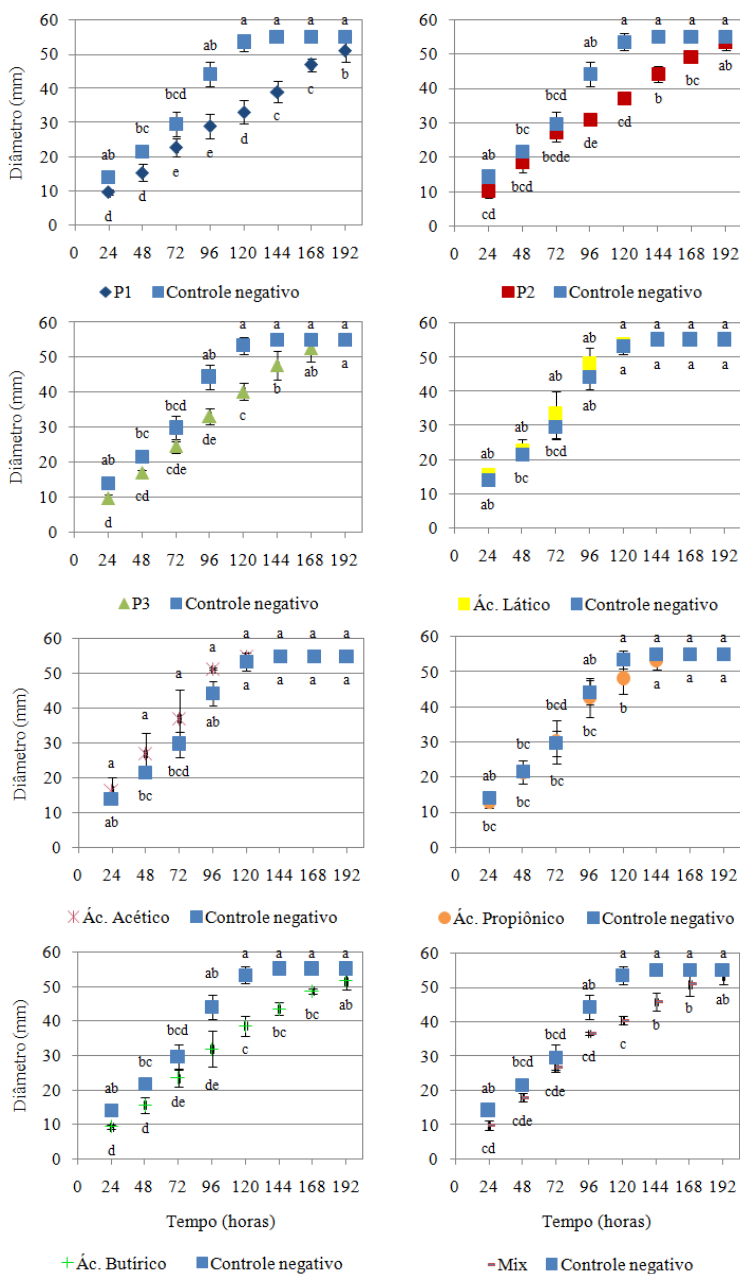


Figura 4 - Dados experimentais para o crescimento micelial de *M. fructicola* sobre a área da placa com diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.





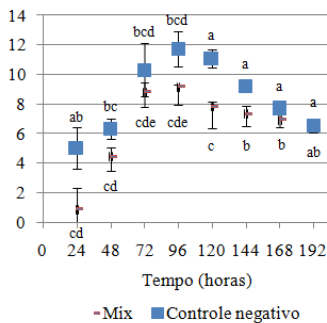
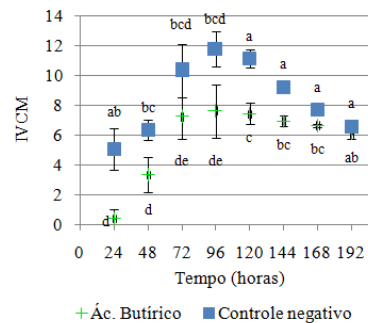
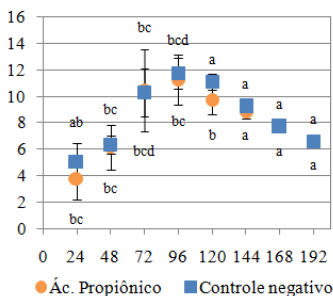
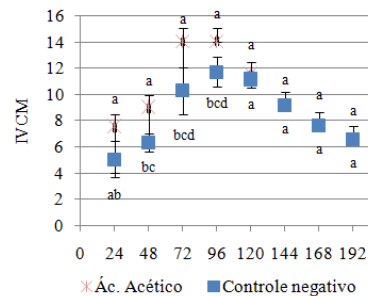
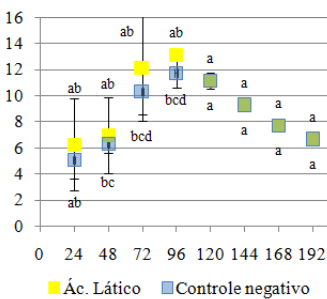
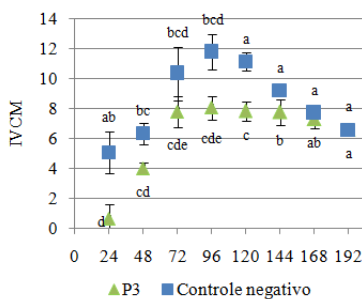
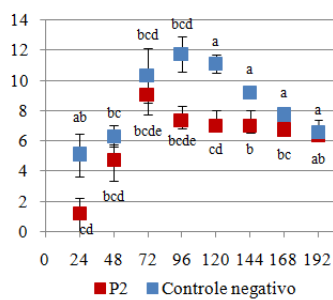
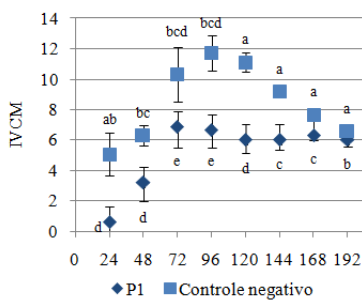
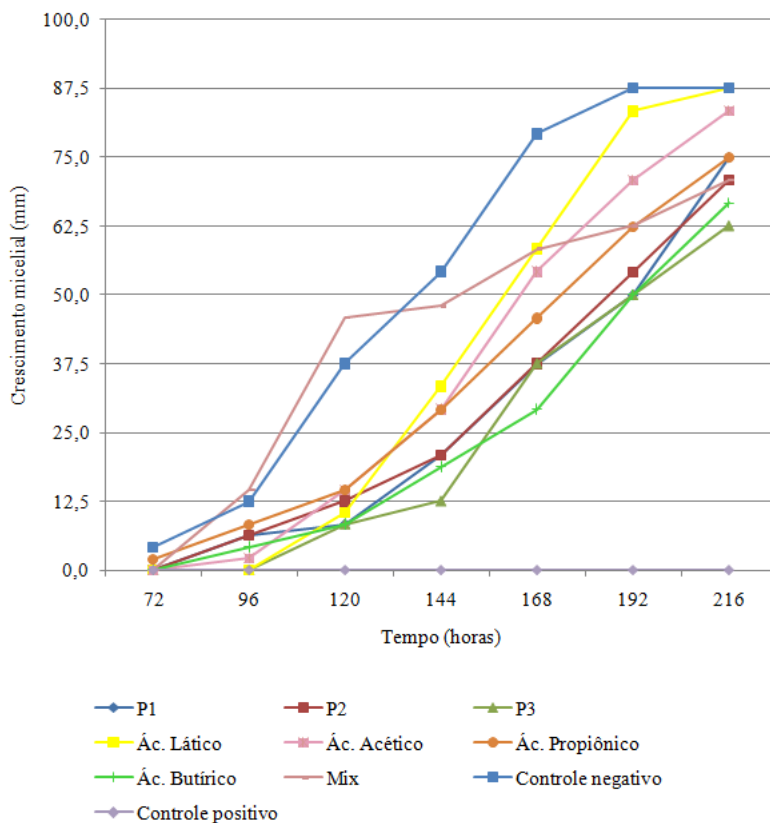


Figura 6 - Dados experimentais para o crescimento micelial lateral de *M. fructicola* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.



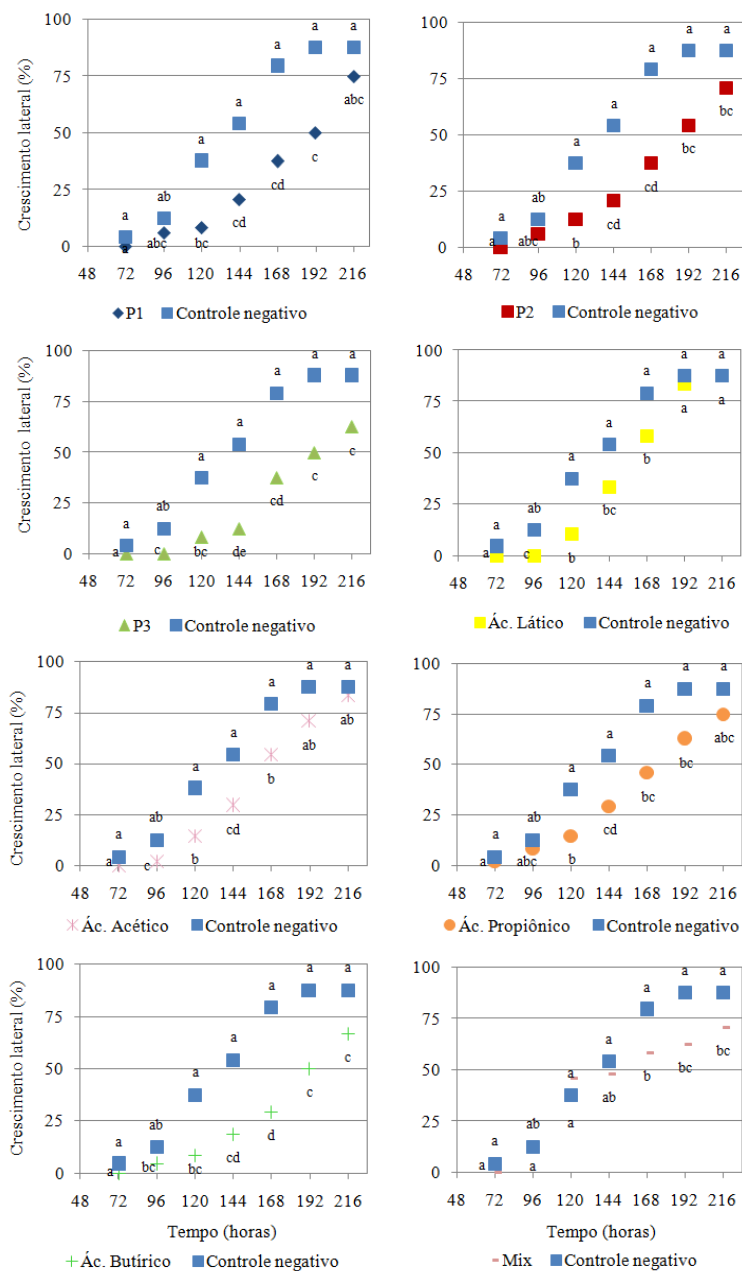
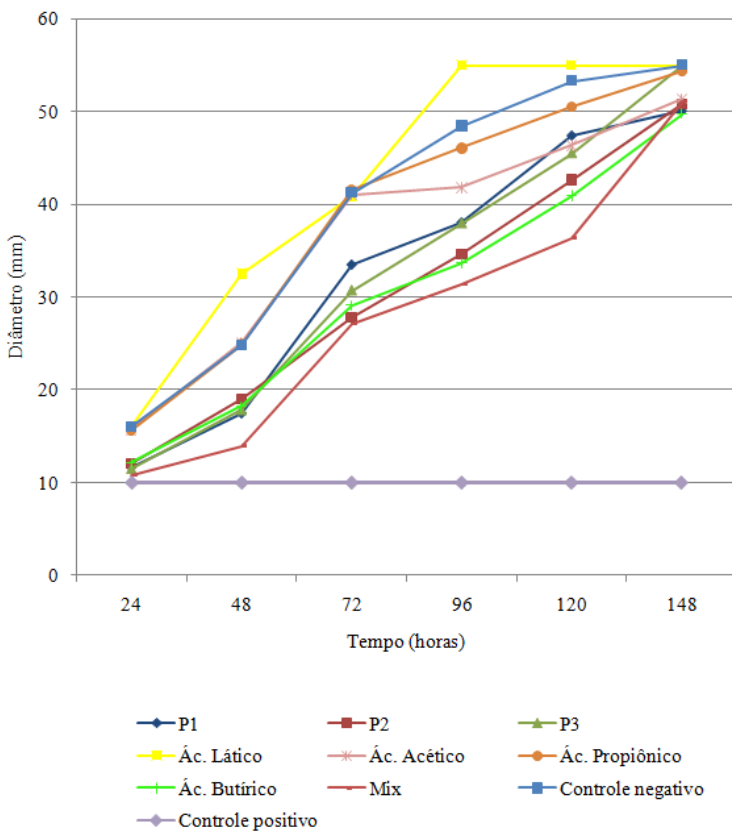
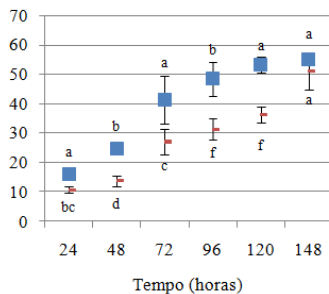
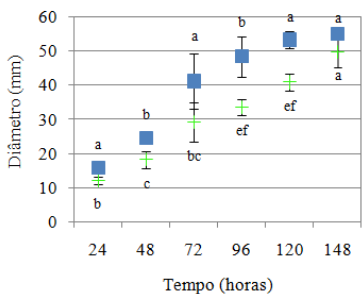
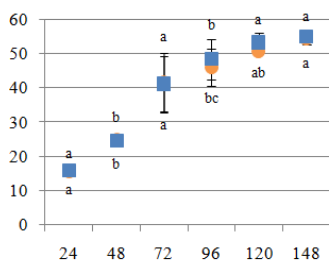
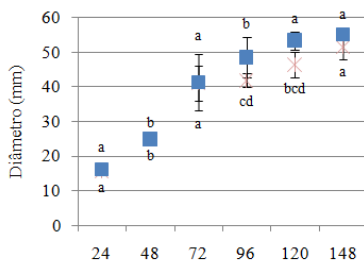
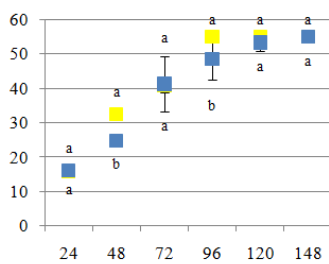
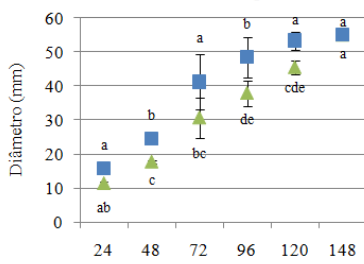
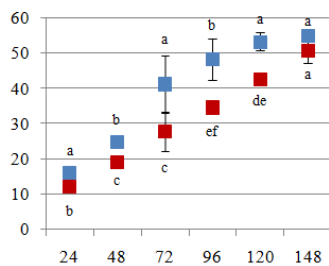
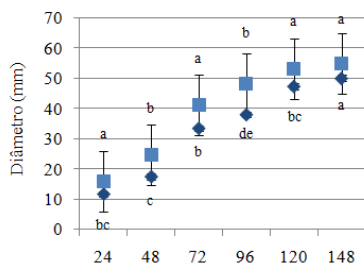


Figura 7 - Dados experimentais para o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* sobre a área da placa com diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.



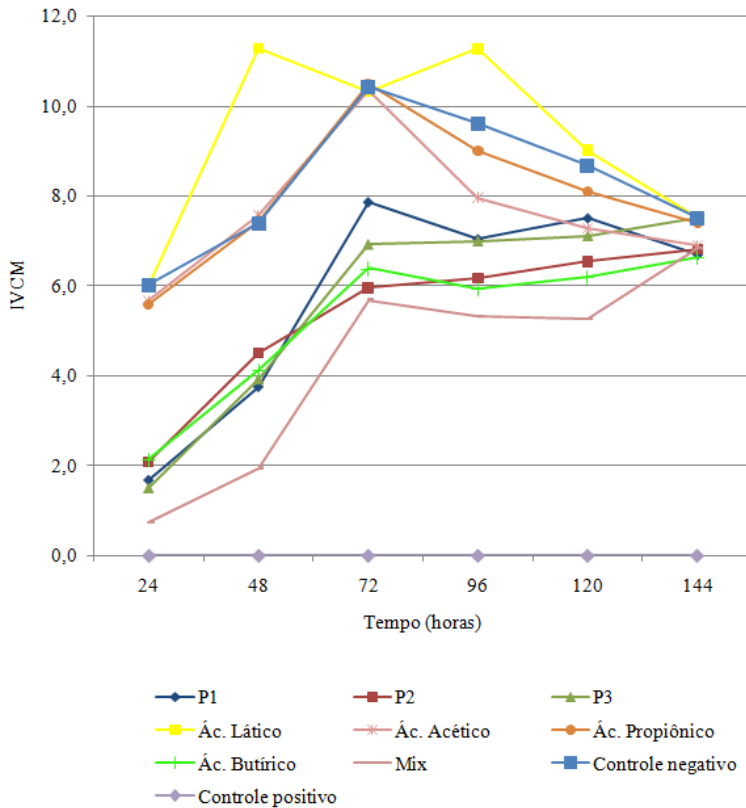


+ Ac. Butírico ■ Controle negativo

- Mix ■ Controle negativo

Figura 8 - Dados experimentais para o IVCM de *C. gloeosporioides* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.



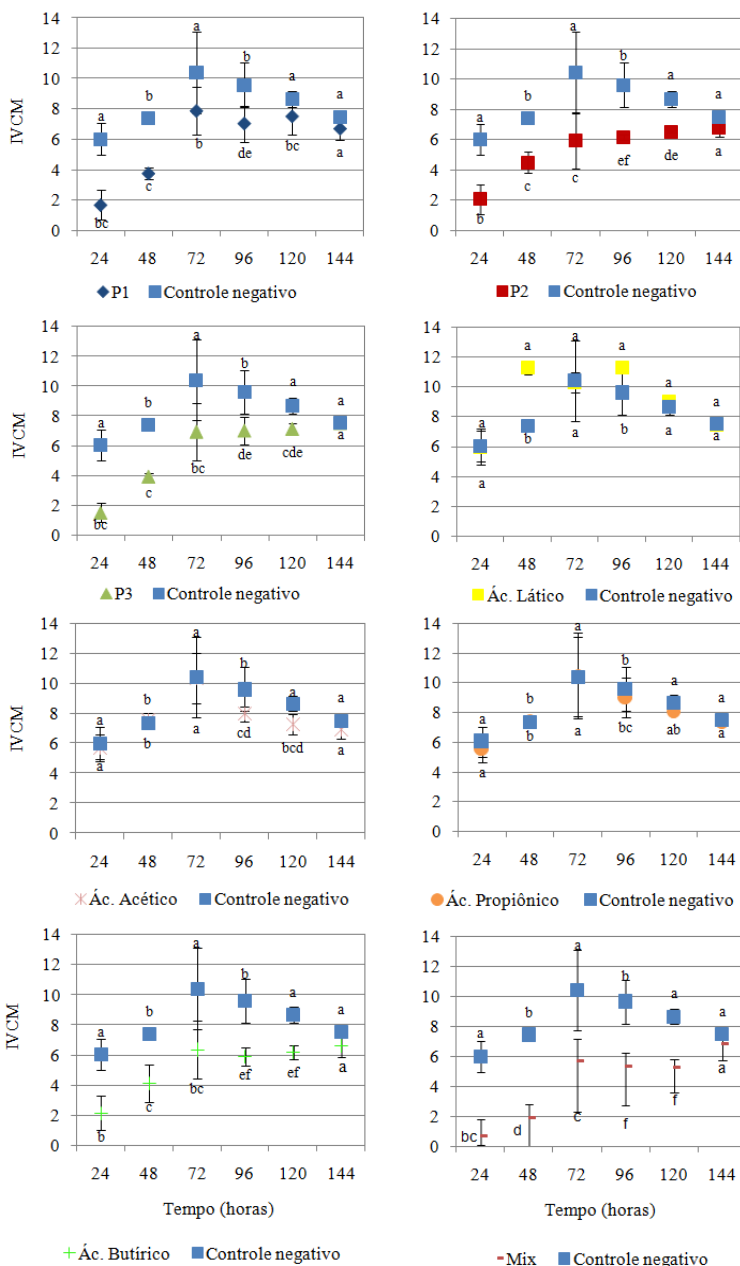
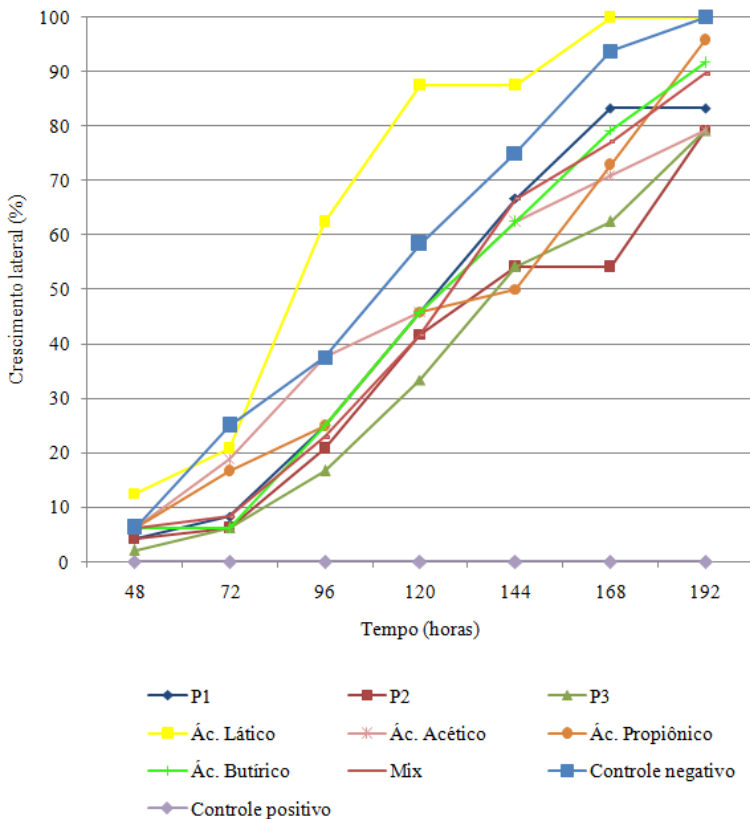
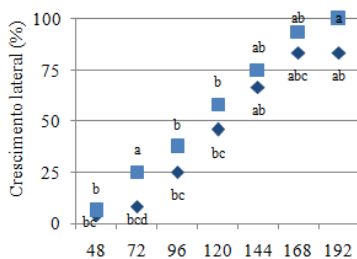


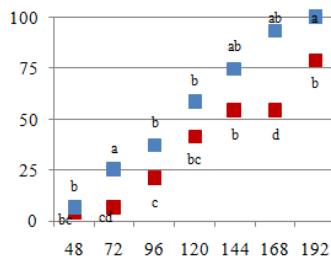
Figura 9 - Dados experimentais para o crescimento micelial lateral de *C. gloeosporioides* na presença de diferentes ASFAMs e ácidos orgânicos.

Os valores seguidos da mesma letra no mesmo tempo de avaliação não diferem significativamente, entre todos os tratamentos, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade de erro.

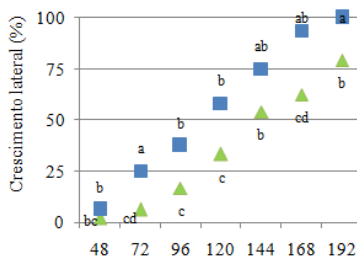




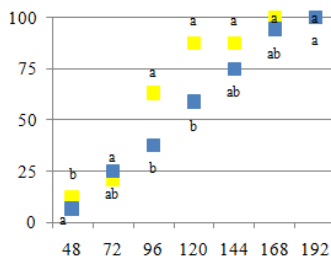
◆ P1 ■ Controle negativo



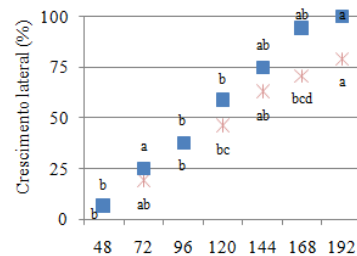
■ P2 ■ Controle negativo



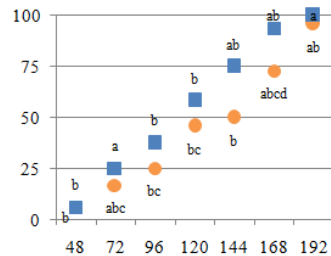
▲ P3 ■ Controle negativo



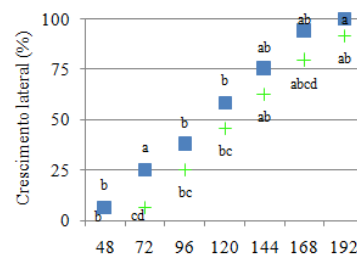
■ Ac. Lático ■ Controle negativo



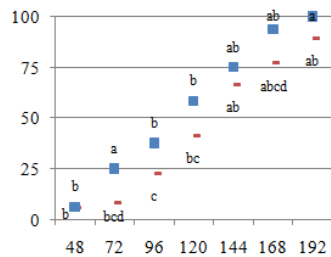
* Ac. Acético ■ Controle negativo



● Ac. Propiônico ■ Controle negativo



+ Ac. Butírico ■ Controle negativo



- Mix ■ Controle negativo

4 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos, neste estudo, confirmou-se a atividade antifúngica das águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca frente às três cepas estudadas: *Botrytis cinérea*, *Monilinia fructicola* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Pode-se atribuir esta propriedade, em parte a alguns ácidos orgânicos presentes neste material, levando em consideração que alguns tiveram uma evidente ação antimicrobiana. Em todas as análises realizadas com o ácido butírico, sobre os três fungos testados, houve efeito positivo significativo, o que pode ser atribuído a sua maior concentração nas amostras. O mix teve efeito sobre o crescimento micelial, sobre o IVCM e sobre o crescimento lateral do *B. cinerea* e do *C. gloeosporioides*. Todos os tratamentos, com exceção do ácido láctico, reduziram o crescimento lateral. Pelas diferenças estatísticas, concluiu-se que as ASFAMs têm uma ação inibitória mais ampla e eficaz, quando comparado aos ácidos testados isoladamente e que possivelmente este efeito está diretamente relacionado à concentração dos ácidos presentes, ou a um efeito sinérgico entre os ácidos ou, ainda, à existência de algum outro constituinte na ASFAM que potencializa esta ação, uma vez que tal composição não foi completamente caracterizada.

Os resultados encontrados neste estudo confirmam o potencial deste resíduo como um produto natural com propriedades antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

ADAMS, C.A. **Nutricines Food Components in Health and Nutrition**. Nottingham Univ. Press, Nottingham, p.128, 1999.

AQUINO, A.C. **Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação de amido de mandioca: ácidos orgânicos e suas relações com as propriedades do polvilho azedo**. 2015. 228 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

AQUINO, A.C.M.S.; AZEVEDO, M.S.; RIBEIRO, D.H.B.; COSTA, A.C.O.; AMANTE, E.R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, v.172, p.725-730, 2015.

ARAÚJO L.; BORSATO, L.C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; STADNIK, M.J. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p.74-80, 2008.

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.

AVANCINI, S. R. P. **Caracterização físico-química, microbiológica e toxicológica das águas de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo**. 2007. 104 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

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.

CARVALHO, E.P.; CANHOS, V.P.; VILELA, E.R. Determinação da microbiota do polvilho azedo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n. 3, p.239-245, 1995.

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**, v.3, n.2, p.21-30. 1985.

CIA, P. **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005, 187f.

CHOCT, M. Effects of Organic acids, prebiotics and enzymes on control of necrotic enteritis and performance of broiler chickens. University of New England Armidale, NSW, 2004.

DEMIATE, I.M., BARANA, A.C., CEREDA, M.P., WOSIACKI, G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.131-135, 1999.

DOORES, S. Organic acids. In: DAVIDSON, P.M.; SOFOS, J.N.; BRANEN, A.L. (Eds.) **Antimicrobials in Food**. 3^a ed. Food Science and Technology, p.91-142, 2005.

EL-GAZZAR, F.E.; RUSUL, G.; MARTH, E.H. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different initial pH values. **Journal of Food Prot????**, v.50, n.11, p.909-940, 1987.

GHOSH, J.; HÄGGBLUM, P. Effect of sublethal concentrations of propionic and butyric acid on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Journal Food Microbiology**, v.2, p.323-327, 1985.

LACERDA, I.C.A.; MIRANDA, R.L.; BORELLI, B.M.; NUNES, A.C.; NARDI, R.M.D.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A.. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v.105, n.2, p.213-215, 2005.

LIU, W.T.; CHU, C.L.; ZHOU, T. Thymol and acetic acid vapors reduce postharvest brown rot of apricots and plums. **Hort Science**, v.37, n.1, p.151-156, 2002.

LUCHESE, R.H.; HARRIGAN, W.F. Growth of, and aflatoxin production by, *Aspergillus parasiticus* when in the presence of either *Lactococcus lactis* or lactic acid and at different initial pH values. **Journal of Applied Bacteriology**, v.69, p.512-519, 1990.

MARCON, M. J. A. **Proposta para o mecanismo de expansão do polvilho azedo com base nas características físico químicas**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009, 187f.

MARCON, M. J.A.; VIEIRA, G.C.N.; DE SIMAS, K.N.; SANTOS, K.; VIEIRA, M.A.; AMBONI, R.D.M.C.; AMANTE, E.R. Effect of the improved fermentation on physicochemical properties and sensorial acceptability of sour cassava starch. **Brazilian Archives of Biology and Biotechnology**, v.50, n.6, p.1079-1087, 2007

MARCON, M.J.A.; VIEIRA, M.A.; SANTOS, K.; SIMAS, K.N., AMBONI, R.D.M.C.; AMANTE, E.R. The effect of fermentation on cassava starch microstructure, **Journal of Food Process Engineering**,v.29; p.362-372, 2006.

MESTRES, C.; ROUAU, X. Influence of natural fermentation and drying conditions on the physicochemical characteristics of cassava starch. **Journal of Science and Food Agriculture**,v.74, p.147-155, 1997.

MOYLS, A.L.; SHOLBERG, P.L.; GAUNCE, A.P. Modified - atmosphere packaging of grapes and strawberries fumigated with acetic acid. **Hort Science**, v.31, p.414-416, 1996.

PLATA-OVIEDO, M.; CAMARGO, C. R. O. Determinação de propriedades físicoquímicas e funcionais de duas féculas fermentadas de mandioca (polvilho azedo). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.15, n.1, p.59-65, 1995.

SHOLBERG, P.L., Fumigation of fruit with short chain organic acids to reduce the potential of post harvest decay. **Plant disease**, v.82, p.689-693, 1998.

SHOLBERG, P.L., REYNOLDS, A.G., GAUNCE, A.P. Fumigation of table grapes with acetic acid to prevent post harvest decay. **Plant disease**, v.80, p.1425-1428, 1996.

SHOLBERG, P.L.; CLIFF, M.; MOYLS, A.L. Fumigation with acetic acid vapor to control decay of stored apples. **Fruits**, v.56, p.355-366, 2001.

SHOLBERG, P.L.; GAUNCE, A.P. Fumigation of fruit with acetic acid to prevent post harvest decay. **Hort Science**, v.30, p.1271-1275, 1995.

SHOLBERG, P.L.; HAAG, P.; HOCKING, R.; BEDFORD, K. The use of vinegar vapor to reduce post harvest decay of harvested fruit. **Hort Science**, v.35, p.898-903, 2000.

WOOLFOR, K.M. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.26, p. 229-237, 1975.

ZOTOU, A.; LOUKOU, Z.; KARAVA, O. Method development for the determination of seven organic acids in wines by reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v.60, n.1/2, p.39-44, 2004.

CAPÍTULO 4

CHARACTERISTICS OF CASSAVA STARCH FERMENTATION WASTEWATER BASED ON STRUCTURAL DEGRADATION OF STARCH GRANULES

Capítulo publicado em forma de artigo:

Pereira, J.M.^I; Aquino, A.C.M.S.^I; Oliveira D.C.^{II}; Rocha, G. ^I, Francisco, A.^I; Barreto P.L.M.^I; Amante, E.R.^I. Characteristics of cassava starch fermentation wastewater based on structural degradation of starch granules. **Ciência Rural**, v.46, p.732-738, 2016.

Characteristics of cassava starch fermentation wastewater based on structural degradation of starch granules

Abstract

Sour cassava starch is a naturally modified starch produced by fermentation and sun drying, achieving the property of expansion upon baking. Sour cassava starch' bakery products can be prepared without the addition of yeast and it is gluten free. The fermentation process associated with this product has been well studied, but the wastewater, with high acidity and richness in other organic compounds derived from starch degradation, requires further investigation. In this study, the structure of solids present in this residue was studied, seeking to future applications for new materials. The solids of the wastewater were spray dried with maltodextrin (MD) with dextrose equivalent (DE) of 5 and 15 and the structure of the powder was evaluated by scanning electron microscopy. A regular structure with a network arrangement was observed for the dried material with MD of 5 DE, in contrast to the original and fermented starches structure, which suggests a regular organization of this new material, to be studied in future applications.

Key words: Sour cassava starch. Fermentation. Water. Microstructure.

Características das águas residuais da fermentação do amido de mandioca com base na degradação estrutural dos grânulos de amido

Resumo

O polvilho azedo é um amido naturalmente modificado, produzido por fermentação e seco ao sol, atingindo a propriedade de expansão. Produtos de panificação a partir do polvilho azedo podem ser preparados sem a adição de leveduras e são livres de glúten. O processo fermentativo tem sido exaustivamente estudado, mas as águas residuais com elevada acidez e ricas em compostos orgânicos derivados da degradação do amido, requerem futuros trabalhos. Neste estudo, a estrutura dos sólidos presentes nesse efluente foi estudada vislumbrando futuras aplicações para estes novos materiais. Os sólidos contidos na água residual foram secos em spray dryer com maltodextrina (MD), com equivalente de dextrose (DE) de 5 e 15. A estrutura das partículas foi observada por microscopia eletrônica de varredura. Uma estrutura regular com arranjo em rede foi observada para o material seco com MD DE 5, em características que diferem das estruturas do amido nativo e do amido fermentado, o que sugere uma nova e regular organização estrutural com futuras aplicações a serem determinadas.

Palavras-chave: Amido de mandioca. Fermentação. Águas. Microestrutura.

1 INTRODUCTION

Studies about the chemical composition of residues could be a good way to change the preconception about how they can offer opportunities for the creation of a new raw material. Food industry produces a big quantity of wastewaters some of which have not been studied yet. Sour cassava starch' wastewater can be a good example of this.

Sour cassava starch (*polvilho azedo*) is a well-known product in Brazil and in other Latin America countries including Argentina, Colombia and Ecuador. In comparison to native cassava starch it presents significant differences in pH, acidity, viscosity, density and other physicochemical properties. An exceptional and the most important property of this product is its expansion. MARCON et al. (2009) proposed a chemical explanation for the expansion of sour cassava starch, i.e., that results from polysaccharide degradation, generation of acids, dextrin and oxidized products during the fermentative process and sun drying.

The sour cassava starch production begins with the extraction of starch, which consists of cleaning, peeling, chopping, pressing and straining the cassava roots. Fibber is firstly separated from the starchy water and then the starch is separated from the water by decantation or centrifugation according to the plant scale. Cassava starch is then dried or submitted to natural fermentation to produce sour cassava starch. This fermentation process is carried out empirically, based only on the practical knowledge of the producer. It is a submerged fermentation process, with a superficial layer of 20 cm of water and involves very long time periods. The fermentative process starts with the production of sugar by microorganisms that hydrolyze the starch, a step which can be accelerated by the addition of glucose (MARCON et al., 2006).

The microorganisms typically associated with cassava starch fermentation are mainly lactic acid bacteria with a predominance of the genus *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* and *L. manihotvorans*), followed by *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* and *Lactococcus* (MORLON-GUYOT et al., 1998). These microorganisms are known to be responsible for the production of organic acids and aromatic compounds. *Lactobacillus plantarum* is known to produce antimicrobial substances (plantaricin) that are active against certain pathogens and a variety of strains are marketed as probiotics (De VRIES et al., 2006).

Currently, the wastewater from the fermentation process is discarded and it is considered an effluent with high chemical and biochemical oxygen demand (COD and BOD, respectively). However, this residue presents an interesting composition for potential use in new products, such as probiotic beverages, or in other applications.

During the cassava starch fermentative process, the starch granules are submerged in the fermentation tanks, as shown in Figure 1. These tanks are around 10 to 20m³ and starch represents the bulk of the mass: for each ton of sour cassava starch, around 120L of wastewater are obtained. Wastewater from this process has been studied by AVANCINI et al. (2007) and new studies are underway to identify the compounds present as soluble and suspended solids in this fermentation water (AVANCINI et al., 2007).

Figura 1 - Cassava starch fermentation tank.



It can be assumed that this wastewater is comprised of acids, such as acetic, butyric, propionic, butyric and lactic acids, and the products of amylose and amylopectin degradation, such as dextrin, oligosaccharides and monosaccharides (data non published).

MARCON et al. (2006) and several other researchers (ASCHERI & VILELA, 1995; PLATA-OVIEDO & CAMARGO, 1995; MESTRES & ROUAU, 1997; DEMIATE et al., 2000; MESTRES et al., 2000) investigated the effect of fermentation on the cassava starch granule during processing and showed that the cassava starch granule presented perforations as a consequence of the microbiological degradation of this polysaccharide.

Studies on the structure of the solids present in the wastewater of the cassava starch fermentation process appear to be lacking in the literature. Scanning electronic microscopy can provide an insight into the effects of this fermentation processing on the microstructure of the remaining starch granules. The aim of this study was to assess the chemical composition of the soluble and suspended solids present in sour cassava starch' processing wastewater, based on changes in the cassava starch granule structure.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

Cassava starch fermentation wastewater was collected from three producer regions in the state of Santa Catarina, Brazil (São João do Sul – P1, Ibirama – P2 and Agronômica – P3). Due to the low total solids content was adjusted with maltodextrin DE (Dextrose Equivalent) 5 and 15 (Lorenz Co., Quatro Pontes, Paraná, Brazil) in a proportion of 100% of the total solids present in the wastewater samples (proportionally to the total solids of the wastewater, 1:1, solid/solid).

The solutions were atomized in a Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI) using the following parameters: inlet temperature 130°C, with a gas flow rate of 35m³ h⁻¹ and a feed flow of 10mL min⁻¹. Dried material was packed in a polyethylene bag as primary package and a rigid plastic (PVC) container as secondary package, providing a total barrier to moisture, and stored at ambient temperature until analysis. A commercial sample of native cassava starch was also compared to the spray dried materials for electron microscopy.

2.2 Methods

2.2.1 Scanning electron microscopy

The material produced from the drying of the cassava starch fermentation wastewater, the native starch and the maltodextrins used, were analyzed by scanning electron microscopy. The dried samples were fixed on an aluminium stubs with double-sticky carbon tape, coated with gold (350 Å thick) using a sputtering system, model D2 Diode (International Scientific Instruments) and subjected to SEM analysis on a Jeol JSM-6390LV microscope.

2.2.2 Physicochemical properties

The pH of the fermentation water was determined using a Quimis pH meter, model Q 400 A (Diadema, São Paulo, Brazil) and titratable acidity was determined with 0.1 mol L⁻¹ NaOH solution. Total solids content was determined by drying 10 mL of the water in a forced-air oven until constant weight. All analyses were carried out in triplicate.

2.3 Statistical analysis

The results for the pH, acidity and total solids content of the cassava starch fermentation wastewater were expressed as average and standard deviation. Differences between averages were compared by applying the Tukey test at 5% of significance.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Cassava starch granules generally have similar characteristics, but they can present some differences according to the harvesting conditions and time of harvesting, resulting in several granule sizes which can lead to different enzymatic susceptibility during fermentation. Small, medium and large granules can be hydrolyzed differently, which can also result in different characteristics in the soluble and suspended solids in the fermentation water. Additionally, because of artisanal production of most

industries of sour cassava starch, fermentation, conditions such as temperature, microorganisms and others were not controlled.

Table 1 shows the pH, total solids and titratable acidity of the fermentation wastewater obtained from three different producer regions in Santa Catarina, Brazil. In addition to the above differences between samples, the type of microorganisms was also specific to the different regions of production, and this can contribute to large variations in some parameters, particularly the titratable acidity, which is related to the specific pKa values of several organic acids generated during the cassava starch fermentation.

The average of the titratable acidity was 11.40 mL NaOH 0.1N 10 mL⁻¹ of the wastewater. According to DEMIATE et al. (2000), propionic, butyric, acetic and lactic acids are present in sour cassava starch. Each tank produces around 120 L of this effluent, which means the possibility of producing 480 g of organic acids per fermentation tank. Considering that this production is a residual material of the cassava starch fermentation, besides the characterization of the structures, the composition and valorization of this new material should be studied for future application where the property of these acids are required. The total solids in the cassava starch fermentation wastewater are probably comprised of hydrolyzed amylose and amylopectin molecules, besides organic acids and residual microorganism cells. AQUINO et al. (2015), showed that sour cassava starch wastewater can be an important source of organic acids.

Tabela 1 - The acidity, pH and total solids of the cassava starch fermentation wastewater obtained from three producer regions in Santa Catarina State.

Sample	pH	Titratable acidity (mL of 0.1 mol L ⁻¹ NaOH 10 mL ⁻¹)	Total solids (g 100 mL ⁻¹)
P1	3.40±0.00 ^c	15.02±0.00 ^a	0.17±0.01 ^a
P2	3.50±0.01 ^b	9.50±0.06 ^b	0.15±0.00 ^b
P3	3.61±0.01 ^a	9.69±0.05 ^b	0.17±0.01 ^b

* Lowercase letters compare averages, in the same column.

For different letters values differ significantly (P<0.05) according to the Tukey's test.

P1 – São João do Sul; P2 – Ibirama; P3 – Agronômica.

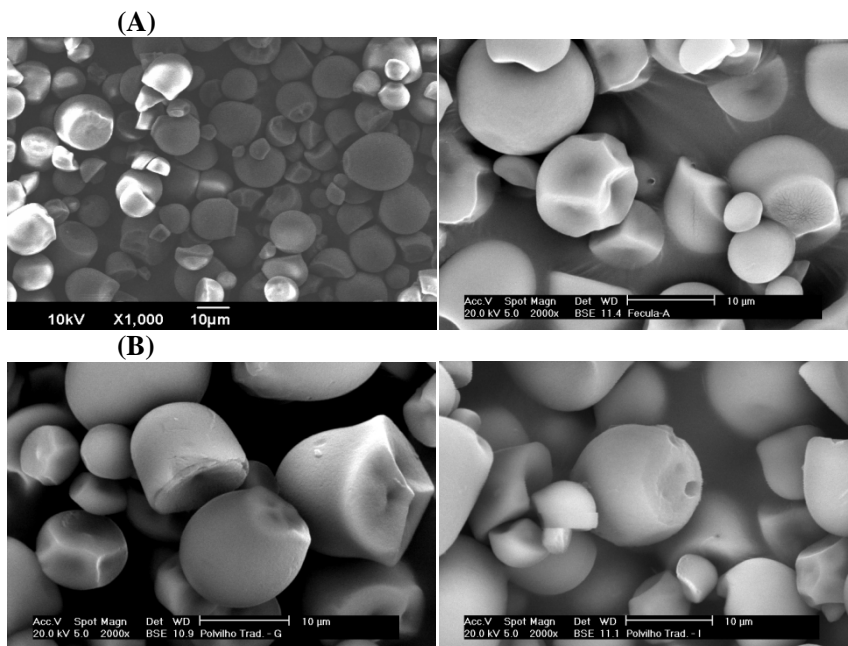
In this study, the fermentation water was dried in a spray drier, with maltodextrin, of different grades of DE (5 and 15), added to decrease the energy consumption, minimize the effect of the acid on the spray drier

structure and as well as to increase the yield of the dried product and its storage time for future use.

The microstructure of spray dried native cassava starch granules, fermentation damaged granules and total solids in the fermentation wastewater can be observed in figures 2 and 4. Figure 4, refers to the wastewater plus maltodextrin (DE 5 and 15), The effect of two kinds of maltodextrins on the structure of sour cassava wastewater P1, P2 and P3 from three different industries showed differences between maltodextrin according to their origin. A more regular structure, with a network covering the maltodextrin particles was observed in the dried samples with maltodextrin DE 5, which probably could result in a more stable particle upon storage.

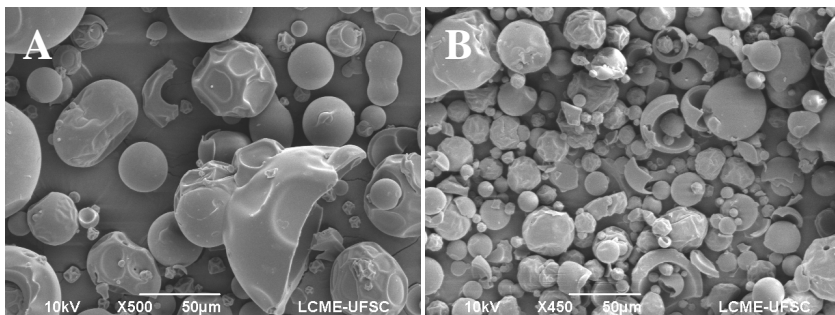
Cassava starch granules were homogeneous and did not present any holes in their native form (Figure 2A). Conversely, fermented cassava starch granules (Figure 2B), showed perforations produced by enzymes that use the starch as a substrate for sugar production, particularly during the first step of the process. The soluble and insoluble solids content of the fermentation wastewater showed fermentative degradation of the granules, as well as some material resulting from microorganisms growth during the processing.

Figura 2 - Scanning electron micrography of a native cassava starch granule (A): I - 1000X e II - 2000X and sour cassava starch granule (B): I and II - 2000X.



The maltodextrin, used as a material to improve the total solids content for the spray drying process (Figure 3), presented broken structures, but of a different nature compared to the native and sour cassava starch granules. Thus, the structures presented in figure 4, although being the residual solids from the cassava starch fermentation, showed different structural characteristics from the native starch, sour cassava starch and pure maltodextrin (used as a support during the drying process).

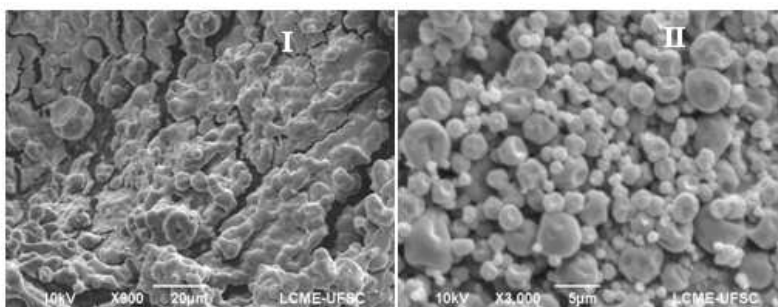
Figure 3 - Scanning electron micrography of maltodextrin DE5 - 500X (A) e DE15 - 450X (B).



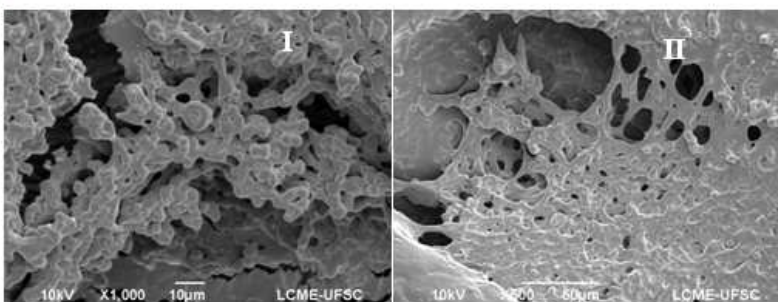
MARCON et al. (2009) showed that the sour cassava starch expansion property was due to the compounds of a molecular mass smaller than amylose and amylopectin, that formed an arrangement that supported water and gases retention during baking. However, cassava starch fermentation wastewater, beside lactic, propionic, butyric and acetic acids, most likely contains oligomeric and polymeric compounds. This merits further study since these compounds could be of value in the development of new materials from an industrial effluent, changing what is considered as polluting charge in a probable new raw material.

Figura 4 - Scanning electron micrography of maltodextrin and solids of the fermentation wastewater of P1 - São João do Sul (A): I - DE5 (900X) e II - DE15 (3000X), maltodextrin and solids of the fermentation wastewater of P2 - Ibirama (B): I - DE5 (1000X) e II - DE15 (500X) and maltodextrin and solids of the fermentation wastewater of P3 - Agronômica (C): I - DE5 (1000X) e II - DE15 (400X). Samples were dried in spray dryer using maltodextrin as support.

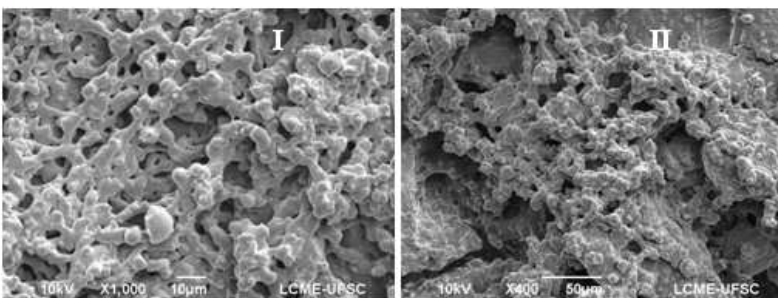
(A)



(B)



(C)



4 CONCLUSION

From green chemistry's stand point, the knowledge of residues composition, can contribute to future applications and reduction of pollution charge. This is probably the first research showing the microscopic characteristics of the cassava starch fermentation solids wastewater. The structure of the solids presented in cassava starch fermentation wastewater dried by spray drying with maltodextrin DE 5 and 15 showed a regular network arrangement.

The microstructural arrangement of this material is different of the native and fermented cassava starch as well from the pure maltodextrin, and thus structurally characteristic of this new material produced from wastewater of the cassava starch fermentation process.

In the same manner that the sour cassava starch has special properties, the effluent of the cassava starch fermentation process can be consider for future researches as a new potential material such as active biofilms, as example of possible application.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian governmental agencies CNPq for financial support and CAPES for scholarships. We would also like to acknowledge the Central Laboratory of Microscopy of the Federal University of Santa Catarina for their support.

REFERENCES

AQUINO, A.C.M.S. et al. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. **Food Chemistry**, v.172, p.725-730, 2015 Available from: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.142>>. Accessed: oct. 26, 2015. doi 10.1016/j.f.oodchem.2014.09.142.

ASCHERI, D.P.R.; VILELA, E.R. Cassava starch appraisal during fermentation and biscuit making processes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.269-279,1995.

AVANCINI, S.R.P. et al. Cassava starch fermentation wastewater: characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.2273-2278, 2007.

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

DE VRIES, M.C. et al. *Lactobacillus plantarum* - survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract.**International Dairy Journal**, v.16, p.1018-1028, 2006.

MARCON, M.J.A. Expansion properties of sour cassava starch (*polvilho azedo*): variables related to its practical application in bakery. **Starch/Starke**, v.61, p.716-726, 2009.

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

MESTRES, C. et al. Comparison of the expansion ability offermented maize flour and cassava starchduring baking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.665-672, 2000.

MESTRES, C.; ROUAU, X. Influence of natural fermentation and drying conditions on physicochemical characteristics of cassava starch. **Journal of the Science of Food and Agriculture**,v. 74, p.147-155, 1997.

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

PLATA-OVIEDO, M.; CAMARGO, C.R.O. Determinação de propriedades físico-químicas e funcionais de duas féculas fermentadas de mandioca (polvilho azedo). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**,v.15, p.59-65, 1995.

CAPÍTULO 5

**OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E
POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE MICROPARTÍCULAS
ORIUNDAS DA ÁGUA DE FERMENTAÇÃO DA PRODUÇÃO DO
POLVILHO AZEDO ATOMIZADAS EM SPRAY DRYER,
UTILIZANDO-SE MALTODEXTRINA COMO CARGA**

Obtenção, caracterização morfológica e potencial antifúngico de micropartículas oriundas da água de fermentação da produção do polvilho azedo atomizadas em *spray dryer*, utilizando-se maltodextrina como carga

Resumo

As propriedades funcionais evidenciadas no amido de mandioca fermentado, conhecido como polvilho azedo, produzidas durante a etapa de fermentação deste são muito estudadas, no entanto não há relatos na literatura de estudos que demonstrem as propriedades dos sólidos presentes nas águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca (ASFAM), assim como não há estudos com métodos de concentração e preservação destes. Neste trabalho, foi realizada a desidratação de três ASFAMs em *spray dryer*, utilizando maltodextrina de diferentes DEs (5, 15 e 21) como carga. A partir da obtenção das micropartículas foram avaliadas as características morfológicas, através do MEV, e antimicrobianas, através de testes de crescimento micelial e de germinação conidial do fungo *C. gloeosporioides*. Através dos resultados pode-se observar que as micropartículas apresentaram diferenças morfológicas de acordo com a origem da ASFAM e com o DE da maltodextrina utilizada, com uma tendência à formação de uma rede envolvendo as maltodextrinas e, também, a uma aglomeração. As ASFAMs antes do processamento térmico apresentaram atividade antimicrobiana e, após o tratamento térmico para a obtenção das micropartículas a atividade antimicrobiana diminuiu, porém as micropartículas oriundas da ASFAM 1 foram eficazes, principalmente sobre a germinação conidial.

Palavras-chave: Águas residuais. Atividade antifúngica. *Colletotrichum gloeosporioides*. Micropartículas. MEV.

Obtainment, morphologic characterization and antifungal potential of microparticles originated from fermentation water in the production of sour cassava starch atomized in spray dryer, using maltodextrine as charge

Abstract

The functional features evidenced in the fermented cassava starch, known as sour starch, produced during the stage of fermentation of this one are vastly studied, however, there are no records in the reference of studies which demonstrate the properties of solids present in the supernatant waters of fermentation of cassava starch (ASFAM), as well as, there are no studies with methods of concentration and preservation of these ones. It was carried out, in this study, the dehydration of three ASFAMs in spray dryer, using maltodextrine of different DEs (5, 15 and 21) as charge. From the obtainment of microparticles, the morphological features were evaluated, through MEV, and antimicrobials, through the mycelial growth and conidial germination of fungi *C. gloeosporioides*. Through the results it was possible to observe that the microparticles presented morphological differences according to origin of ASFAM and with the DE of maltodextrine used, with a tendency to the formation of a net involving the maltodextrines and also, to one agglomeration. The ASFAMs before the thermal procedure presented antimicrobial activity and, after the thermal treatment for obtaining the microparticles and microbial activity decreased, however, the microparticles originated from ASFAM 1 were efficient, mainly on the conidial germination.

Key-words: Residual waters. Antifungal activity. *Colletotrichum gloeosporioides*. Microparticles. MEV.

1 INTRODUÇÃO

Águas residuais, ricas em sólidos solúveis e insolúveis de efluentes agroindustriais, têm sido tradicionalmente eliminadas em sistemas corretivos de tratamento de resíduos. No entanto, estes procedimentos divergem dos conceitos das Tecnologias Limpas, onde ações preventivas direcionam os compostos que constituem carga orgânica, para fins específicos, como novos materiais.

A tomada de decisão sobre as aplicações de resíduos sólidos, líquidos e gasosos requer estudos avançados a respeito da composição química destes materiais. Conhecimentos profundos de processos típicos em países do hemisfério sul, são raros, uma vez que a maioria das indústrias é familiar, ou de pequeno a médio porte.

A indústria do polvilho azedo é tipicamente tradicional, de pequeno porte, com características de agroindústria familiar, o que justifica a inexistência de estudos avançados sobre as possibilidades de valorização dos seus resíduos.

Estudos de Avancini (2007) e de Biazotto (2008) sinalizaram positivamente quanto à segurança para o uso futuro das águas da fermentação do amido de mandioca da produção do polvilho azedo. Aquino (2015) caracterizou os ácidos orgânicos presentes nas águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca e diversos pesquisadores têm estudado o emprego do amido de mandioca na elaboração de filmes biodegradáveis (VIEITES, ARRUDA, GODOY, 1996; OLIVEIRA; CEREDA, 1999; HENRIQUE; CEREDA, 1999; DAMASCENO et al., 2003; CASTRICINI, 2009). No entanto, até o momento, nenhum pesquisador aventou à aplicação dos compostos sólidos residuais da ASFAM em revestimentos ou mesmo como material de proteção contra fitopatologias economicamente importantes.

O que indica a possibilidade destes compostos terem atividade antimicrobiana são os resultados obtidos quanto à presença de ácidos orgânicos (butírico, propiônico, láctico e acético) (DEMIATE et al., 1999; REGINATTO et al., 2009), além de outros compostos antimicrobianos gerados pela microbiota responsável pela fermentação, tais como a nisina (CLEVELAND et al. 2001) e natamicina (WELSCHER et al., 2007). Os ensaios *in vitro* contra cepas dos micro-organismos economicamente importantes para a fruticultura servirão como base para futuros estudos com frutas.

Considerando que estas águas de fermentação contêm entre 0,2 e 0,6 % de sólidos (AVANCINI, 2007), que estes sólidos possuem algum potencial antimicrobiano e que para a proteção de vegetais a concentração deve ser maior do que a naturalmente presente nas águas, torna-se necessário estudar um processo que incorpore carga e proteja estes sólidos. A aplicação de maltodextrina e a secagem por *spray drying* podem contribuir para facilitar o emprego destes novos materiais.

Neste trabalho, foi realizada a desidratação das ASFAMs em *spray dryer*, utilizando maltodextrina de diferentes DEs como carga. Esta alternativa visou diminuir o consumo de energia e minimizar os efeitos do calor, gerado no processo, sobre os ácidos presentes nas amostras para, então, obter os sólidos de forma estável. A partir da obtenção das micropartículas, objetivou-se avaliar as características físico-químicas e antimicrobianas das mesmas. Para verificar as propriedades antimicrobianas escolheu-se trabalhar com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, devido à grande disseminação e perdas que ocasiona em muitas frutas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas três amostras de águas residuais da produção do amido de mandioca obtidas de três empresas do Estado de Santa Catarina, denominadas: ASFAM1 - a amostra oriunda da cidade de São João do Sul, ASFAM2 - a amostra oriunda da cidade de Ibirama e ASFAM3 - a amostra oriunda da cidade de Agrônômica. A coleta seguiu um planejamento considerando a representatividade das empresas mapeadas, o que foi avaliado mediante visitas e coleta de dados quantitativos da produção destes resíduos. As ASFAMs foram acondicionadas em embalagens higienizadas e transportadas para o Laboratório de Tecnologia de Frutas e Hortaliças no mesmo dia da coleta. Foram realizadas as análises físico-químicas (pH, acidez titulável e sólidos solúveis totais) na chegada das amostras, as quais foram armazenadas em freezer a -18 ± 1 °C.

As maltodextrinas utilizadas como carga, foram gentilmente cedidas pela empresa Lorenz, Quatro Pontes, PR, Brasil.

2.1 Obtenção das micropartículas

Para a obtenção das micropartículas foram dissolvidas maltodextrinas com diferentes DE (5, 15 e 20) nas amostras de ASFAM na proporção de 1:1 (p/p), em relação aos sólidos totais encontrados em cada amostra. Para isso pesou-se, em balança analítica, a quantidade exata de maltodextrina e dissolveu-se à amostra de ASFAM em um agitador magnético por 10 minutos.

A evaporação da água, contida nas amostras, foi realizada através de *Mini Spray Dryer B-290 (BÜCHI, Suíça)*, onde a partir de testes preliminares foram definidos os parâmetros de secagem. O melhor rendimento no equipamento foi verificado quando se utilizou a temperatura da câmara de secagem a 130 °C e temperatura de saída de 45 °C \pm 3, capacidade de aspiração de 100% e a capacidade da bomba de 20%. As amostras desidratadas foram acondicionadas em sacos de polietileno de média densidade e armazenadas em frascos de polietileno de alta densidade.

2.2 Análises físico-químicas das ASFAMs

As análises físico-químicas, incluindo a determinação dos ácidos orgânicos das amostras das ASFAMs estudadas neste capítulo, estão descritas no Capítulo 4.

2.3 Análise de microscopia eletrônica de varredura nas micropartículas

As micropartículas, obtidas através da atomização da água de produção do polvilho azedo, foram estudadas quanto ao tamanho e seu arranjo, por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As amostras foram fixadas com fita dupla face, em suportes de alumínio, metalizadas com uma camada de ouro de 350 Å de espessura, através de um metalizador modelo D2 Diode Sputtering System fabricado pela ISI (*International Scientific Instruments*) e, em seguida, submetidas à análise no MEV (JEOL JSM-6390LV microscópio).

2.4 Análises antimicrobianas

A atividade antimicrobiana das ASFAMs foi estudada sobre as cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de frutos mamão, em fase inicial de desenvolvimento das lesões. Os frutos com as lesões já desenvolvidas foram adquiridos em um supermercado na cidade de Pelotas (RS).

Por isolamento direto, as estruturas fúngicas características das lesões causadas pelos fungos em estudo foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar), com auxílio de estilete, em câmara de fluxo em condições assépticas. Em seguida, as placas foram acondicionadas em estufa a 25 °C com fotoperíodo de 12 h.

Para verificar a capacidade antimicrobiana *in vitro* das micropartículas obtidas pela atomização das ASFAMs, foram elaborados dois delineamentos experimentais. O primeiro visou analisar o crescimento das colônias de *Colletotrichum gloeosporioides* e o segundo, a germinação conidial do mesmo.

2.4.1 Delineamento experimental: crescimento de *C. gloeosporioides*

Para este estudo foi elaborado um experimento fatorial (4x3x4) em blocos ao acaso, onde variou-se a origem da água para obtenção das micropartículas; o DE da maltodextrina utilizada como carga e a concentração de sólidos na suspensão. Ainda foram testadas, concomitantemente, as três ASFAMs que deram origem às micropartículas e os dois controles positivo (água) e negativo (fungicida: estreptomicina), totalizando 53 tratamentos com 4 repetições (Tabela 1). O experimento foi realizado duas vezes.

Tabela 1 - Efeito de diferentes micropartículas, produzidas a partir da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina no crescimento micelial e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *C. gloeosporioides*.

Tratamento	Variáveis independentes			Variável dependente
	Origem das microcápsulas	Encapsulante Maltodextrina	[] sólidos solúveis	
1	ASFAM 1		5	Crescimento micelial
2	ASFAM 2	DE 5	10	
3	ASFAM 3	DE 15	15	
-	Encapsulante	DE 21	20	
48				
49	ASFAM 1			IVCM
50	ASFAM 2			
51	ASFAM 3			
52	^a Controle +			
53	^b Controle -			

*Encapsulante: Maltodextrina

^aFungicida estreptomicina (3 mL.L⁻¹)

^bÁgua Milli-Q

2.4.2 delineamento experimental: germinação de *C. gloeosporioides*

Para este estudo foi elaborado um experimento fatorial (4x3), inteiramente casualizado, onde variou-se a origem da água para obtenção das micropartículas e o DE da maltodextrina, utilizada como carga. Para este teste, fixou-se a concentração de 10 vezes a concentração de sólidos encontrados na ASFAM de origem. Ainda foram testadas, concomitantemente, as três águas que deram origem as micropartículas e os dois controles positivo (água) e negativo (fungicida: estreptomicina). Totalizando 17 tratamentos, com 3 repetições (Tabela 2). O experimento foi realizado duas vezes.

Tabela 2 - Efeito de diferentes micropartículas, produzidas a partir da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina na germinação conidial de *Colletotrichum gloeosporioides*

Tratamento	Variáveis independentes		Variável dependente
	Origem das Microcápsulas	DE da maltodextrina	
1A			Germinação conidial
1B			
1C			
2A			
2B	ASFAM1	5	
2C	ASFAM 2	15	
3A	ASFAM 3	21	
3B	*Encapsulante		
3C			
A			
B			
C			
P1	ASFAM 1		
P2	ASFAM 2		
P3	ASFAM 3		
C+	^a Controle +		
C-	^b Controle -		

*Encapsulante: Maltodextrina

^a Fungicida estreptomicina (3 mL.L⁻¹)

^b Água Milli-Q

2.4.3 Preparo das suspensões

Para avaliar a capacidade que os sólidos obtidos da fermentação do amido de mandioca possuem em inibir o crescimento micelial e a germinação conidial de *Colletotrichum gloeosporioides*, foram preparadas as suspensões conforme detalhadas nas Tabelas 1 e 2.. A concentração dos sólidos em cada suspensão foi calculada levando em consideração a porcentagem de sólidos totais presentes na água de fermentação a qual deu origem a cada tratamento. Para o preparo das suspensões foram pesadas, em balança analítica (BEL M214Ai), as quantidades exatas de sólidos oriundos das ASFAMs requeridas para cada tratamento. As micropartículas foram colocadas em Eppendorfs, adicionados de água mineral esterilizada, agitadas em vortex (Certomat MV[®]) por 5 minutos e, em ultrason (UltraCleaner 1400A) por 30 minutos, em temperatura ambiente. As suspensões foram preparadas um dia antes do uso, sendo que durante este período foram armazenadas sob refrigeração.

2.4.4 Análises

2.4.4.1 Índice de velocidade de crescimento micelial

O teste foi montado em placas de Petri de polietileno, de 60 mm de diâmetro, contendo meio de cultura nutritivo para crescimento de microorganismos BDA (Barata – dextrose – ágar). Para o centro de cada placa com meio de cultura, foi transferido um disco com 5 mm de diâmetro de micélio, repicado de uma colônia de *Colletotrichum gloeosporioides*, após 10 dias de crescimento em meio BDA. Em torno do disco de micélio, foram dispostos, em forma de triângulo três discos, que foram produzidos utilizando papel filtro, com 5 mm de diâmetro. Cada disco foi impregnado com 10 µL da suspensão de micropartículas (Tabela 1). Após a montagem as placas, vedadas com filme PVC, foram alocadas em sala de crescimento, mantidas a 24 °C, com fotoperíodo de 12 horas luz, por 8 dias.

A avaliação do crescimento micelial foi verificada pela mensuração diária da colônia, obtida pela média de duas medidas diametralmente opostas, utilizando-se um paquímetro digital, em milímetros (mm). O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado segundo fórmula adaptada por (ARAÚJO et al., 2008) (Equação 1).

$$IVCM = \sum (D - DA) / N \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial;

D= diâmetro micelial médio atual;

Da = diâmetro médio anterior;

N = número de dias após a repicagem.

2.4.4.2 Germinação conidial

Para o preparo das suspensões foi utilizada uma placa de Petri com uma cultura fúngica com 10 a 15 dias de crescimento. Em cada placa, depositaram-se 5 mL de água e 10 µL de Tween 20 e, com uma alça de Drigauski, obteve-se uma suspensão de conídios e micélio. As suspensões foram filtradas em gaze e a quantidade de conídios foi determinada pela contagem em uma câmara de Newbauer, sendo ajustadas para a concentração de 10^5 conídios mL⁻¹. A concentração de conídios foi ajustada utilizando-se as suspensões preparadas conforme a Tabela 2, de forma que a concentração final de sólidos totais foi ajustada de forma que a concentração final de sólidos ficou 10 vezes superior quando comparada à água que lhe deu origem, em todos os tratamentos.

Placas de Petri de polietileno de 90 mm foram divididas em quatro quadrantes e, em cada quadrante, se depositou uma gota de 40 µL da suspensão conidial, em triplicata. Em seguida, cada placa foi acondicionada aberta dentro de uma caixa tipo gebox desinfestada, forrada com papel umedecido com água esterilizada formando uma câmara úmida. As suspensões foram incubadas a 27 °C, 100 % de UR e fotoperíodo de 12 horas luz. O crescimento fúngico foi paralisado pela adição de 5 µL de lactofenol e 5 µL de Azul de Amann. A geminação conidial foi avaliada após 24 horas de incubação, tempo determinado através de testes preliminares. Para determinar a germinação conidial, avaliou-se microscopicamente (200x) 50 conídios por gota. Conídios germinados foram considerados aqueles que apresentavam apressório sésil ou um tubo germinativo maior do que a largura do próprio conídio. O experimento foi realizado duas vezes.

2.4.5 Estatística

As análises foram realizadas em quadruplicata (n=4) para IVCM e em triplicata para a análise de germinação conidial (n=3). Os resultados estão apresentados como médias e desvios padrão.

Os dados foram analisados através do software Assistat 7.7 Beta (2015). Os quais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, com significância de 5 % ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química da ASFAM

Os dados obtidos podem ser visualizados no Capítulo 4 deste trabalho.

3.2 Caracterização morfológica das micropartículas das ASFAM

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada para observar a microestrutura apresentada pelos compostos naturais das ASFAMs em função dos tratamentos com as maltodextrinas de diferentes DEs utilizadas. O presente trabalho utilizou a maltodextrina porque esta é estável e pouco higroscópica (REINECCIUS, 2005) e segundo Shahidi e Han (1993) pode oferecer uma longa vida útil sem oxidação.

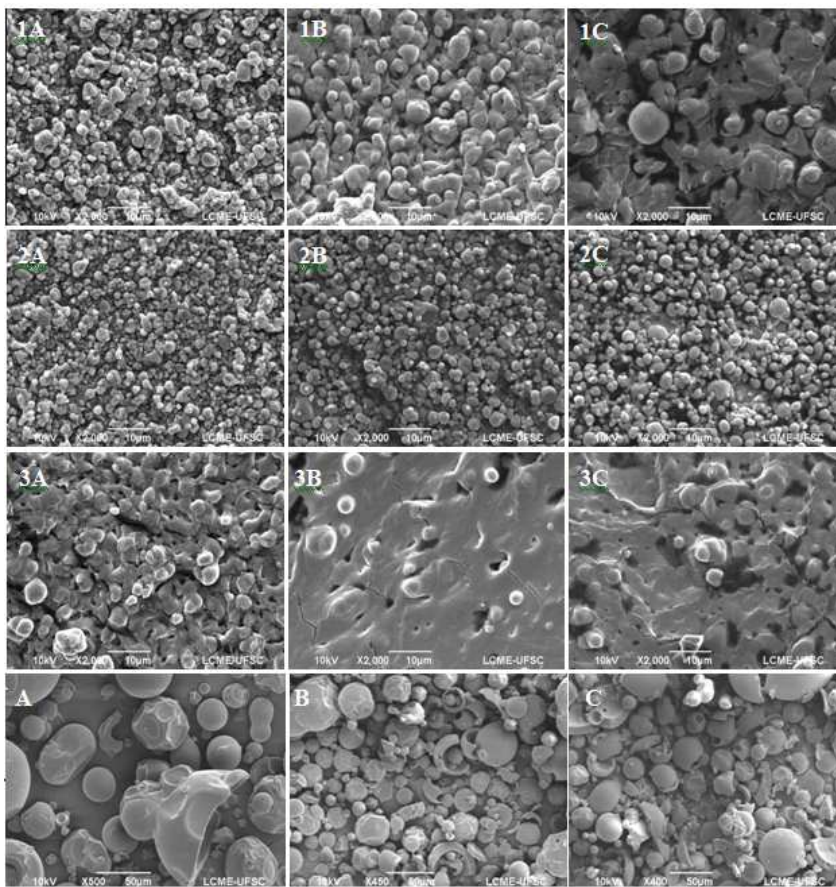
Os aspectos das micropartículas obtidas e das maltodextrinas estão apresentados nas micrografias que podem ser analisadas na Figura 1. Observa-se que o material obtido formou uma estrutura de rede, que cobre as micropartículas de maltodextrinas que apresentaram formatos de esferas irregulares e tamanhos variados com tendência à agregação (Figura 1). Nos tratamentos com a ASFAM 3 tratadas com as maltodextrinas de DE 15 e 21 observou-se uma agregação quase total das partículas. A agregação observada pode ser atribuída ao processo de secagem, pois esta característica é recorrente em processos de secagem heterogêneos e

incompletos onde pode ocorrer a unificação das partículas pela perda de umidade em função da rápida secagem e o resfriamento no secador (ARBUTO et al. 1998).

O emprego de temperaturas elevadas causa melhor rendimento na retenção de voláteis, mas os mesmos autores advertem que a elevação da temperatura e a concentração de sólidos podem levar ao rompimento das microcápsulas. (ROSENBERG; TALMON; KOPELAMAN, 1990).

A superfície rugosa das micropartículas, observadas neste trabalho, pode ter ocorrido durante o resfriamento, devido às características das suspensões que, após o entumescimento, com a saída de vapor de água pode ter adquirido este aspecto ou talvez à forma de homogeneização. Em um estudo para obtenção de micropartículas de óleo de café utilizando como material suporte maltodextrina, goma arábica e proteínas do soro de leite, Frascareli (2010) obteve micropartículas com morfologia altamente rugosa e agregada e atribuiu esse efeito às propriedades da suspensão e aos método de homogeneização.

Figura 1 - Micrografia eletrônica de varredura das micropartículas obtidas através da evaporação da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM), de diferentes produtores em *spray dryer*, utilizando como carga maltodextrina com diferentes DE.



*(1): ASFAM 1; (2): ASFAM 2; (3): ASFAM 3; (A): maltodextrina DE 5; (B): maltodextrina DE 15 e (C): maltodextrina DE 20.

3.3 Identificação do potencial antimicrobiano das micropartículas das ASFAM

Na Tabela 3 podem ser observados os resultados do efeito das micropartículas, obtidas através das ASFAMs, oriundas de três produtores do Estado de Santa Catarina, utilizando-se maltodextrina como carga sobre o crescimento e IVCm do *Colletotrichum gloeosporioides*. O efeito da água de fermentação, das soluções de maltodextrina e os controles também podem ser observados na Tabela 3. Através da análise dos resultados, para o crescimento micelial, verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Na Figura 2 pode ser observado o efeito das micropartículas e das ASFAMs sobre a germinação conidial. Pode-se observar que as ASFAMs oriundas dos produtores 1 e 2, de São João do Sul e Ibirama, respectivamente tiveram o mesmo comportamento do controle positivo, onde foi utilizado estreptomicina. As micropartículas obtidas a partir da ASFAM 1 onde utilizou-se as maltodextrinas com as cadeias mais hidrolisadas também resultaram em um número muito baixo de germinações. Os resultados obtidos nesta análise demonstram que a atividade antimicrobiana das micropartículas é dependente da composição da ASFAM que lhe dá origem e do material utilizado como carga.

Observou-se uma redução na atividade antimicrobiana das ASFAMs após o processamento para a obtenção das micropartículas. Tal comportamento indica que o tratamento térmico ou o material utilizado como carga diminuem ou afetam os compostos antimicrobianos das amostras. É possível que os ácidos presentes nas amostras possam ter formado complexos de inclusão com resíduos de amilose ainda presentes nas maltodextrinas utilizadas e não tenham sido liberados na suspensão.

Neste trabalho verificou-se efeitos positivos na análise de germinação conidial que não foram observados nos mesmos tratamentos na análise de crescimento micelial. Constatou-se que as ASFAMs têm maior ação sobre o conídio quando comparada ao micélio já desenvolvido. Estes resultados direcionam para estudos com as ASFAMs com aplicação em tratamentos preventivos e não curativos.

Tabela 3 - Efeito das suspensões produzidas a partir da água sobrenadante da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina, em diferentes concentrações, sobre o diâmetro da colônia e índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum gloeosporioides*.

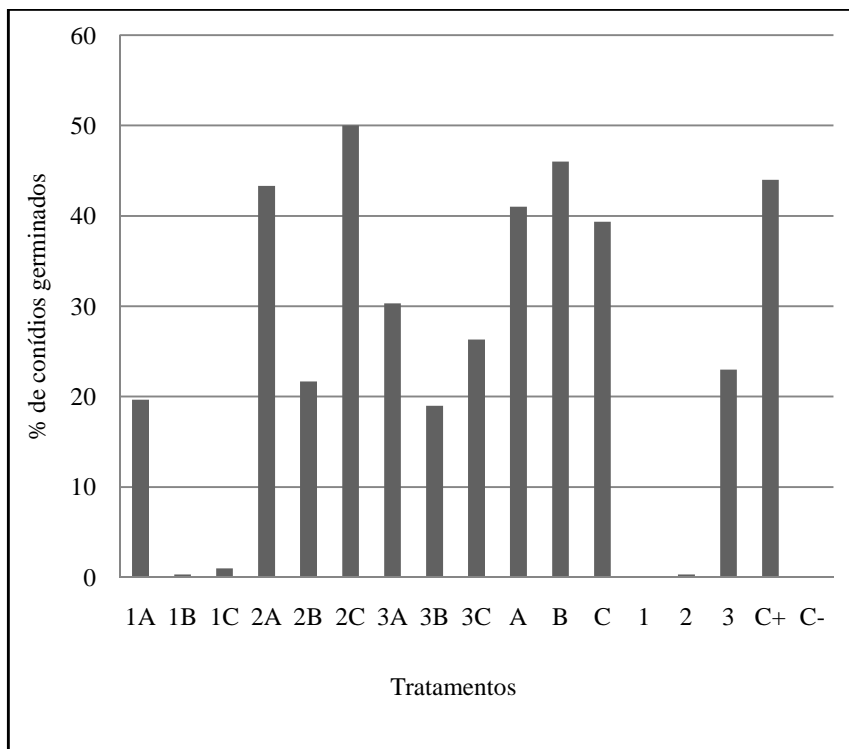
Tratamento **	°BRIX das suspensões	Crescimento micelial (mm)	IVCM
1 – P1 / M5 / C5	1,3	46,51 ^{ab}	6,91 ^{abc}
2 – P1 / M5 / C10	2,8	46,94 ^{ab}	6,99 ^{ab}
3 – P1 / M5 / C15	4,2	45,07 ^{ab}	6,67 ^{abc}
4 – P1 / M5 / C20	5,6	43,39 ^{ab}	6,39 ^{ab}
5 – P1 / M15 / C5	1,4	43,65 ^{ab}	6,44 ^{abc}
6 – P1 / M15 / C10	2,8	42,50 ^{ab}	6,25 ^{abc}
7 – P1 / M15 / C15	4,3	40,62 ^b	5,93 ^{ab}
8 – P1 / M15 / C20	5,7	45,12 ^{ab}	6,68 ^{abc}
9 – P1 / M20 / C5	1,3	45,68 ^{ab}	6,78 ^{abc}
10 – P1 / M20 / C10	2,8	47,30 ^{ab}	7,05 ^{abc}
11 – P1 / M20 / C15	4,2	42,11 ^{ab}	6,18 ^{abc}
12 – P1 / M20 / C20	5,6	45,36 ^{ab}	6,72 ^{abc}
13 – P2 / M5 / C5	1,3	39,45 ^b	5,74 ^{ab}
14 – P2 / M5 / C10	2,6	43,23 ^{ab}	6,37 ^{abc}
15 – P2 / M5 / C15	4,1	44,57 ^{ab}	6,59 ^{abc}
16 – P2 / M5 / C20	5,4	40,77 ^b	5,96 ^{ab}
17 – P2 / M15 / C5	1,2	41,05 ^{ab}	6,00 ^{abc}
18 – P2 / M15 / C10	2,4	42,44 ^{ab}	6,24 ^{abc}
19 – P2 / M15 / C15	3,7	43,34 ^{ab}	6,38 ^{abc}
20 – P2 / M15 / C20	5,0	47,15 ^{ab}	7,02 ^{ab}
21 – P2 / M20 / C5	1,2	47,16 ^{ab}	7,02 ^{ab}
22 – P2 / M20 / C10	2,4	46,66 ^{ab}	6,94 ^{abc}
23 – P2 / M20 / C15	3,6	44,97 ^{ab}	6,66 ^{abc}
24 – P2 / M20 / C20	4,9	44,26 ^{ab}	6,54 ^{abc}
25 – P3 / M5 / C5	1,3	45,82 ^{ab}	6,80 ^{abc}
26 – P3 / M5 / C10	2,7	46,14 ^{ab}	6,85 ^{abc}
27 – P3 / M5 / C15	4,0	46,20 ^{ab}	6,86 ^{abc}
28 – P3 / M5 / C20	5,4	42,07 ^{ab}	6,17 ^{ab}
29 – P3 / M15 / C5	1,4	41,36 ^{ab}	6,06 ^{abc}
30 – P3 / M15 / C10	2,5	41,23 ^{ab}	6,03 ^{abc}
31 – P3 / M15 / C15	3,8	41,21 ^{ab}	6,03 ^{abc}
32 – P3 / M15 / C20	5,1	45,22 ^{ab}	6,70 ^{abc}
33 – P3 / M20 / C5	1,3	43,38 ^{ab}	6,39 ^{abc}
34 – P3 / M20 / C10	2,5	43,50 ^{ab}	6,41 ^{abc}
35 – P3 / M20 / C15	3,8	44,13 ^{ab}	6,52 ^{abc}
36 – P3 / M20 / C20	5,1	44,36 ^{ab}	6,56 ^{abc}
37 – M5 / C5	1,7	45,40 ^{ab}	6,73 ^{ab}

38 – M5 / C10	3,0	42,96 ^{ab}	6,32 ^{abc}
39 – M5 / C15	4,5	39,94 ^b	5,82 ^{abc}
40 – M5 / C20	5,9	47,43 ^{ab}	7,07 ^{abc}
41 – M15 / C5	1,6	44,12 ^{ab}	6,52 ^{abc}
42 – M15 / C10	3,2	44,38 ^{ab}	6,56 ^{abc}
43 – M15 / C15	4,7	45,93 ^{ab}	6,82 ^{abc}
44 – M15 / C20	6,2	42,55 ^{ab}	6,12 ^{bc}
45 – M20 / C5	1,5	41,16 ^{ab}	6,02 ^{abc}
46 – M20 / C10	3,0	44,03 ^{ab}	6,50 ^{abc}
47 – M20 / C15	4,5	44,83 ^{ab}	6,63 ^{abc}
48 – M20 / C20	6,0	55,51 ^a	8,47 ^a
49 – água P1	0,4	40,47 ^b	5,91 ^{bc}
50 – água P2	0,8	39,95 ^b	5,89 ^c
51 – água P3	1,0	44,77 ^{ab}	7,48 ^{abc}
52 controle negativo	-	47,00 ^{ab}	7,00 ^{ab}
53 – controle positivo	-	18,80 ^c	2,30 ^d

* Para cada análise realizada, os valores comparam as médias dos diferentes produtores de amido de mandioca fermentado, médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo Teste de Tukey.

P1: ASFAM oriunda de São João do Sul; P2: ASFAM oriunda de Ibirama; P3: ASFAM oriunda de Agronômica; M5: maltodextrina DE 5; M15: maltodextrina DE 15; M20: maltodextrina DE 20; C5: cinco vezes mais concentrada que a água de origem; C10: dez vezes mais concentrada que a água de origem; C15: quinze vezes mais concentrada que a água de origem; C20: vinte vezes mais concentrada que a água de origem; **Fungicida estreptomicina (3 mL.L⁻¹).

Figura 2 - Efeito das suspensões produzidas a partir da água de fermentação do amido de mandioca (ASFAM) e maltodextrina, com a concentração de sólidos de 10 vezes a da água de origem, bem como somente destas águas sobre a percentagem de germinação de *Colletotrichum gloeosporioides*.



* P1: ASFAM oriunda de São João do Sul; P2: ASFAM oriunda de Ibirama; P3: ASFAM oriunda de Agrônômica; (A): maltodextrina DE 5; (B): maltodextrina DE 15 e (C): maltodextrina DE 20; (C-): Controle com água mineral; (C+): Controle com fungicida (Estreptomicina).

4 CONCLUSÕES

As micropartículas obtidas por *Spray Drying* apresentaram diferenças morfológicas entre os tratamentos realizados, sendo que as formulações compostas pelas maltodextrinas com DE 5 e 15 apresentaram uma melhor uniformidade. No entanto, pode-se observar que em todos os tratamentos houve tendência à aglomeração e à formação de uma rede envolvendo as partículas de maltodextrinas.

As análises de crescimento micelial e de germinação conidial demonstraram que ASFAM possui atividade antimicrobiana. A partir da análise de germinação conidial também pode-se confirmar o efeito antimicrobiano das micropartículas de ASFAM, obtidas por *Spray Drying*, sobre a germinação de *C. gloeosporioides*.

Este trabalho sinaliza para a realização de estudos sobre atividade antimicrobiana, bem como a otimização do processo, ou estudos envolvendo outros métodos de obtenção das micropartículas que detalhem a cinética de liberação dos ácidos orgânicos, para que os mesmos sejam considerados como uma possível alternativa aos fungicidas sintéticos e que possam ser usados em embalagens ou em coberturas para a proteção de frutas.

REFERÊNCIAS

AQUINO, A.C. **Caracterização das águas sobrenadantes da fermentação de amido de mandioca: ácidos orgânicos e suas relações com as propriedades do polvilho azedo**. 2015. 228 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015

ARAÚJO L.; BORSATO, L.C.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; STADNIK, M.J. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v.33, p.74-80, 2008.

AVANCINI, S. R. P. **Caracterização físico-química, microbiológica e toxicológica das águas de fermentação do amido de mandioca na produção do polvilho azedo**. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007, 104f.

BLAZOTTO, L.M. **Utilização das águas da fermentação do polvilho azedo na elaboração de uma nova bebida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2008, 88f.

CLEVELAND, J.; THOMAS, J.M.; NES, I.F.; CHIKINDAS, M.L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.1-20, 2001

DAMASCENO, S.; OLIVEIRA, P. V. S. de; MORO, E.; MACEDO JÚNIOR, E. K.; LOPES, M. C.; VICENTINE, N. M. Efeito da aplicação de película de fécula de mandioca na conservação pós-colheita de tomate. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.3, p.377-380, 2003.

DEMIATE, I.M., BARANA, A.C., CEREDA, M.P., WOSIACKI, G. Organic acid profile of commercial sour cassava starch. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n.1, p.131-135, 1999.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, n.4, p.136-151, 1988.

FRASCARELI, E. C. **Microencapsulação de óleo de café através de secagem por atomização: avaliação das propriedades da emulsão e do tipo de material de parede sobre as características do pó**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

HENRIQUE, C.M., CEREDA, M.P. Utilização de Biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria ananassa* Duch) cv. IAC Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.19, n. 2, p.231-233, 1999.

OLIVEIRA, M.A.; CEREDA, M.P. Efeito da película de mandioca na conservação de goiabas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.2, n.1-2, p.97-102, 1999.

REGINATTO, V. ; MARCON, M.J.A.; XAVIER, J.M.; SCUSSEL, V.M.; AMANTE E.R.; KURTZ, D. **Modification of the sour cassava starch production process to improve organic acids in the wastewater**. In: 2nd

International Workshop Advances in Cleaner Production, 2009, São Paulo. Proceedings of the 2nd International Workshop Advances in Cleaner Production. São Paulo: UNIP, 2009.

REINECCIUS, G.A. **Flavor Chemistry and Technology**, 2 ed. Taylor e Francis Group, Boca Raton, 2005.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J. & TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **J. Agric. Food Chem.**, v.36, p.1288-1294, 1990.

SHAHIDI, F. e HAN, X.Q. Encapsulation of Food Ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.501-547, 1993.

ABURTO, L.C.; TAVARES, D.Q.; MARTUCCI, E.T.; Microencapsulação de óleo essencial de laranja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.1, p.1-7, 1998.

VIEITES, R. L., ARRUDA, M.C., GODOY, L.J.C. Utilização de cera e películas de fécula no armazenamento da laranja pêra sob refrigeração. **Semina**, Londrina: UEL, 1996.

WELSCHER, Y.M.; NAPEL, H.H.; BALAGUÉ, M.M.; SOUZA, C.; RIEZMAN, H.; KRUIJFF, B.; BREUKINK, E. Natamycin blocks fungal growth by binding specifically to ergosterol without permeabilizing the membrane. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, p. 6393-6401, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos realizados, pode-se considerar:

- Que as águas sobrenadantes da fermentação do amido de mandioca (ASFAM) possuem atividade antimicrobiana sobre bactérias e fungos. Podendo-se atribuir a atividade antimicrobiana, em parte, à presença dos ácidos orgânicos. No entanto, em muitas análises a ASFAM mostrou-se superior aos padrões dos ácidos testados isoladamente para comparação.

- A possibilidade de concentrar os sólidos contidos na ASFAM em micropartículas com uso de uma carga como encapsulante mostrou-se viável, no entanto é necessário que o processo de obtenção seja melhorado. Estudos a respeito da perda destes compostos durante o processamento e da liberação no meio em que forem atuar são imprescindíveis para que esta matéria prima seja ainda mais valorizada.

- Substâncias naturais capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento microbiano são as alternativas mais viáveis e seguras para o controle de micro-organismos em alimentos.

- Este trabalho inclui mais uma matéria prima natural com propriedades antimicrobianas a qual tem a possibilidade de substituir agrotóxicos para controlar fungos e bactérias em diversos alimentos.