

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Parecer

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Paulo Fernando de Almeida e aprovada pela Comissão Julgadora em 17.06.92.

*Almeida*

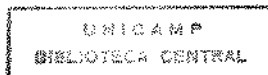
PROCESSAMENTO  
E CARACTERIZAÇÃO DA PUBA

PAULO FERNANDO DE ALMEIDA *PA*

Orientadora: Profa. Dra. Iracema de Oliveira Moraes *IM*

Co-orientador: Prof. Dr. Edir Nepomuceno da Silva *ES*

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de Doutor em Tecnologia de Alimentos  
Campinas - S.P. - 1992



BANCA EXAMINADORA

*Iracema*

---

Prof. Dra. Iracema de Oliveira Moraes  
(Orientadora)

*Deise M Capalbo*

---

Prof. Dra. Deise Maria Fontana Capalbo  
(membro)

*Yoon Kil Chang*

---

Prof. Dr. Yoon Kil Chang  
(membro)

*Takuo Hashizume*

---

Prof. Dr. Takuo Hashizume  
(membro)

*Ahmed Athia El-Dash*

---

Prof. Dr. Ahmed Athia El-Dash  
(membro)

*Vanderlei*

---

Prof. Dr. Vanderlei Perez Canhos  
(Membro)

*Marney Pascoli Cereda*

---

Prof. Dr. Marney Pascoli Cereda  
(membro)

17/06/92

À meus pais, Clarice e Miguel (in memoriam)

Primeiros orientadores a me indicarem  
o "via, veritas, vita".

À minha esposa, Rogeria

Aos nossos filhos, Paulo Miguel

Maria Teresa

Juliana

Pedro Henrique

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Aos Professores Iracema de Oliveira Moraes, Tobias Barreto de Menezes e Edir Nepomuceno da Silva pela colaboração, orientação, apoio, incentivo e amizade.

Aos Professores José Christovam dos Santos, Arnaldo Y. Kuaye e José Sátiro de Oliveira pelo apoio e amizade demonstrados, nos momentos mais difíceis, durante minha estada em Campinas.

Ao Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, nas pessoas do Diretor, Prof. Valdomiro Sgarbieri, Coordenador, Prof. Gil Serra e ao Químico Marcos Pupini, por permitirem as análises cromatográficas das amostras de pba.

Aos Professores José Geraldo Sabioni, Francisco Maugeri Filho, Isabel e Gláucia Pastore, pelo estímulo frequente na condução deste trabalho.

À Bibliotecária, D. Angelina e ao seu esposo, Prof. Montgomery, pela amizade e carinho demonstrados.

Aos professores do Depto. de Bioagressão do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, que assumiram meus encargos docentes, durante a realização do presente curso.

À Grace, Fátima, Isabel, Júlio e Ivan pela colaboração prestadas.

Ao Pesquisador Dr. Policarpo Vitti do Instituto de Tecnologia de Alimentos, por permitir as análises amilográficas das amostras de puba.

À FINEP, CNPq, CAPES/PICD pelo auxílio financeiro.

A Associação Brasileira de Industrias de Alimentação (ABIA), pelo fornecimento das cópias desta tese.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

# ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMO .....	xii
SUMMARY .....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Fermentação da mandioca para obtenção de puba .	4
2.1.1. Microbiota .....	7
2.1.2. Bioquímica .....	8
2.2. Caracterização tecnológica da mandioca .....	14
2.2.1. Composição química .....	14
2.2.2. Toxicidade da mandioca .....	15
2.2.3. Propriedades visco-amilográficas de produtos de mandioca .....	17
2.2.4. Condições microbiológicas .....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
3.1. Fermentação natural da mandioca para obtenção de puba .....	21
3.1.1. Microbiota .....	21
3.1.1.1. Fermentação natural, coleta e preparo das amostras .....	21

3.1.1.2. Amostragem .....	21
3.1.1.3. Contagem e isolamento dos microorganismos .....	22
3.1.1.3. Caracterização, identificação e classificação dos microorganismos .....	23
3.1.2. Determinações físicas, físico-químicas, físico-químicas e bioquímicas .....	28
3.1.2.1. Acidez titulável e pH .....	28
3.1.2.2. Temperatura .....	28
3.1.2.3. Determinação dos produtos metabólicos .....	28
a) Açúcares redutores .....	28
b) Determinação da atividade dextrinizante .....	28
c) Determinação de ácido cianídrico .....	28
d) Determinação de ácidos orgânicos álcoois e cetonas por cromatografia gasosa .....	28
e) Determinação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida .....	29
3.2. Ensaio fermentativo para obtenção de puba sob condições determinadas .....	30
3.2.1. Influência dos organismos isolados ....	30

3.2.1.1. Preparo da matéria prima .....	30
3.2.1.2. Preparo do inóculo .....	30
3.2.1.3. Avaliação dos ensaios .....	31
3.2.2. Influência da fragmentação das raízes ..	31
3.2.3. Influência da temperatura .....	31
3.2.4. Influência do pH .....	31
3.2.5. Influência do material do recipiente ..	32
3.2.6. Influência da anaerobiose .....	32
3.2.7. Influência da adição de líquido pré- fermentado como inóculo .....	32
3.2.8. Influência da adição de substâncias seletivas .....	33
3.2.9. Influência do tratamento térmico .....	33
3.3. Caracterização física, físico-química, química, bioquímica e microbiológica de amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano .....	34
3.3.1. Características sensoriais das amostras .....	35
3.3.2. Vida de prateleira .....	35
3.3.3. Determinações físicas, físico-químicas, químicas e bioquímicas .....	36
3.3.3.1. Umidade .....	36
3.3.3.2. Cinzas .....	36
3.3.3.3. Proteínas .....	36
3.3.3.4. Extrato etéreo .....	36
3.3.3.5. Fibras .....	36
3.3.3.6. Amido .....	36



3.3.3.7. Poder diastásico .....	37
3.3.3.8. Ácidos orgânicos .....	37
3.3.3.9. Ácido cianídrico .....	37
3.3.3.10. pH .....	37
3.3.3.11. Acidez titulável .....	37
3.3.3.12. Análises visco-amilográficas ..	37
3.3.4. Análises microbiológicas .....	38
3.3.5. Aplicação tecnológica da puba .....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	41
4.1. Fermentação natural da mandioca para obtenção de puba .....	41
4.1.1. Microbiota .....	41
4.1.1.1. Contagens .....	41
4.1.1.2. Caracterização da microbiota ..	55
4.1.2. Determinações físicas, físico-químicas, químicas e bioquímicas .....	62
4.1.2.1. Acidez titulável e pH .....	62
4.1.2.2. Temperatura .....	67
4.1.2.3. Produtos metabólicos .....	67
a) Açúcares redutores .....	67
b) Atividade dextrinizante ...	67
c) Ácido Cianídrico .....	68
d) Ácidos orgânicos, álcoois e cetonas por cromatografia gasosa .....	68
e) Ácidos orgânicos por	



4.3.3.3. Atividade diastásica .....	86
4.3.3.4. Produtos metabólicos .....	87
4.3.3.5. Análises visco-amilográficas ..	88
4.3.3.6. Análises microbiológicas .....	90
4.3.4. Aplicação tecnológica de uma amostra de puba .....	92
5. CONCLUSÕES .....	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	97
ANEXO I - Tabela 20 .....	107
ANEXO II - Tabela 21 .....	108
ANEXO III - Tabela 22 .....	109
ANEXO IV - Tabela 23 .....	110
ANEXO V - Tabela 24 .....	111
ANEXO VI - Tabela 25 .....	112
ANEXO VII - Tabela 26 .....	113
ANEXO VIII - Tabela 27 .....	114
ANEXO IX - Tabela 28 .....	115
ANEXO X - Tabela 29 .....	116

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela	Página
1. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de Puba (Fermentações 1 e 2) .....	42
2. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de Puba (Fermentações 3 e 4) .....	44
3. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de Puba (Fermentações 5 e 6) .....	46
4. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de Puba (Fermentações 7 e 8) .....	47
5. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de Puba (Fermentações 9 e 10) .....	48
6. Valores mínimos, médios e máximos da microbiota presente durante 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	52
7. Características de 44 isolados bacterianos em forma de cocos Gram-positivos encontrados durante a fermentação de raízes de mandioca para obtenção de	

puba .....	59
8. Características de 45 isolados bacterianos em forma de bacilos Gram-positivos encontrados durante a fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	60
9. Características de 31 isolados da Família Enterobacteriaceae encontrados durante a fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	61
10. Valores de pH encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	63
11. Valores de acidez titulável (% em ácido láctico) encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	65
12. Valores de temperatura (°C) encontrados no líquido de 10 fermentações de mandioca para obtenção de puba .....	71
13. Açúcares redutores (mg %) encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	73
14. Valores mínimos, médios e máximos da vida de prateleira de 25 amostras de puba .....	84

15. Composição química centesimal das 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano .....	86
16. Análises químicas e físico-químicas das 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano .....	87
17. Teor de ácido cianídrico nas 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano .....	88
18. Características visco-amilográficas de 11 das 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano ..	89
19. Média das contagens de microrganismos indicadores em 25 amostras de puba úmida comercializadas no recôncavo baiano .....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Fluxograma de obtenção de Puba .....	6
2. Chave simplificada para classificação de alguns gêneros de bactérias .....	27
3. Valores médios da microbiota de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	53
4. Participação percentual média da microbiota em 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	54
5. Valores mínimos, médios e máximos de pH encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	64
6. Valores mínimos, médios e máximos da acidez encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	66
7. Valores mínimos, médios e máximos da temperatura encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de	

mandioca para obtenção de puba .....	72
8. Valores mínimos, médios e máximos de açúcares redutores encontrados no líquido de 08 fermentações de mandioca para obtenção de puba .....	74
9. Teor de ácido cianídrico encontrado durante uma fermentação típica de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	75
10. Produtos metabólicos encontrados, por cromatografia gasosa, durante uma fermentação típica de raízes de mandioca para obtenção de puba .....	76
11. Produtos metabólicos encontrados, por cromatografia líquida de alta eficiência, durante uma fermentação típica de raízes de mandioca para obtenção de puba ....	77



## RESUMO

Carimã ou puba, um produto fermentado obtido da mandioca, é consumido no nordeste brasileiro. A fermentação das raízes da mandioca é uma das etapas mais importantes para obtenção da puba. Poucos são os dados disponíveis sobre a microbiota e bioquímica envolvida na fermentação da puba, cujo processo não é controlado.

Este trabalho foi conduzido para identificar a microbiota, as alterações físicas, físico-químicas e bioquímicas associadas com esse processo, bem como efetuar ensaios fermentativos controlados, comparativos, além da caracterização de amostras de puba comercializadas em feiras livres no recôncavo baiano.

Do material em fermentação foram isolados enterobactérias, corinebactérias, bactérias lácticas (particularmente estreptococos, lactobacilos e leuconostocos), *Bacillus*, clostrídios e leveduras. A maioria dos microrganismos estava presente no início do processo, mas com a continuação do mesmo, ocorreram alterações consideráveis na população microbiana. De modo geral, as enterobactérias, corinebactérias e *Bacillus* ocorreram principalmente até 48 horas, e, paulatinamente foram substituídas pelas bactérias lácticas e, em algumas ocasiões, também pelos clostrídios após esse período.

A maioria das fermentações ocorreu a temperaturas de 28 a 32°C. De modo geral, a acidez titulável cresceu, reduzindo o pH a

valores abaixo de 5,0. A média da concentração de açúcares redutores situou-se entre 2 a 3 mg % durante a fermentação que durou cerca de 72 horas. Dentre os produtos metabólicos detectados incluíram-se os ácidos acético, butírico, propiônico e láctico, bem como etanol, butanol e acetona. O teor de ácido cianídrico decresceu de uma concentração inicial de 79 mg/Kg de massa para cerca de 18 mg/Kg. Atividade de enzimas dextrinizantes foi observada após 48 horas de iniciada a fermentação.

O tempo de fermentação reduziu-se em cerca de 25 % quando se adicionou líquido de uma pré-fermentação como inóculo, bem como empregando fragmentos de raízes previamente incubadas à temperatura de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . O tratamento das raízes com desoxicolato de sódio a 0,1% e tratamentos térmicos a 65 e  $75^{\circ}\text{C}$  por 5 minutos, também reduziram o período de fermentação da mandioca para obtenção de puba. Os organismos isolados, do tipo esporulados e *Klebsiella* sp. foram capazes de macerar a mandioca, embora lentamente. Estes organismos associados com *S. faecalis* e lactobacilos originaram aroma ligeiramente similar ao da puba.

A composição química centesimal das amostras de pubas comerciais, apresentou-se bastante variada, particularmente quanto ao teor de cinzas, extrato etéreo, proteínas e açúcares redutores. Estes resultados mostram que a padronização das técnicas empregadas para obtenção da puba é necessária. Da mesma forma, a embalagem e armazenamento do produto, precisam ser melhorados, associadas a condições adequadas de tempo e temperatura. Os resultados de pH e acidez também apresentaram

resultados muito variados, e, associados aos valores de umidade influenciaram diretamente a vida de prateleira das amostras de puba. As amostras apresentaram concentração de ácido cianídrico abaixo do limite considerado tóxico para o ser humano. Os ácidos acético, butírico e láctico foram os predominantes nas amostras de puba comerciais. A atividade diastásica, bem como as propriedades visco-amilográficas da maioria das amostras recomendam a aplicação da puba em produtos como bolos, pudins, bolachas, mingaus, etc. As análises microbiológicas mostram que as amostras de pubas comerciais não apresentaram coliformes fecais e que os prováveis riscos de deterioração estão relacionados aos fungos e bactérias psicrófilas cujas contagens foram superiores a  $10^6$  e  $10^5$  UFC/g, respectivamente. Ocorreu a presença de *Bacillus* com características de *B. cereus* em mais de 68 % das amostras.

## SUMMARY

Puba, a fermented cassava product is consumed in northeastern Brazil. Fermentation is one of the most important stages for puba production. Data concerning the fermentation of cassava roots are scarce.

This study was thus conducted to identify the microbiota, physical, physico-chemical and biochemical changes associated with this process. Controlled comparative assays and characterization of commercial puba samples obtained from supermarkets on the "recôncavo baiano", were also undertaken.

Enterobacteria, corynebacteria, lactic bacteria (principally streptococci, lactobacilli and leuconostoc), *Bacillus*, clostridia and yeasts were isolated from fermenting cassava for puba production. Although, in general, all microbial isolates were present at the beginning of the fermentation, there were considerable changes in the population of the organisms throughout the fermentation process. The enterobacteria, corynebacteria and bacilli occurred initially and the lactic bacteria and, in some occasions, the clostridia finished the fermentation.

The titratable acidity of the steeping water increased reducing the pH below 5,0. The temperature of most fermentations varied between 28 to 32°C. The average of the reduced sugars

concentration was between 2 to 3 mg % during the fermentation. Metabolic products included acetic, butyric and lactic acids, together with ethanol, butanol and acetone. The cyanide content was reduced from an initial concentration of 79 mg/Kg of fresh mass to 18 mg/Kg.

The fermentation time was reduced to 48 hours using liquid previously fermented as starter, as well as by the use of root fragments, temperature control, thermic treatments and the addition of 0,1 % sodium desoxycholate to the raw material. The sporulated organisms and/or *Klebsiella*, isolated or preferentially associated with *S. faecalis* and lactobacilli were able to ret and to produce puba-like flavor.

The chemical composition of the puba varied, indicating the necessity of standardization of the techniques of production. Acidity and pH measurements varied and associated with humidity values, directly influenced the market life of puba samples. The cyanide concentration was not considered toxic for human beings. The visco-amylographic and diastasic properties of the majority of samples predicted the application of puba to products like cakes, gelies, crackers, porridge, etc. Microbiological analysis showed that fecal coliforms were absent. The probable risks of deterioration has been related to fungus and psychrophilic bacteria in counts up to  $10^6$  to  $10^5$  UFC/g, respectively. The presence of *Bacillus cereus* like species in more than 60 % of samples needs to be clarified concerning the production of enterotoxins.

## 1 . INTRODUÇÃO

A modificação da estrutura agrária tem dificultado a industrialização de matérias primas no meio rural, de tal sorte que o abastecimento de produtos alimentícios nos estabelecimentos comerciais é quase que completamente restrito a produtos oriundos de centros mais industrializados. Essa situação provoca desestímulo à produção de alimentos, com maiores reflexos na economia da região norte/nordeste, que além de tornar-se dependente de alimentos processados, somente poderá adquiri-los por preços relativamente elevados. As tecnologias artesanais, como a de fabricação da puba, são as mais prejudicadas

A mandioca é utilizada sob diversas formas, desde a alimentação humana e animal, até as aplicações industriais. Em áreas populacionais de baixa renda, como no Centro Sul da África, são produzidos em escala comercial, vários tipos de alimentos fermentados da mandioca. Essa produção tende a aumentar, visto que, com frequência, estão sendo feitos estudos que permitem melhorar o rendimento dos processos fermentativos.

No Brasil, particularmente no Nordeste, a fermentação da mandioca para obtenção de puba é efetuada através de métodos artesanais, o que, frequentemente, compromete a qualidade desse apreciado produto.

O grande consumo da puba, produto importante para as classes de baixa renda, deve-se a sua utilização no preparo de doces, bolos, biscoitos, pamonhas, mingaus, cuscús, dentre outros.

Muito embora os produtos fermentados da mandioca, entre os quais a puba se inclui, sejam apreciados e consumidos sob as mais variadas formas pela população brasileira, poucas são as pesquisas que esclarecem o tipo de fermentação, os principais microrganismos, os fenômenos bioquímicos envolvidos durante a fermentação da mandioca para obtenção de puba ou carimã, bem como pouco se conhece sobre a qualidade da puba comercializada na Bahia.

Devido a importância da cultura e industrialização da mandioca no Brasil, sobretudo na região Nordeste, estudos que se relacionem à melhoria dos processos pra obtenção de puba são fundamentais para manutenção e estímulo a essas atividades tradicionais, cujos reflexos econômicos e sociais têm significação expressiva em nosso país. Desse modo, este trabalho foi desenvolvido para alcançar os seguintes objetivos:

1. Determinar os principais processos microbianos e bioquímicos que ocorrem durante a fermentação da puba e as condições ótimas em que a mesma ocorre.
2. Caracterizar amostras de puba comercializadas na Bahia quanto a qualidade.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A mandioca é de origem brasileira e sua produção anual atinge cerca de 21 milhões de toneladas, sendo a Bahia o principal estado produtor, com cerca de 19,3 % (BAHIA, 1985). Esta planta é considerada o pão dos trópicos porque além da facilidade de cultivo, resistência a doenças e variações climatológicas (MARIATH & RIVERA, 1986), dela se preparam vários tipos de alimentos, particularmente nas camadas mais humildes da população.

No norte e nordeste brasileiros, uma grande variedade de produtos é preparada com as raízes e folhas da mandioca, tais como o beijú, tapioca, puba, manicoba, tucupi, tacacá, goma, arubê, dentre outros, além de uma grande diversidade de tipos de farinhas, como a farinha d'água, a farinha seca ou de mesa, a mista e a do Pará (NORMANHA, 1960/1967). No recôncavo baiano a mandioca é comercializada crua ou transformada em farinha, garantindo cerca de 80 % da renda familiar do agricultor (ESPINAL & ALMY, 1979).

A fécula de mandioca, encontra aplicação em inúmeros produtos industriais, tais como papel, têxtil, gomas, álcool, e como adjuvante ou substituto nas indústrias de panificação, embutidos e cerveja.



A mandioca pode ser transformada por fermentação, obtendo-se produtos como a puba, o polvilho azedo, a farinha d'água, dentre outros (MARAVALHAS, 1964; CAMPBELL-PRATT, 1987; MENDES et al., 1988). A fermentação é considerada um dos métodos mais econômicos de produzir e preservar alimentos para consumo humano (PEDERSON, 1980). A fermentação da mandioca objetiva proporcionar novas características tecnológicas e sensoriais aos produtos, além de reduzir sua toxicidade, através da remoção do ácido cianídrico, presente em elevado teor nas variedades usadas para fins industriais (CEREDA, 1973). Esses produtos são largamente empregados, particularmente, na culinária caseira das regiões Norte e Nordeste do Brasil, para confecção de biscoitos, bolos, cuscús, mingaus, etc. (ALBUQUERQUE, 1969).

## **2.1. FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE PUBA**

Carimã (do Tupi, massa azeda de mandioca), mandioca puba ou simplesmente puba é um produto da mandioca obtido por fermentação espontânea das raízes frescas, inteiras ou partidas. No processo rotineiro, as raízes são colocados diretamente em água estagnada ou dentro de um saco mantido em água corrente. Em ambos os casos, permanecem de 3 a 7 dias nessas condições, até que amoleçam e comecem a soltar a casca. O período de maceração depende das condições, do cultivar e da idade das raízes, da temperatura e pH da água. Em seguida, esmagam-se as raízes em peneiras ou cochos de madeira e secam-se ao sol ou em um forno (ALBUQUERQUE, 1969; GRAVATÁ, 1940; DÁRO, 1937a,b; GRAMACHO, 1975; PICKEL, 1938; SCHOLTZ, 1971). A puba foi introduzida no norte e nordeste do

Brasil, pela cultura indígena, sendo largamente empregado na culinária regional, sobretudo junto as camadas mais humildes da população (GRAMACHO, 1975).

MALTA (1958) relata que os índios brasileiros preparavam a puba através da redução das raízes de mandioca a uma polpa, que era deixada amolecer e fermentar, quando então extraíam o líquido tóxico, ficando apenas o polvilho, o qual era composto quase que somente de amido, sem as fibras que existem na farinha de mandioca.

De acordo com GRAMACHO (1975), a matéria prima mais adequada para produção de puba é constituída de raízes frescas de 8 a 12 meses de cultivo. Este autor também verificou que a retirada da película externa das raízes melhora a qualidade da puba.

A maceração consiste no amolecimento das raízes de mandioca durante o processo fermentativo, conforme relata CAMPBELL-PLATT (1987).

MARAVALHAS (1964) acredita que o sabor e odor da farinha d'água são determinados pela maceração, a qual tudo indica tratar-se de fermentação butírica, provavelmente ocasionada por *Clostridium sp.* devido ao acentuado odor butírico exalado.

De acordo com nossas observações, nas diversas regiões da Bahia, a puba é produzida por dois processos. A Figura 1 mostra o fluxograma de obtenção da puba pelos dois processos.



FIGURA 1 - Fluxograma de obtenção da puba

### 2.1.1. MICROBIOTA DA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA

Os processos de utilização da mandioca, usados pelos índios brasileiros foram absorvidos pelos escravos e transferidos para o continente africano. Dos produtos africanos obtidos por fermentação da mandioca, os sistemas que mais se assemelham à produção da puba são os do foo-foo e o do lafun, conforme relatados por OKE (1968). OKAFOR et al. (1984) efetuando um estudo detalhado sobre a microbiologia da maceração da mandioca para produção do foo-foo, isolaram bactérias dos Gêneros *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Klebsiella*, *Leuconostoc* e *Corynebacterium*, bem como uma levedura do Gênero *Candida*. Por sua vez, ADEGOKE & BABALOA (1988) verificaram que os microrganismos predominantes durante a fermentação do foo-foo foram *Streptococcus faecalis*, coliformes, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis* e *Saccharomyces cerevisiae*.

De acordo com OYEWOLE & ODUNFA (1988), os microrganismos envolvidos com a fermentação do lafun são *Bacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Klebsiella* sp., *Corynebacterium* sp. e *Geotricum* sp., *Candida* sp. e *Lactobacillus* sp..

ALMEIDA et al. (1987) relatam que os microrganismos do tipo enterobactérias, corinebactérias, lactobacilos, leuconostocos, enterococos e leveduras formadoras de película estão envolvidas na produção da puba. Na oportunidade os mesmos autores observaram que existiam alterações na população microbiana durante o

processo de produção da puba, na forma de aumento da população de *Erwinia*, *Klebsiella*, *Corynebacterium* e *Streptococcus* durante as primeiras 24 horas da fermentação. Após esse período a contagem dos três primeiros gêneros citados decresceu gradualmente até desaparecer no terceiro dia da fermentação. Os organismos dos gêneros *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc* foram aumentando gradualmente até predominarem no final da fermentação.

OYEWOLE & ODUNFA (1990) estudaram 134 cepas de bactérias lácticas isoladas da fermentação do foo-foo. A sequência e proporção das cepas incluem *Lactobacillus plantarum* (81 %), *Leuconostoc mesenteroides* (16 %), *L. cellobiosus* (15 %), *L. brevis* (9 %), *L. coprophilus* (5 %), *L. lactis* (4 %), *Leuconostoc lactis* (3 %) e *L. bulgaricus* (1 %). O fenômeno da sucessão entre as bactérias lácticas foi verificado, sendo que o *L. plantarum* foi o microrganismo predominante durante a fermentação.

### **2.1.2. BIOQUÍMICA DA FERMENTAÇÃO DE MANDIOCA**

Na fermentação da mandioca para obtenção de puba parecem estar envolvidas enzimas amilolíticas, pectolíticas, a degradação do glicosídeo cianogênico, o metabolismo de dextrinas e de açúcares em compostos como ácidos, álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas.

Quanto aos aspectos bioquímicos da fermentação da mandioca para produção do foo-foo, OKAFOR et al (1984) verificaram que apenas os microrganismos dos gêneros *Bacillus* e *Corynebacterium*

sp. eram capazes de macerar a mandioca e hidrolisar a fécula. Por sua vez, as bactérias do ácido lático eram responsáveis pelo abaixamento do pH do meio a valores inferiores a 4, conferindo o aroma típico do foo-foo, mas sem promover a maceração.

DHOCHUKU & BALLANTINE (1983) estudando os componentes responsáveis pelo odor ativo do foo-foo, encontraram ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico, sendo que o último era responsável pelo odor desagradável. Conforme relatos anteriores, MARAVALHAS (1964) acredita que o sabor e odor da farinha d'água são ocasionados durante a maceração, na qual tudo indica estar implicada a fermentação butírica, provavelmente através de *Clostridium* sp. devido ao acentuado odor butírico exalado.

OYEWOLE & ODUNFA (1988), estudando a fermentação de lafun relataram que a acidez titulável do líquido da fermentação e das raízes aumentou rapidamente, reduzindo o pH a níveis inferiores a 4,0. A temperatura oscilou entre 30 e 32°C.

CEREDA (1973), estudou a microbiota e cinética da fermentação para produção de polvilho azedo, verificando que as diversas fermentações realizadas em laboratório apresentaram variações quanto ao pH, acidez titulável e produção de ácidos orgânicos, no decorrer do processo fermentativo. NAKAMURA (1975) acompanhou as atividades amilolíticas e proteolíticas durante a fermentação, para produção do polvilho azedo..

AYRES (1972), AKINRELE (1964) e COLLARD & LEVI (1959) relatam a existência de um produto fermentado a partir da mandioca, muito popular no centro sul da África, denominado gari, cujo processo de produção consiste em moer as raízes de mandioca e deixá-las sofrer fermentação ácida natural, ocorrendo liberação de ácido cianídrico, seja por abaixamento do pH ou por ação de enzimas endógenas.

COLLARD & LEVI (1959), estudando a fermentação do gari, verificaram que o processo ocorre em dois estágios: na primeira fase o *Corynebacterium manihot* degrada o amido com produção de ácidos orgânicos (inclusive ácido láctico) durante as primeiras 24 horas, criando condições ambientais (pH e nutrientes oxidáveis) favoráveis para o desenvolvimento do fungo *Geotricum candidum*, assim como para a decomposição do glicosídeo cianogênico tóxico. Esse último organismo inicia a segunda fase, tornando-se paulatinamente predominante até o fim do processo fermentativo, produzindo aldeídos e ésteres que conferem aroma e sabor característicos do gari.

Segundo TINAY et al. (1984), a perda de ácido cianídrico é significativa no 1º dia de fermentação e é maior em raízes moídas que em inteiras.

AKINRELE (1964), encontrou elevada proporção de ácido láctico na polpa de mandioca fermentada durante o primeiro estágio da produção do gari, o que também já havia sido relatado por COLLARD & LEVI (1959), embora estes autores não tenham isolado bactérias

láticas. ABE & LINDSAY (1978) afirmam que os microrganismos responsáveis pela produção de ácidos orgânicos não são do gênero *Corynebacterium*, em função dos valores pH e acidez encontrados, como foi relatado por AKINRELE (1964), visto que a maioria das espécie de *Corynebacterium* oxida a glicose completamente a CO<sub>2</sub> e água.

Segundo CÁRDENAS & BUCKLE (1980), a análise da fermentação da fécula de mandioca (almidón agrio) produzido na Colômbia usando sistema de produção similar ao empregado para produção de polvilho azedo revelava produção de ácido acético, láctico e butírico.

OKAFOR et al. (1984) verificaram que apenas os *Bacillus* e *Corynebacterium* sp. eram capazes de macerar a mandioca e hidrolisar o amido. Segundo os autores, as bactérias do ácido láctico abaixam o pH do meio conferindo o aroma típico do foo-foo, mas não promovem a maceração. Por outro lado, somente o *Corynebacterium* sp. apresentava enzimas pectolíticas, sugerindo que os *Bacillus* sp. causaram maceração da mandioca por desintegração de outros componentes celulares.

Na fermentação da mandioca e seus sub-produtos para obtenção de diversos alimentos, os microrganismos mais frequentemente envolvidos são *Bacillus*, corinebactérias, coliformes, bactérias lácticas, leveduras e clostrídios (ALMEIDA et al., 1987; CEREDA, 1973; OYEWOLE & ODUNFA, 1988; OKAFOR et al., 1984; ADEGOKE & BABALOA, 1988; OYEWOLE & ODUNFA, 1990). Para a maioria dos



pesquisadores, durante as fases iniciais da fermentação da mandioca para obtenção do lafun, foo-foo e puba ou carimã, os microrganismos *Bacillus*, *Corinebactérias* e coliformes estão envolvidos na maceração. Para a fase seguinte, envolvendo a produção de odor, as bactérias lácticas, clostrídios e leveduras dominam o processo fermentativo.

Os processos fermentativos que utilizam a mandioca como matéria prima são, em geral, efetuados por meio de métodos artesanais e empíricos. A maioria desses processos é efetuada sem controle e frequentemente por períodos de tempo variáveis, através dos quais ocorrem alterações significativas da população microbiana (ALMEIDA et al., 1987; OKAFOR et al., 1984; OYEWOLE & ODUNFA, 1988; CEREDA, 1973; ADEGOKE & BABALOA, 1988).

Segundo STANTON & WALLBRIDGE (1969), o processo de fermentação natural de muitos alimentos envolve culturas mistas de microrganismos que se desenvolvem e se substituem adequadamente.

De acordo com SELLARS (1966), estudos conduzidos com cultura pura em fermentações, particularmente de vegetais, têm sido infrutíferos, porque não são desenvolvidos os métodos para eliminar microrganismos indesejáveis e permitir que as culturas puras se desenvolvam sem inibição competitiva.

Vários estudos da fermentação natural de pepinos mostram que a microbiota é complexa e altamente variável, notando-se com

frequência a presença de *Pediococcus cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus brevis*. ETCHELLS et al. (1964) aplicaram com sucesso a irradiação gama e choque térmico para eliminar a microflora indesejável da matéria prima, enfatizando que é importante a escolha correta das cepas fermentativas, pois determinados *P. cerevisiae* e *L. plantarum* dão melhores resultados que outros. Este fato provavelmente está relacionado com diferentes habilidades metabólicas apresentadas pelas diversas cepas de bactérias lácticas.

Segundo VAUGHN (1982), na fermentação de vegetais, o emprego de sal, açúcar, cultura iniciadora, controles da temperatura e pH, bem como manutenção de condições anaeróbias são fundamentais para melhorar a qualidade dos produtos finais.

De acordo com SELLARS (1966), para preparação de inóculos de culturas lácticas com mais de uma cepa, é necessário considerar fatores como compatibilidade entre elas ou entre as espécies, resistência à infecção bacteriofágica e a antibióticos, desenvolvimento uniforme de ácido e aroma, produção de  $\text{CO}_2$  e acumulação de metabólitos para produção de cor, aroma e textura final dos produtos.

ALMEIDA et al., (1987) estudando a fermentação da puba, verificaram que o processo fermentativo pode ser acelerado empregando-se em vez das raízes inteiras, pequenos fragmentos colocados em água a temperaturas próximas de 30°C. Por outro lado, a renovação da água melhora o aspecto da puba mas parece

não afetar a velocidade do processo. No mesmo trabalho, os autores verificaram que era possível reduzir o período da fermentação de 96 horas para 48 horas, empregando inóculo constituído de líquido de uma fermentação anterior.

## **2.2. CARACTERIZAÇÃO TECNOLÓGICA DA MANDIOCA**

De acordo com GRACE (1977), As análises de produtos da mandioca consistem em um grupo de testes selecionados para caracterização e possibilidade de utilização dos mesmos. As análises compreendem determinações químicas, tais como umidade, fibras, carboidratos e cinzas, assim como testes físico-químicos para medidas de viscosidade e acidez. Os testes para determinar a qualidade da fécula de mandioca incluem a determinação da granulometria, cor, transparência, viscosidade da pasta a quente e a frio. Outros testes são necessários para avaliação da qualidade do produto, como análises microbiológicas e determinação da vida de prateleira.

### **2.2.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA**

A composição física e química das raízes de mandioca apresenta grande variação, afetando também os seus derivados. De acordo com GRACE (1977) a composição média percentual da mandioca é a seguinte: umidade 70,25; amido 21,45; açúcares 5,13; proteínas 1,12; gordura 0,41; fibras 1,11 e cinzas 0,54. O mais alto valor de proteínas foi relatado por ANON apud OKE (1968)

como sendo de 1,3 %. Esses valores são obtidos pela multiplicação do conteúdo em nitrogênio por um fator (6,25) e provavelmente não representam com muita exatidão o teor de proteínas. Dessa forma a mandioca é uma fonte pobre em proteínas e deficiente em aminoácidos sulfurados segundo JONES apud OKE (1968).

Muito embora a puba seja largamente empregada no nordeste, na produção de bolos, mingaus, cuscús, biscoitos, etc., CORREA (1970), são poucos os estudos efetuados para caracterizar as propriedades físicas, físico-químicas e químicas. De acordo com a Universidade Federal da Bahia (1974), os constituintes químicos da puba variam ligeiramente com o período de maceração das raízes. Naquele relatório, tomando-se um período de 10 dias de maceração, a composição química da puba apresentou os seguintes resultados percentuais: amido (82,74), umidade (10,01), açúcares não redutores (5,05), fibras (1,47), resíduos minerais (0,32), proteína bruta (0,24) e gordura (0,17). Produtos africanos obtidos por fermentação da mandioca apresentam elevado teor de amido, da ordem de 80-95%, bem como baixos teores de fibras e substâncias tóxicas, conforme OKE (1968). AKINRELE (1964) relata elevados teores de ácidos orgânicos, diacetil e ésteres em produtos desse tipo.

### 2.2.2. TOXICIDADE DA MANDIOCA

Conforme GRACE (1977), para consumo "in natura", algumas variedades de mandioca não são aconselháveis, pois apresentam altos teores de glicosídeos cianogênicos (97 % de linamarina e

cerca de 3 % de lotaustralina), os quais, em presença da enzima linamarase liberam ácido cianídrico que causa envenenamento ao homem e animais.

Para GRACE (1977), todas as variedades de mandioca contém esse composto, entretanto, nas variedades ditas mansas, a quantidade de HCN é menor (0,001 a 0,010 %), enquanto que nas variedades bravas esse teor varia de 0,15 a 0,30 %. De acordo com CORREA (1947), nos produtos industrializados brasileiros, o HCN não representa problema para a alimentação humana, pois é eliminado junto com os efluentes das lavagens e prensagens ou durante a secagem e, até mesmo na posterior torração do produto (farinha de mandioca torrada). Em geral, as mandiocas bravas são preferidas nas indústrias de transformação por apresentar alto teor de amido, relata CIACCO & CRUZ (1982). Segundo GRACE (1977), o conteúdo de glicosídeo cianogênico na mandioca é influenciado pelo tipo de solo. Solos secos e deficientes em potássio dão origem a plantas de mandioca com elevado teor do glicosídeo. A hidrólise do glicosídeo pela enzima endógena pode ser acelerada por embebição das raízes em água, seccionamento ou aquecimento. GRACE (1977) relata que o conteúdo de ácido cianídrico varia pouco em diferentes raízes de mandioca de uma mesma plantação, mas varia consideravelmente em raízes obtidas de locais diferentes.

### 2.2.3. PROPRIEDADES VISCO-AMILOGRÁFICAS DE PRODUTOS DE MANDIOCA

Segundo CIACCO & CRUZ (1982), as propriedades das pastas de amido são de interesse na maioria das aplicações industriais. Na indústria alimentícia a temperatura de gelatinização, poder de inchamento, viscosidade e estabilidade da pasta sugerem a melhor utilização dos produtos amiláceos. Em determinados produtos, o amido é utilizado como estabilizante de emulsão e, nesse caso é necessário usar um amido que tenha temperatura de gelatinização menor que a temperatura de cocção do produto.

Segundo MAZURS et al. (1957) o visco amilógrafo Brabender é muito utilizado para mostrar as alterações na consistência que ocorrem durante a formação de pasta, cozimento e resfriamento de sistemas aquosos de amido. O amido de mandioca origina pico de viscosidade máxima moderado, mesmo em baixas concentrações (5 %), e os grânulos expandidos são mais facilmente rompidos por agitação mecânica, a temperatura de 95°C.

De acordo com CIACCO & CRUZ (1982), a temperatura de gelatinização do amido depende do tipo e grau de associação intermolecular existente entre os componentes do mesmo. O aumento da solubilidade com a gelatinização é a base para a confecção de alimentos amiláceos pré-elaborados. As farinhas de cereais pré-gelatinizadas são parcialmente solúveis em água fria, o que facilita o preparo de certos alimentos como por exemplo, pudins, purê de batata, polenta, cuscús, dentre outros. O amido de cereais nativos tem maior tendência à retrogradação que as

féculas de raízes e tubérculos. Em alimentos como pães, molhos e pudins, a ocorrência da retrogradação é indesejável e deve ser evitada. Determinados processos químicos podem modificar o comportamento dos amidos, em relação à retrogradação. Segundo os mesmos autores, o amido modificado por ácidos apresenta baixa viscosidade a quente, entretanto, a capacidade de geleificação deste amido não é afetada pelo ácido na mesma proporção que o é a viscosidade a quente. Essa característica propicia pastas com baixa viscosidade durante a cocção o que é desejável e géis firmes durante o resfriamento.

#### **2.2.4. CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS**

Durante a obtenção da puba há que considerar o aspecto higiênico sanitário, pois de acordo com GRAVATÁ (1940), no sistema rotineiro de fermentação as raízes são imersas em águas não tratadas e em seguida são submetidas a processos manuais até a sua comercialização. Muito embora a puba apresente pH em torno ou abaixo de 5,0, é conveniente lembrar que no início da fermentação há participação de enterobactérias, conforme ALMEIDA et al. (1987). Alimentos submetidos a esse tipo de processamento devem ser analisados microbiologicamente para avaliação de sua qualidade conforme APHA (1976), tendo em vista as oportunidades de contaminação, que segundo FRAZIER (1978), poderão introduzir microrganismos do solo, água, utensílios, superfícies e mãos de manipuladores. As precárias condições de processamento, conservação e comercialização podem se refletir nas propriedades tecnológicas da puba, na sua vida útil e eventuais riscos aos

consumidores.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes químicos tais como ácidos, bases, sais minerais, solventes, carboidratos e indicadores de pH, comercializados pela Merck, Riedel, Carlo Erba, Reagen, Difco, Ecibra ou equivalente, apresentavam pureza analítica desejável.

Equipamentos utilizados:

- Estufas incubadoras de BOD, modelo 346 da FANEM.
- Estufas bacteriológicas, FANEM.
- Estufa a vácuo, FANEM.
- Contador de colônias, Helidge.
- Espectrofotômetro Coleman, modelo 295.
- Potenciômetros Além Mar e Metron.
- Cromatógrafo a gás CG 500, Master.
- Processador CG 300.
- Cromatógrafo líquido, modelo UV.50 da Varian.
- Integrador HP-3396A.
- Jarras de Anaerobiose da Difco e BBL.

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, em Salvador, simulando os sistemas empregados por produtores rurais do recôncavo baiano.

A água utilizada foi coletada em fazendas da região de Santo Antônio de Jesus, de onde também provinham as raízes de mandioca.

As análises visco-amilográficas foram realizadas no Ital; as cromatográficas no CPQBA/UNICAMP; A esterilização dos fragmentos de mandioca realizou-se na PLASCALF em Feira de Santana, Bahia. A análise sensorial foi realizada na FEA/UNICAMP.

### **3.1. FERMENTAÇÃO NATURAL DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE PUBA**

#### **3.1.1. MICROBIOTA**

**3.1.1.1. Fermentação natural, coleta e preparo das amostras -**  
Amostras de aproximadamente 8 kg de raízes de mandioca da variedade Cigana ou Corrente, de 8-12 meses de cultivo, foram descascadas, lavadas, fragmentadas e colocadas em recipiente de alumínio, tipo "panelão" de 20 litros. O preparo das raízes foi efetuado por pessoas acostumadas a produzir puba. Os fragmentos de mandioca foram embebidos em água, até cobri-las e incubadas a temperatura ambiente (26 a 34°C) em sistema similar ao utilizado por produtores rurais do recôncavo baiano.

**3.1.1.2. Amostragem -** Amostras do líquido de 10 fermentações foram coletadas, assépticamente, desde 0 horas e a intervalos de 24 horas até o final de cada fermentação, que durou, no máximo, 72 horas. As amostras de cerca de 20 ml foram coletadas com auxílio de pipetas estéreis e colocadas assepticamente em tubos de vidro com tampa de rosca, esterilizados. Eram imediatamente analisadas, ou colocadas em refrigeração por um período não superior a três horas, a partir da coleta, até serem analisadas

microbiologicamente.

3.1.1.3. Contagem e isolamento dos microrganismos - após homogeneização as amostras foram submetidas às diluições decimais em série, em água peptonada 0,1 % segundo APHA (1976). As alíquotas foram plaqueadas conforme o grupo microbiano que se pretendia enumerar, nos diferentes meios de cultura relacionados a seguir: - Contagem total de aeróbios, agar BHI (Difco); - agar seletivo para corinebactérias (Merck); - agar MacConkey (Difco) com 2,0 % de agar; - agar azida (Difco); - agar MRS (Merck); - agar RCM (Difco); agar batata dextrose (Difco). As placas foram inoculadas em duplicata com diluições que variaram de  $10^0$  a  $10^9$  de acordo com o período da fermentação e meio de cultura empregado.

Para as contagens de aeróbios totais e de bolores e leveduras seguiram-se as recomendações da APHA (1976). Para isolamento e contagem das bactérias lácticas as placas foram incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  em microaerofilia através do método da substituição da atmosfera com uma mistura gasosa constituída de 5 % de oxigênio, 5 % de anidrido carbônico e 90 % de nitrogênio, segundo HOLDMAN et al. (1977). As colônias foram contadas após 48 horas de incubação. Para os clostrídios, as placas foram incubadas em anaerobiose, pelo método de substituição da atmosfera segundo HOLDMAN et al (1977), a  $30^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Para cultivo das demais bactérias a incubação das placas foi efetuada a  $30^{\circ}\text{C}$ , em aerobiose por 48 horas.

Após incubação, as colônias nos meios eletivos e seletivos foram diferenciadas com base na morfologia e as contagens foram feitas para os diferentes tipos de colônias. Cerca de 10 % das colônias, nunca menos de 3 (MOSSEL & QUEVEDO, 1967) de cada placa foram transferidas para caldo BHI (Difco) ou caldo MRS (Merck). As colônias suspeitas de serem clostrídios foram transferidas para caldo tioglicolato. As culturas foram incubadas a 30°C por 24 a 48 horas, mantidas em refrigeração ou imediatamente submetidas aos testes para caracterização. Quando necessário as culturas eram purificadas nos respectivos meios de isolamento e condições de incubação adequadas e então eram novamente transferidas para os meios líquidos.

3.1.1.4. Caracterização, identificação e classificação - As culturas em meio líquido foram submetidas a exames da morfologia das células, arranjo e motilidade por microscopia em montagem úmida, reação ao Gram, confirmada pelo método do KOH, coloração de esporos, segundo RYU (1979). Para efeito da confirmação das contagens, os isolados bacterianos foram submetidos aos seguintes testes:

Para os isolados bacterianos em forma de cocos, Gram-positivos realizaram-se as provas de catalase, e pesquisa do tipo de fermentação através da inoculação em meio de Gibson, segundo HARRIGAN & McCANCE (1966). Os cocos em tétrades foram, além disso, inoculados em caldo MRS, incubados a 30°C por 24 horas e submetidos a verificação do pH final por meio de potenciômetro.

Os cocos que apresentavam reação positiva a prova da catalase foram submetidos ao teste de benzidina de acordo com HARRIGAN & McCANCE (1966).

Para os bacilos Gram-positivos não esporulados foram realizadas as provas de catalase, segundo HARRIGAN & McCANCE (1966).

Para os bacilos Gram-positivos esporulados foram efetuadas reações de catalase, conforme acima e verificação do crescimento em anaerobiose, segundo método de HOLDEMAN et al. (1977) e em aerobiose em meio de agar RCM incubados a 30°C por 48 horas.

Para os bacilos Gram-negativos que apresentaram crescimento em agar MacConkey, realizaram-se as provas de oxidase e fermentação de glicose segundo COLLINS & LYNE (1985).

Os isolados bacterianos foram classificados empregando a chave dicotômica mostrada na Figura 2, construída a partir do esquema proposto por AYRES et al. (1980) e de dados extraídos dos Manuais de Bergey (BUCHANAN & GIBBONS, 1974; KRIEG & HOLT, 1984 e SNEATH ET AL., 1986).

Representantes dos isolados, de acordo com as características apresentadas previamente, foram submetidos a identificação através de testes bioquímicos complementares, conforme descritos a seguir:

Para verificação do crescimento em pH 9,0, inoculou-se o meio de BHI ou MRS, cujo pH havia sido ajustado para 9,0. O crescimento foi analisado após incubação a 30°C por 48 horas.

O crescimento em cloreto de sódio foi verificado em caldo BHI ou MRS adicionado de 6,5 % de cloreto de sódio. O crescimento foi analisado após incubação a 30°C por 48 horas.

Os isolados foram analisados quanto ao crescimento em 10°C e 45°C, inoculando-se os caldos BHI ou MRS e procedendo-se a incubação a estas duas temperaturas por 48 horas.

Alguns isolados foram também analisados quanto ao crescimento nos meios de agar MacConkey, agar azida sódica e agar seletivo para corinebactérias, através da inoculação desses meios e incubação a 30°C por 48 horas.

A hidrólise da pectina foi verificada em meio MP-7, segundo APHA (1976).

Para verificação da utilização de pectina como única fonte de carbono, preparou-se o meio de citrato de Simmons, substituindo-se o citrato de sódio pela pectina cítrica. O crescimento foi analisado após incubação a 30°C por 48 horas.

Também foram analisadas as características de crescimento em meio de leite tornassolado e meio de Gibson, segundo HARRIGAN & McCANCE (1976);

As provas de fermentação de carboidratos foram efetuadas segundo COLLINS & LYNE (1985).

Para verificação dos testes de crescimento nos meios de KCN, citrato de Simmons, hidrólise da gelatina, amido e uréia, reações em TSI, produção de indol, testes de oxidação e fermentação de glicose, provas de vermelho de metila e Voges Proskauer, produção de fenilalanina desaminase, utilizaram-se as técnicas recomendadas por HARRIGAN & McCANCE (1966).

Para caracterização e identificação dos bolores e leveduras foram empregados métodos recomendados por HARRIGAN & McCANCE (1966).

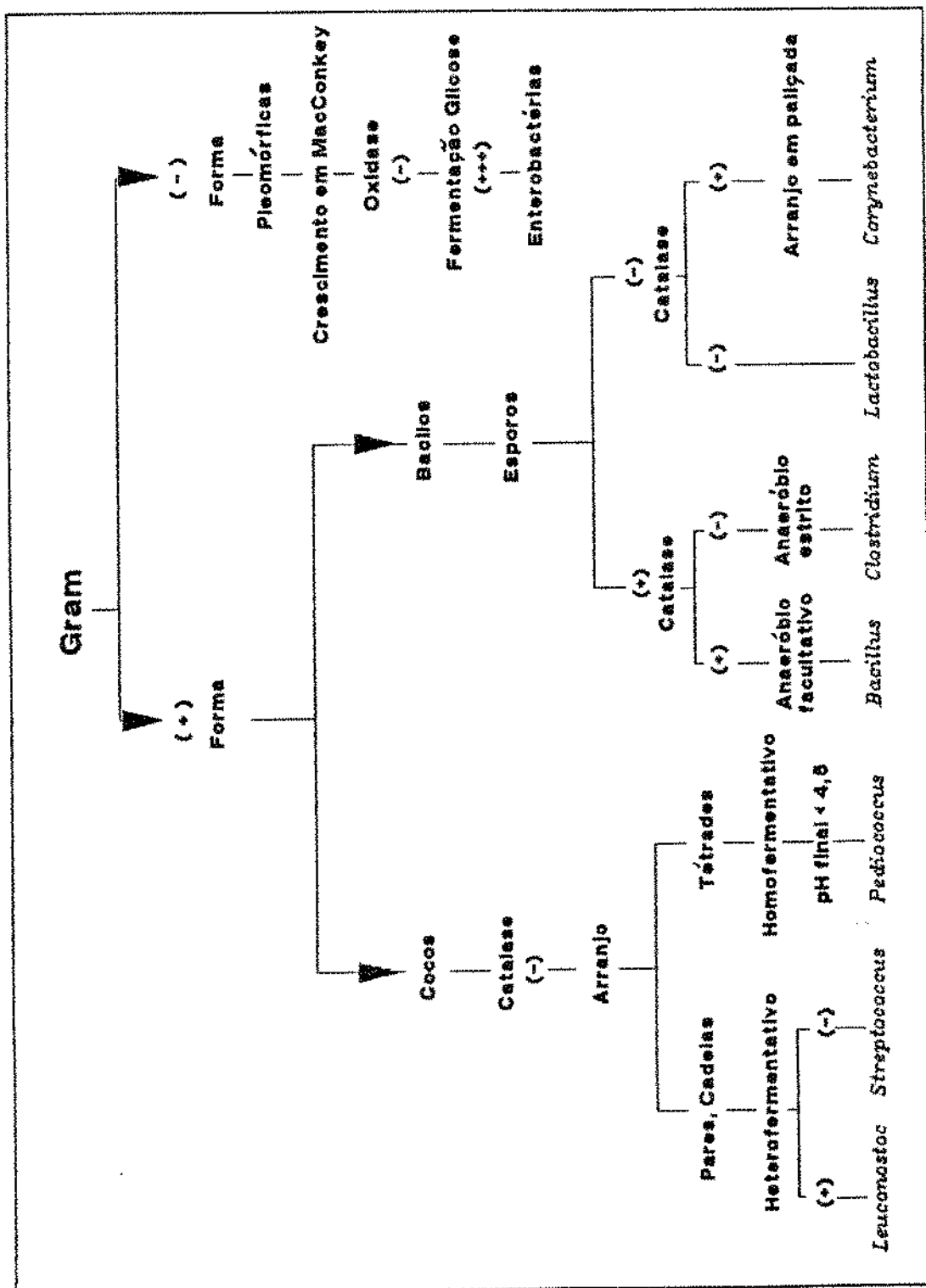


Figura 2. Chave simplificada para classificação de alguns gêneros de bactérias (Modificado de AYRES, et al., 1980, *Manuais de Bergey* 1974, 1984, 1986).



### 3.1.2. DETERMINAÇÕES FÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICAS, QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

3.1.2.1. Acidez titulável e pH - foram determinadas conforme técnicas descritas em AMERINE & OUGH (1980). A acidez foi expressa em porcentagem de ácido láctico.

3.1.2.2. Temperatura em °C - os processos fermentativos foram acompanhados registrando-se as temperaturas do líquido da fermentação, através da colocação de um termômetro, previamente desinfetado com álcool a 70 %, no líquido da fermentação às 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de iniciada a fermentação.

3.1.2.3. Determinação dos produtos metabólicos :

a) Determinação dos açúcares redutores - efetuada conforme método de Somogyi e Nelson, descrito por NELSON (1954);

b) Determinação da atividade dextrinizante - A atividade dextrinizante foi realizada pelo método de FUWA (1954) de acordo com PONGSAWASDI & YAGISAWA, (1987), conforme descrita por SABIONI (1991).

c) Determinação de ácido cianídrico - realizada pelo método de Liebig conforme adaptação de ANGELUCCI & MANTOVANA (1986);

d) Determinação dos ácidos orgânicos, álcoois e cetonas por cromatografia gasosa - amostras de 1,5 ul do líquido das

fermentações previamente filtrados em filtros de microporos de 0,22  $\mu\text{m}$ , foram injetados em coluna de vidro silanizado de 1,8 m de comprimento com 1/8" de diâmetro, contendo Porapak Q. As análises foram procedidas em um cromatógrafo a gás, marca CG 500 com detector de ionização de chama, acoplado a um processador (CG 300), em condições de fluxo contínuo de nitrogênio, ar e hidrogênio, com temperaturas de 175°C para a coluna, 234°C para o detector e 225°C para o vaporizador.

e) Determinação de ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência - para determinação dos ácidos láctico, butírico e acético, as amostras de 25  $\mu\text{l}$ , previamente centrifugadas a 11.000g e filtradas em filtros de microporos de 0,45  $\mu\text{m}$ , foram injetadas em coluna tipo Aminex HPX-87H com 300 mm de comprimento por 7,8 mm de diâmetro interno. As condições de operação incluíram temperatura da coluna de 40°C, fluxo de 1,0 ml de solução de ácido sulfúrico 0,013N por minuto, de acordo com método preconizado por LÁZARO et al. (1989). Estas análises foram efetuadas em um cromatógrafo UV50, marca Varian, ultra-violeta variável, acoplado a um integrador HP3396A e uma bomba marca Waters TA 6.000A.

## 3.2. ENSAIOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE PUBA SOB CONDIÇÕES DETERMINADAS

### 3.2.1. INFLUÊNCIA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

3.2.1.1. Preparo da matéria prima - Amostras de mandioca lavadas, descascadas e fragmentadas com cerca de 150 g, foram esterilizadas com óxido de etileno, nas seguintes condições: temperatura de 50°C, tempo de esterilização de 4 horas, umidade relativa 60 %, pressão da câmara de 0,5 a 1,0 Kg/cm<sup>2</sup>. Após a esterilização, os fragmentos foram assepticamente cobertos com 350 ml de água de córrego esterilizada a 121°C por 15 minutos.

3.2.1.2. Preparo do inóculo - O inóculo de 1,0 % foi constituído dos microrganismos *Klebsiella*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Candida* isolados em fase anterior, individualmente, em cultura líquida de 24 horas com cerca de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC (unidades formadoras de colônias)/ml.

Também foram realizadas fermentações empregando combinações de *Klebsiella/Clostridium*, *Klebsiella/Bacillus*, isolados ou associados com *Lactobacillus* sp. e/ou *S. faecalis*, mantendo-se o mesmo inóculo para cada cultura utilizada.

Todas as inoculações foram efetuadas no início da fermentação (0 hora). Esses microrganismos foram escolhidos porque se apresentavam na maioria das fermentações estudadas.

**3.2.1.3. Avaliação dos ensaios** - As fermentações foram acompanhadas por uma semana a intervalos regulares, de 24 horas, através de exames microscópicos, evolução do aroma e maceração das raízes.

### **3.2.2. INFLUÊNCIA DA FRAGMENTAÇÃO DAS RAÍZES**

Raízes de mandioca com cerca de 3 a 4 centímetros de diâmetro foram descascadas, lavadas e submetidas à fragmentação. Os processos estudados consideraram: raízes inteiras, raízes completamente trituradas em processador de alimentos (Walita) e raízes fragmentadas de modo a se obter cilindros de 5, 10, 20, 30 e 50 milímetros de comprimento. As amostras foram deixadas a fermentar naturalmente a temperatura ambiente ( $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). A fermentação foi acompanhada através da evolução do aroma e da maceração dos fragmentos das raízes de mandioca.

### **3.2.3. INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA**

Ensaio fermentativos foram realizados de maneira artesanal incubando-se os recipientes em temperaturas de 25, 26, 27, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 e 50 °C. A fermentação foi acompanhada conforme item 3.2.2..

### **3.2.4. INFLUÊNCIA DO pH**

Ensaio de fermentação natural foram realizados alterando-se os valores de pH inicial do líquido da fermentação para 6,5, 5,5,

5,0, 4,5, 4,0 e 3,0, através da adição de ácido tartárico. A fermentação foi acompanhada de acordo com o item 3.2.2.

### **3.2.5. INFLUÊNCIA DO MATERIAL DO RECIPIENTE**

Amostras fragmentos de raízes de mandioca foram fermentadas em recipientes tais como: béquer de vidro, balde de plástico, cocho de madeira, tanque de alvenaria, pote de cerâmica, balde de alumínio, balde de zinco e lata de flandres. O processo fermentativo foi seguido conforme item 3.2.2..

### **3.2.6. INFLUÊNCIA DA ANAEROBIOSE**

Amostras de fragmentos de raízes de mandioca foram postas a fermentar em jarras de Nalgene transparentes, cuja atmosfera foi substituída completamente por CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> através de envelopes de Gas-Pak (BBL). O ensaio foi acompanhado conforme item 3.2.2..

### **3.2.7. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE LÍQUIDO PRÉ-FERMENTADO COMO INÓCULO**

Amostras de mandioca foram postas a fermentar adicionando-se 10 % (v/v) do líquido da pré-fermentação realizada conforme item 3.1.1.1., com 12, 24, 36, 48 e 60 horas. Os ensaios foram acompanhados de acordo com o item 3.2.2..

### 3.2.8. INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SELETIVAS

Foram realizados experimentos com adição, às 0 horas da fermentação, das seguintes substâncias, em experimentos separados:

- Azida sódica a 0,02 %
- Desoxicolato de sódio a 0,15 %
- Cloreto de sódio nas concentrações de 1, 2, 3, 5, 10 e 15%
- Cloreto de sódio a 1 e 2 %, adicionados após 12 e 24 horas de iniciada a fermentação, respectivamente.

Para controle foram utilizadas as amostras de fragmentos de raízes de mandioca submetidas à fermentação natural.

Todos os experimentos foram acompanhados por exames microscópicos, evolução do aroma e maceração, mantendo-se o mesmo período em que o controle originava a fermentação típica da puba.

### 3.2.9. INFLUENCIA DO TRATAMENTO TÉRMICO

Amostras fragmentadas de mandioca, cobertas com água de córrego em erlemeyers, foram tratadas às temperaturas de 65 e 75°C por 5 minutos, através da imersão dos recipientes contendo as amostras, em banho-maria até atingir as temperaturas

indicadas. Após os tratamentos as amostras foram deixadas fermentar naturalmente. Os experimentos foram acompanhados por exames microscópicos, evolução do aroma e maceração, mantendo-se durante o mesmo período em que o controle originava a fermentação típica da puba.

### **3.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA, BIOQUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE PUBA COMERCIALIZADAS NO RECÔNCAVO BAIANO**

As amostras de puba ou carimã foram adquiridas em feiras-livres e mercados na cidade de Salvador, procedentes de regiões vizinhas (Lauro de Freitas, Alagoinhas, Feira de Santana, São Miguel das Matas, Santo Antônio de Jesus, Saubara, Mapele e Amargosa). As amostras foram adquiridas sob as formas úmida e seca.

Para as determinações químicas, físico-químicas, físicas e bioquímicas foram analisadas 25 amostras de puba úmida.

Para a pesquisa de ácido cianídrico foram analisadas 25 amostras de puba ou carimã, na forma úmida, sendo que uma delas foi proveniente do laboratório e as restantes de feiras-livres.

Para as análises microbiológicas foram utilizadas 25 amostras de puba úmida.

Procedimentos de Amostragem - após a coleta, as amostras foram transportadas ao laboratório e submetidas imediatamente às análises, ou guardadas sob refrigeração até o momento das análises, porém nunca ultrapassando 24 horas após a coleta.

Após a separação de porções para análise visual, determinação de pH, acidez titulável, poder diastásico, ácido cianídrico e vida de prateleira, o restante era seco a temperatura ambiente (máxima de 32°C e mínima de 26°C) e posteriormente em estufa a 105°C para realização das determinações químicas.

### **3.3.1. CARACTERÍSTICAS SENSORAIS DAS AMOSTRAS**

Uma vez adquiridas, as amostras eram submetidas a análises de cor, impurezas (pontos de contaminação) e odor.

### **3.3.2. VIDA DE PRATELEIRA**

As amostras úmidas, em duplicata, foram colocadas em frascos plásticos de polietileno com tampa rosqueável mantidas à temperatura ambiente e de refrigeração (4 a 7°C). A vida de prateleira foi seguida anotando-se diariamente as observações quanto às mudanças na coloração e odor característicos.



### **3.3.3. DETERMINAÇÕES FÍSICAS, FÍSICO-QUÍMICAS, QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS**

3.3.3.1. Umidade - as amostras de pupa foram secas em estufas Fanem a 105°C até peso constante, e foi determinada a umidade de acordo com AOAC (1960).

3.3.3.2. Cinzas - as amostras foram incineradas em mufla a 550°C e o teor de cinzas determinado de acordo com AOAC (1960)

3.3.3.3. Proteínas - As amostras previamente secas foram digeridas em digestor marca Quimis para determinação de proteínas pelo método semi-micro Kjeldahl da AACC 46-12(1962).

3.3.3.4. Extrato etéreo - amostras previamente secas foram submetidas à extração de lipídeos em extrator SOXLET, empregando éter de petróleo e éter etílico na proporção 1:1 como solventes, de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.3.3.5. Fibras - amostras secas e desengorduradas foram submetidas a extração de fibras pelo método de SCHARRER & KURSCHNER, conforme relatado por ANGELUCCI & MANTOVANA (1987).

3.3.3.6. Amido - amostras secas foram submetidas às hidrólises ácida e alcalina e tituladas com as soluções de Fehling segundo Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.3.3.7. Poder diastásico - foi determinado em amostras úmidas de acordo com o método da AACC 22-15 (1962).

3.3.3.8. Ácidos orgânicos - foram determinados em extrato aquoso de uma amostra de pupa seca, filtrada em microporos de 0,45  $\mu$ m, através de cromatografia líquida de alta eficiência de acordo com método de LÁZARO et al. (1989).

3.3.3.9. Ácido cianídrico - a determinação de ácido cianídrico foi realizada em amostras úmidas de acordo com o método de Liebig conforme adaptação de ANGELUCCI & MANTOVANA (1987).

3.3.3.10. pH - a determinação do pH, nas amostras úmidas, foi conduzida em potenciômetro marca Além Mar, com auxílio de soluções tampões de acordo com o método do Instituto Adolfo Lutz (1985).

3.3.3.11. Acidez titulável - determinada em extrato aquoso e alcoólico, de acordo com métodos do Instituto Adolfo Lutz (1985). Os resultados das análises de acidez aquosa e alcoólica foram expressos em porcentagem de hidróxido de sódio gastos para a titulação (v/p).

3.3.3.12. Análises visco-amilográficas - para esse estudo foram analisadas 11 amostras em aparelho visco-amilógrafo (Brabender) de acordo com método descrito por MAZURS (1957).

### 3.3.4. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As amostras foram colhidas em frascos estéreis e imediatamente transportadas ao laboratório para análises. De cada amostra foi retirada assepticamente uma alíquota de 50 g e homogeneizada em 450 ml de água peptonada estéril segundo APHA (1976). Alíquotas de diluições decimais foram plaqueadas, em duplicata, em meios específicos para as seguintes determinações: contagem total, contagem de psicrófilos, contagem de bactérias do grupo coliformes totais e fecais, contagem e isolamento de *Bacillus cereus*, contagem de bolores e leveduras conforme técnicas descritas no Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA, 1976).

### 3.3.5. APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DA PUBA

Uma amostra de puba com pH 4,5, acidez aquosa e alcoólica titulável de 1,0 e 0,31 %, respectivamente, e padrão amilográfico igual ao da amostra 11, mostrada na página 78, foi empregada para confecção de bolo de acordo com a seguinte formulação:

Cerca de 250 g de puba, 3 ovos inteiros, 250 ml de leite, 250 ml de açúcar e 200 ml de leite de côco constituíram os ingredientes para a preparação do bolo. Após a mistura de todos os ingredientes, a massa foi colocada em forno pré-aquecido e deixada por cerca de 30 a 40 minutos. Parte do leite de côco foi reservado para ser colocado sobre a massa durante o assamento.

A avaliação sensorial foi efetuada por pessoas sem treinamento especial, de diversas classes sociais, abrangendo 03 professores, 09 alunos e 08 funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas. Para avaliação do produto foi utilizado o método da Escala Hedônica Estrutural Nominal (9 pontos), de acordo com a ficha que se apresenta.

Nome \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_

Prove, por favor, a amostra e diga o quanto você gostou, usando a escala abaixo.

Amostra

---Gostei muitíssimo

---Gostei muito

---Gostei regularmente

---Gostei ligeiramente

---Indiferente

---Desgostei ligeiramente

---Desgostei regularmente

---Desgostei muito

---Desgostei muitíssimo

Comentários: \_\_\_\_\_

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. FERMENTAÇÃO NATURAL DA MANDIOCA PARA OBTENÇÃO DE BUBA

#### 4.1.1. MICROBIOTA

4.1.1.1. Contagens - As tabelas de 1 a 5 mostram as contagens dos microrganismos durante as 10 fermentações analisadas. Os anexos de 1 a 10 mostram a distribuição das contagens dos microrganismos por meio de cultura empregado.

Analisando as diversas fermentações foram obtidos resultados muito variados. Há fermentações em que no início (0 hora), vários microrganismos estavam presentes, em diferentes proporções. Os organismos dos Gêneros *Erwinia*, *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* encontravam-se em números elevados e crescentes durante as primeiras 24 horas da fermentação. Posteriormente, as contagens dos Gêneros *Erwinia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Corynebacterium* reduziram gradualmente, até não serem mais detectados no 3º dia da fermentação. Os lactobacilos e estreptococos, que apareceram em números elevados a partir do 2º dia da fermentação, juntamente com os leuconostocos, persistiram até o fim da mesma. As leveduras que estavam presentes desde o início da fermentação, foram se desenvolvendo lentamente até formarem uma película sobre o meio, às 72 horas da fermentação (TABELA 1).

Tabela 1. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba (Fermentações 1 e 2)

Período (horas)	Fermentação 1				Fermentação 2			
	0	24	48	72	0	24	48	72
Microorganismos (log UFC/ml)								
Enterobactérias	2,7	6,5	4,3	0	4,0	6,5	5,5	1,9
Corinebactérias	2,1	5,6	1,2	0	2,1	4,1	1,2	0
<i>Bacillus</i> spp.	3,3	-	-	-	3,5	-	-	-
<i>Clostridium</i> spp.	2,6	-	-	-	3,9	5,9	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	2,1	7,1	8,5	3,1	1,7	6,6	7,1	6,2
<i>Pediococcus</i> spp.	-	-	-	-	2,8	6,2	6,7	6,5
<i>Leuconostoc</i> spp.	2,3	7,2	8,8	8,1	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	1,0	6,3	9,5	10,0	3,6	6,1	7,6	9,6
Leveduras	1,0	1,7	3,5	6,1	2,7	4,4	4,8	5,6
Contagem total	3,5	7,6	9,0	9,4	4,4	7,8	8,3	9,0

- Não quantificado

Durante este trabalho, na fermentação 2, os *Pediococcus*, substituíram quantitativamente os *Leuconostoc* durante todo o processo fermentativo (TABELA 1). Nesta fermentação os *Bacillus* foram quantificados apenas às 0 horas da fermentação e os clostrídios às 0 e 24 horas de iniciada a mesma.

Os pediococos foram quantificados em apenas duas fermentações (TABELAS 1 e 5).

Em outra fermentação, a de número 3 (TABELA 2), juntaram-se aos organismos citados anteriormente espécies de *Bacillus*, com relativo decréscimo das enterobactérias e corinebactérias. Nesta fermentação não foram quantificados clostrídios.

Na quarta fermentação (TABELA 2), os clostrídios, enterobactérias, estreptococos e lactobacilos apareceram desde o início e paulatinamente as contagens foram aumentando até as 48 horas, para em seguida decrescerem, ligeiramente, ao final da mesma.

De acordo com os dados da TABELA 3, na quinta fermentação as contagens de enterobactérias, corinebactérias e leveduras apresentaram-se similares às da primeira fermentação, até as 48 horas, mas persistiram ainda ao final da mesma. Os *Bacillus* e clostrídios foram quantificados apenas no início da fermentação. As contagens de estreptococos, leuconostocos e lactobacilos, a exemplo da maioria das fermentações, foram progressivamente aumentando até o final da fermentação.



Tabela 2. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba (Fermentações 3 e 4).

Período (horas)	Fermentação 3				Fermentação 4			
	0	24	48	72	0	24	48	72
Microorganismos (log UFC/ml)								
Enterobactérias	2,4	4,9	4,7	2,8	2,8	6,6	6,6	6,5
Corinebactérias	1,6	2,0	2,5	1,2	3,3	4,4	1,3	2,2
<i>Bacillus</i> spp.	5,6	5,9	5,7	5,6	3,4	-	-	-
<i>Clostridium</i> spp	-	-	-	-	4,3	4,6	6,7	5,9
<i>Streptococcus</i> spp.	2,9	3,1	5,9	5,1	2,8	6,4	9,1	6,3
<i>Pediococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc</i> spp.	1,6	4,5	4,5	5,0	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.	5,5	7,1	8,1	9,7	4,3	9,6	9,0	8,7
Leveduras	3,4	6,2	4,2	3,3	3,0	2,3	2,2	0
Contagem total	5,8	7,1	8,3	10,0	4,4	7,7	8,4	8,9

- Não quantificado

Para a sexta fermentação (TABELA 3), verifica-se um aumento progressivo das contagens de corinebactérias, enterobactérias, estreptococos, leuconostocos e lactobacilos.

As fermentações 7 e 9 encerraram-se após 48 horas (TABELAS 4 e 5).

A contagem de corinebactérias e leveduras, na sétima fermentação (TABELA 4), é relativamente baixa e similar, do início ao fim do processo. Nesta fermentação, as contagens de estreptococos, leuconostocos e lactobacilos também aumentaram, progressivamente, até predominarem ao final da mesma.

Na oitava fermentação, surpreendentemente, as enterobactérias apresentaram-se em contagens elevadas durante toda a duração da mesma (TABELA 4). Nas outras fermentações as contagens destes organismos, bem como das corinebactérias e leveduras foram relativamente similares e, de modo geral, baixas. Nesta fermentação os clostrídios predominaram, sem afetar a população das bactérias lácticas.

Na fermentação de número 9, foram quantificados todos os organismos relatados, com exceção dos clostrídios (TABELA 5). As contagens de todos os microrganismos aumentaram durante toda a fermentação.

Para a décima fermentação (TABELA 5), foram quantificados enterobactérias, corinebactérias, estreptococos, lactobacilos e

Tabela 3. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba (Fermentações 5 e 6).

Período (horas)	Fermentação 5				Fermentação 6			
	0	24	48	72	0	24	48	72
Microorganismos (Log UFC/ml)								
Enterobactérias	2,1	4,2	4,0	1,2	1,3	3,9	3,8	4,5
Corinebactérias	5,6	4,3	4,0	4,5	3,5	5,4	6,5	7,5
<i>Bacillus</i> spp.	4,2	-	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium</i> spp.	4,9	-	-	-	3,9	6,7	8,5	8,5
<i>Streptococcus</i> spp.	3,7	8,5	8,9	9,0	2,9	8,5	9,0	9,0
<i>Pediococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc</i> spp.	3,3	7,2	8,0	8,1	2,6	6,8	7,5	7,8
<i>Lactobacillus</i> spp.	2,0	7,8	7,2	7,9	2,8	7,5	8,9	9,3
Leveduras	2,6	3,5	3,5	3,2	3,4	3,6	3,2	3,7
Contagem total	6,9	8,3	8,9	10,0	4,5	8,7	8,8	9,0

- Não quantificado

Tabela 4. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba (Fermentações 7 e 8)

Período (horas)	Fermentação 7*			Fermentação 8			
	0	24	48	0	24	48	72
Microorganismos (Log UFC/ml)							
Enterobactérias	3,2	5,3	4,6	7,3	7,4	7,8	7,4
Corinebactérias	2,2	3,0	3,3	3,2	4,1	3,6	3,2
<i>Bacillus</i> spp.	3,0	-	-	4,5	-	-	-
<i>Clostridium</i> spp.	2,4	3,0	6,8	5,0	6,0	11,0	10,5
<i>Streptococcus</i> spp.	3,3	6,0	6,8	3,8	8,5	9,0	8,4
<i>Pediococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-
<i>Leuconostoc</i> spp.	2,8	5,6	8,0	3,0	5,4	7,8	8,0
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,3	6,0	9,1	4,0	9,6	8,9	8,4
Leveduras	1,5	3,1	3,2	3,1	2,8	2,8	0
Contagem total	4,5	6,1	9,0	6,5	9,5	9,7	9,0

\*Fermentação finalizou às 48 horas

- Não quantificado

Tabela 5. Microbiota da fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba (Fermentações 9 e 10)

Microorganismos (Log UFC/ml)	Fermentação 9*			Fermentação 10				
	Período (horas)	0	24	48	0	24	48	72
Enterobactérias		1,4	1,7	4,5	4,0	3,0	3,5	1,2
Corinebactérias		3,1	5,4	6,5	5,2	4,2	3,8	3,0
<i>Bacillus</i> spp.		3,1	6,8	6,6	-	-	-	-
<i>Clostridium</i> spp.		-	-	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.		2,2	8,0	8,4	4,3	8,0	8,7	9,0
<i>Pediococcus</i> spp.		2,5	8,4	8,5	-	-	-	-
<i>Leuconostoc</i> spp.		3,2	6,3	7,3	-	-	-	-
<i>Lactobacillus</i> spp.		2,8	7,5	7,5	4,5	7,5	7,6	7,9
Leveduras		3,4	3,6	3,8	4,0	3,5	3,6	3,2
Contagem total		4,5	8,9	8,9	6,8	8,0	8,3	8,9

\*Fermentação finalizou às 48 horas.

- Não quantificado

leveduras. Os microrganismos predominantes ao final do processo fermentativo foram os estreptococos e lactobacilos.

Muitos autores têm descrito a presença destes organismos em produtos fermentados da mandioca, como o polvilho azedo, CEREDA (1973), foo-foo, OKAFOR et al. (1984), lafun, OYEWOLE & ODUNFA (1988).

Segundo a literatura, o comportamento da microbiota das fermentações estudadas não ocorre com frequência em outras fermentações da mandioca. ADEGOKE & BABALOA (1988) citam a sucessão de microrganismos durante a fermentação do foo-foo: no início estavam presentes os estafilococos, 24 horas após predominaram *Klebsiella oxytoca* e *Bacillus subtilis*, e às 48 horas apareceram *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus polymyxa* e *Saccharomyces cerevisiae*. Com 72 horas de fermentação permanece a levedura e surge o *Lactobacillus fermentum*.

De acordo com OYEWOLE & ODUNFA (1988), as alterações microbianas na fermentação do lafun mostram, nos estágios iniciais, os organismos dos Gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. A população de *Bacillus* decresce drasticamente com a continuação da fermentação. Leveduras identificadas como *Candida*, aparecem entre 24 e 48 horas do início da fermentação e persistem, junto com as bactérias lácticas, até o fim da mesma. A população microbiana atinge níveis de cerca de  $10^{13}$  UFC/g após 72 horas da fermentação.

Convém mencionar que em determinadas fermentações algumas linhagens de enterobactérias eram substituídas por outras, sendo que a espécie predominante era *Klebsiella oxytoca* (TABELA 9). Todavia, a população de bactérias da família Streptococcaceae e lactobacilos era crescente, embora nem sempre tenha sido possível efetuar contagens de bactérias dos Gêneros *Leuconostoc* e *Pediococcus*.

Com algumas exceções, as leveduras mantiveram-se proporcionalmente similares às corinebactérias.

A TABELA 6 mostra os valores mínimos, médios e máximos da microbiota presente durante a fermentação da mandioca para obtenção de puba.

Análise dos resultados médios de 10 fermentações mostra que há uma certa distribuição uniforme entre os diversos Gêneros de bactérias (FIGURAS 3 e 4). No início da fermentação (0 hora) as enterobactérias, corinebactérias, cocos lácticos (incluindo enterococos), lactobacilos e leveduras são encontradas em níveis logarítmicos de 3,2 (13,9 %), 3,2 (13,9 %), 2,8 (12,2 %), 3,4 (14,8 %) e 2,7 (11,7 %), respectivamente. Nas fermentações em que os *Bacillus* e os clostrídios foram quantificados, as contagens médias situaram-se em 3,8 log (16,5 %) e 3,9 logs (17,0 %), respectivamente.

Após 24 horas de fermentação, a média da população de microrganismos expressa em logaritmo era a seguinte:

enterobactérias 5,1 (13,2 %), corinebactérias 4,2 (10,9 %), cocos lácticos 6,8 (18,3 %), lactobacilos 7,6 (19,7 %) e leveduras 3,5 (9,1 %). Quanto aos *Bacillus* e clostrídios as contagens situaram em 6,3 (16,3 %) e 5,1 (13,2 %), respectivamente.

As 48 horas, as contagens de enterobactérias e corinebactérias começaram a se reduzir para 4,8 (11,4 %) e 3,4 (8,1 %), respectivamente. Por sua vez, neste período os cocos lácticos e os lactobacilos apresentaram aumento para 7,7 (18,3 %) e 8,3 (19,8 %), respectivamente. As leveduras apresentaram ligeiro decréscimo 3,4 (8,1 %). Já os *Bacillus*, nas fermentações em que foram quantificados, apresentaram redução nas contagens para 6,1 e também decresceram percentualmente (14,5 %). Por sua vez, nas mesmas condições, os clostrídios cresceram para 8,3 logs (19,8 %).

Ao final do processo fermentativo (72 horas), a população de enterobactérias e corinebactérias continuou a decrescer para níveis de 2,6 (6,7 %) e 2,7 (7,0 %) enquanto os cocos lácticos reduziram para 7,0 logs (18,1 %), já os lactobacilos continuaram a crescer para 8,9 logs e, proporcionalmente, eram os organismos dominantes (23,0 %). As leveduras apresentaram contagens iguais ao período anterior (3,4) mas, proporcionalmente cresceram para 8,5 %. A população de *Bacillus* decresceu ligeiramente para 5,6 (14,5 %) e a de *Clostridium* cresceu para 8,5 log (22,0 %).



TABELA 6. Valores mínimos, médios e máximos da microbiota presente durante as 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Período (horas)	Microrganismos (log UFC/ml)									Contagem total
	Enterobacterias*	Corinebacterias	Bacillus spp.	Clostridium spp.	Streptococcus spp.	Pediococcus spp.	Leuconostoc spp.	Lactobacillus spp.	Leveduras	
0	1,3	1,6	3,1	2,4	1,7	2,5	1,6	1,0	1,0	3,9
	3,2	3,2	3,8	3,9	3,1	2,6	2,7	3,4	2,7	5,2
	7,3	5,6	5,6	5,0	3,8	2,8	3,3	5,5	4,0	6,9
24	1,7	2,0	5,9	3,0	3,1	6,2	4,5	6,0	1,7	6,1
	5,1	4,2	6,3	5,1	7,1	7,3	5,9	7,6	3,5	8,0
	7,4	5,6	6,8	6,7	8,5	8,4	7,2	9,6	6,2	9,5
48	3,7	1,2	5,6	6,7	5,9	6,6	4,5	7,2	2,2	8,3
	4,8	3,4	6,1	8,3	8,1	7,6	7,4	8,3	3,4	8,8
	7,8	6,5	6,6	11,0	9,1	8,5	8,8	9,5	4,8	9,7
72	0,0	0,0	5,6	5,9	3,1	6,5	5,0	7,6	0,0	8,9
	2,6	2,7	5,6	8,5	7,0	6,5	7,5	8,9	3,3	9,3
	7,4	7,5	5,6	10,5	9,0	6,5	8,1	10,0	6,1	10,0

\*Principalmente *Klebsiella* spp.

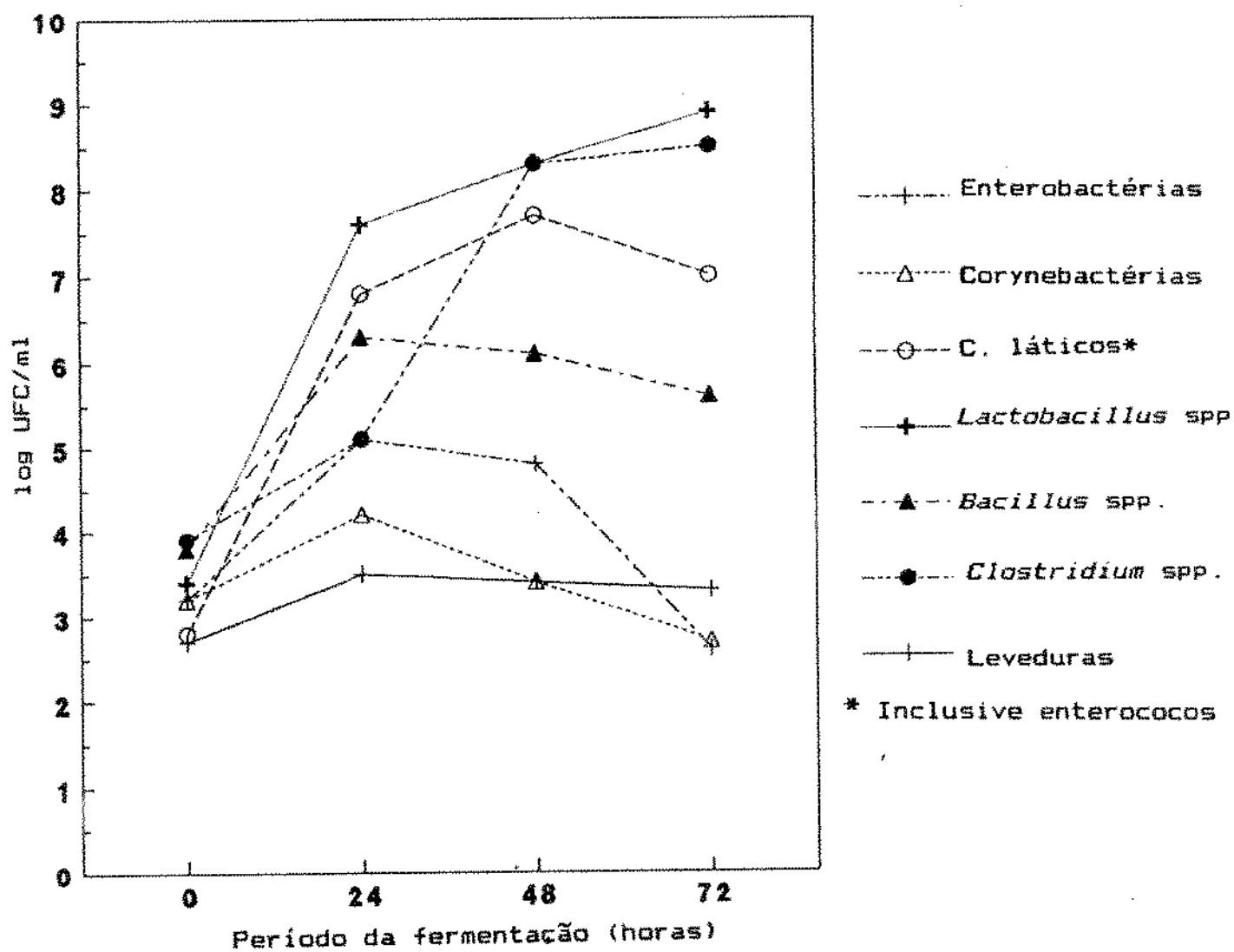


Figura 3. Valores médios da microbiota em 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba

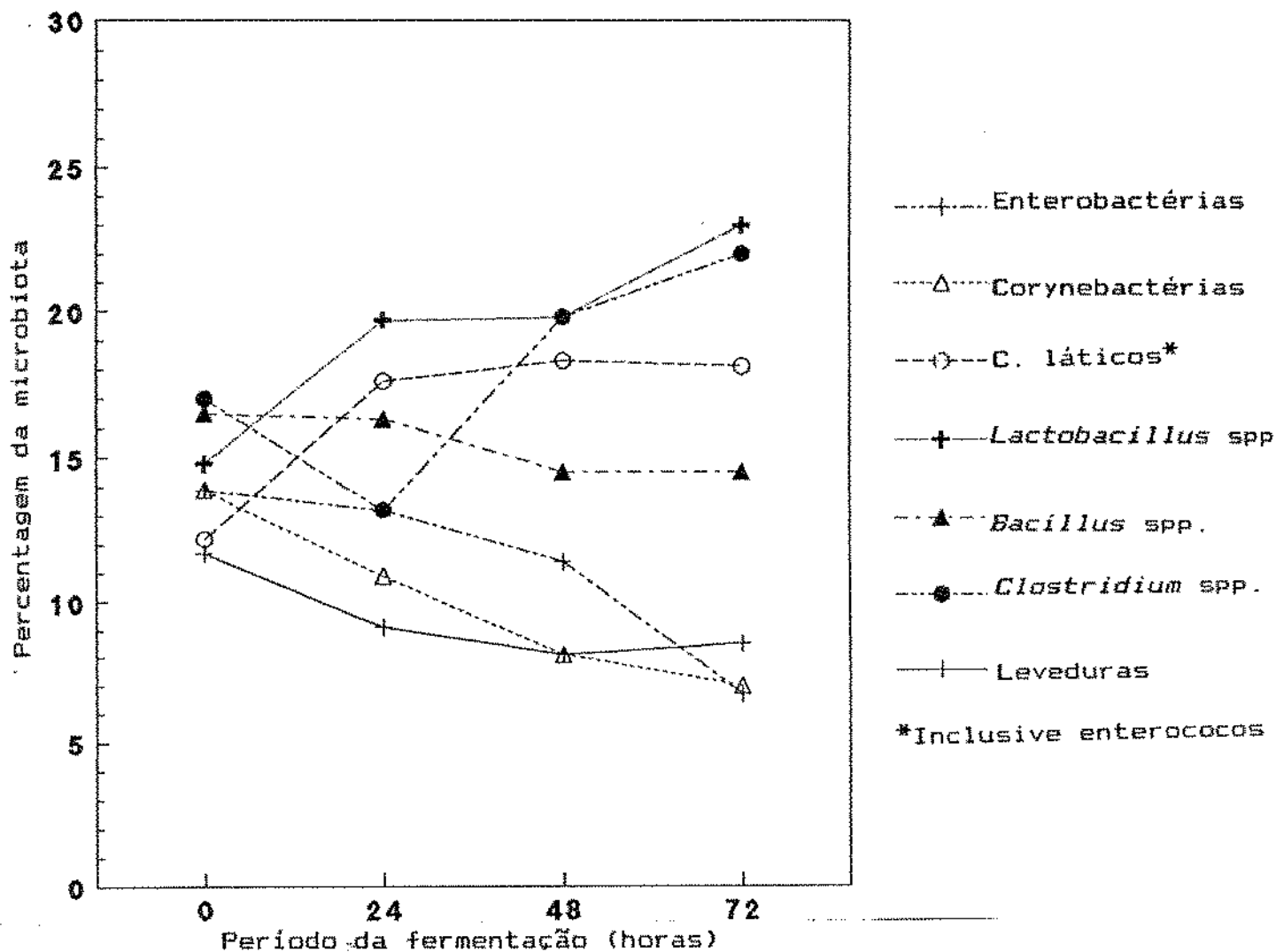


Figura 4. Participação percentual média da microbiota em 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba

2.1.1.2. Caracterização da microbiota - Durante a realização deste trabalho foram caracterizados 1.141 isolados bacterianos, empregando o esquema da FIGURA 2. Estes isolados apresentaram a seguinte distribuição: 163 enterobactérias, 142 corinebactérias, 45 *Bacillus*, 92 clostrídios, 231 estreptococos, 46 pediococos, 159 leuconostocos e 263 lactobacilos. Para a caracterização, identificação e classificação mais pormenorizada foi empregado um total de 120 isolados, conforme apresentado nas TABELAS 7, 8 e 9.

Os exames microbiológicos das 10 fermentações revelam a presença de uma ampla variedade de microrganismos, predominando as bactérias. Este fenômeno é verificado em muitos alimentos fermentados naturalmente (CEREDA, 1973). Também foram encontrados leveduras formadoras de película, *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Dentre as bactérias isoladas e identificadas, espécies dos Gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* ocorreram na maioria das fermentações analisadas, se bem que nem todos, como os *Clostridium*, *Bacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* puderam ser enumerados, em decorrência de contaminações, falhas no sistema de anaerobiose ou porque se encontravam em números mais baixos, sendo suplantados pelos demais.

Com exceção do *Clostridium* e *Pediococcus*, os organismos mencionados também já foram encontrados em produtos fermentados da mandioca, cujo sistema de produção é similar ao da puba ou carimã, como o foo-foo (OKAFOR et al., 1984; ADEGOKE & BABALOA,

1988) e o Iafun (OYEWOLE & ODUNFA, 1988). Por sua vez, CEREDA (1973), estudando a fermentação da fécula de mandioca para obtenção de povilho azedo isolou os mesmos microrganismos relacionados neste trabalho, com exceção dos Gêneros *Erwinia*, *Klebsiella* e *Corynebacterium*.

As características morfológicas, bioquímicas e culturais dos principais microrganismos isolados da fermentação da puba são mostradas nas TABELAS 7, 8 e 9.

Os organismos do Gênero *Fediococcus* foram divididos em dois grupos, com base na produção de "catalase" e crescimento a 10°C. Representantes dos dois grupos apareciam isolados ou simultaneamente na mesma fermentação. Atividade amilolítica discreta foi verificada em uma das cepas isoladas. Entre os estreptococos, foram isolados representantes de um grupo que apresentavam colônias azuis, pequenas em meio de azida sódica, eram amilolíticos e não fermentavam arabinose nem trealose, cresciam em agar MacConkey, em meios com pH 9,0 e em meios incubados a temperaturas de 10°C e 45°C, relacionados portanto aos enterococos, de acordo com dados do manual de Bergey, segundo HARDIE (1986). Membros de um outro grupo de estreptococos, por sua vez apresentavam colônias pequenas, translúcidas em meio de azida sódica e não eram amilolíticos, porém fermentavam a arabinose e a trealose (TABELA 7). Da mesma forma, representantes dos dois grupos de estreptococos encontravam-se isolados ou simultaneamente na mesma fermentação.

Os *Leuconostocos* apresentavam comportamento metabólico bastante homogêneo, porém algumas poucas linhagens cresciam em meios com pH 9, entre 10 e 45°C, e com 6,5 % de cloreto de sódio no meio de cultura. O padrão de fermentação de açúcares era similar ao apresentado pelos estreptococos amilolíticos, com exceção da produção de gás em meio de Gibson (TABELA 7). A ocorrência dos diferentes biotipos desses organismos variava entre as diversas fermentações.

Os lactobacilos apresentavam reações diferentes quanto ao comportamento fermentativo mostrado nos testes de VM, VP, rafinose, lactose, arabinose, xilose, mas todos fermentavam a glicose e trealose mas não a salicina (TABELA 8). Quanto a sua ocorrência nas diversas fermentações o comportamento foi o mesmo dos outros gêneros. Cerca de 15 isolados apresentavam comportamento bioquímico similar ao do *Lactobacillus plantarum*, de acordo com KANDLER & WEISS (1986).

As corinebactérias também apresentaram isolados com variação metabólica (TABELA 8). A maioria dos isolados produzia ácido em leite tornassolado, cresceu a 45°C, bem como promovia a hidrólise do amido, pectina, gelatina e uréia.

Os *Bacillus* apresentavam cepas que hidrolizavam a pectina e o amido, outras somente pectinolíticas ou amilolíticas e outras que não apresentavam aquelas propriedades (TABELA 8). Grande parte dos isolados não cresciam em anaerobiose. Em algumas fermentações foram isolados *Bacillus* que cresciam a 45°C mas não

a 10°C, amilolíticos, com intensa atividade sobre o leite tornassolado, apresentando dois biotipos, um pectinolítico e outro não pectinolítico.

Os organismos Gram negativos eram principalmente enterobactérias (TABELA 9), sendo que os organismos do gênero *Klebsiella* eram predominantes. Entretanto, haviam fermentações, em que foram encontradas enterobactérias móveis, não pectinolíticas, algumas amilolíticas, fermentadoras da sacarose, fenilalanina desaminase negativos e com vários padrões de fermentação verificados através das reações de VM (Vermelho de metila) e VP (Voges-Proskauer). Dos 31 representantes analisados foram identificados e classificados 15 *Klebsiella oxytoca*, 02 *Klebsiella pneumoniae* e 01 *Klebsiella ozanae*. Treze isolados apresentaram comportamento bioquímico variado, pertencendo provavelmente aos gêneros *Erwinia*, *Enterobacter* ou intermediários, de acordo com BRENNER (1984).

Tabela 7. Características de 44 isolados bacterianos em forma de cocos Gram positivos encontrados durante a fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Testes	Número de isolados testados									
	12	06	03	01	04	03	01	10	04	
Catalase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Benzidina	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	
VM/VP	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Red. NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Crescimento em:										
L. tornassolado	R	ACR	AR	AC	SA	R	R	A	SA	
Gibson (gás)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
A. MacConKey	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
A. azida	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
A. Telurito	ND	+	-	+	+	+	+	+	+	
Meios com										
pH 9,0	+	v	-	-	v	v	-	-	v	
100°C	+	-	-	-	-	+	-	-	v	
45°C	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
6,5 % NaCl	+	-	-	-	v	v	+	-	v	
Pectina como única fonte C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Hidrólise do amido	+	-	-	-	-	-	F	-	-	
Hidrólise de uréia	-	-	-	F	-	-	-	-	-	
Fermentação de:										
glicose	A	A	A	A	A	A	A	AG	AG	
manose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
frutose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
arabinose	-	A	A	A	-	-	-	A	-	
xilose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
galactose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
lactose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
maltose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
sacarose	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
trealose	-	A	A	A	A	A	A	A	-	
salicina	A	A	A	A	-	-	-	A	A	
Gênero provável	S*	S	S*	S	P	P	P	L	L	

Legenda: + positivo; - negativo; A ácido; AG ácido e gás; v variável ND não determinado; R redução; C coagulação; SA sem alteração; F fracamente positivo; VM vermelho de metila; VP Voges Proskauer; O/F oxidação/fermentação; S *Streptococcus* spp.; P *Pediococcus* spp.; L *Leuconostoc* spp.; S\* Enterococos.



Tabela B. Características de 45 isolados bacterianos em forma de bacilos Gram-positivos encontrados durante a fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Testes	Número de isolados testados							
	15	07	03	07	02	01	08	02
Catalase	-	-	-	+	+	+	+	+
Esporos	-	-	-	-	-	-	+	+
Motilidade	-	-	-	-	-	-	+	+
O/F	-/+	-/+	F/+	+/-	+/-	-/-	ND	ND
VM/VP	+/-	+/+	+/+	+/-	+/-	-/-	ND	ND
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-
Red. NO <sub>3</sub> a NO <sub>2</sub>	-	-	-	v	-	+	v	-
Crescimento em:								
Anaerobiose	+	+	+	F	-	-	v	+
L.tornassolado	AC	AC	AC	A	ACD	SA	ACD	ACD
Meios com								
pH 9,0	v	-	-	-	-	F	F	-
10°C	v	-	-	-	-	-	-	v
45°C	+	+	-	+	+	+	+	+
6,5 % NaCl	v	-	-	v	-	-	+	-
Pectina como única fonte C	-	-	-	+	-	-	-	-
Hidrólise de:								
amido	-	-	-	+	-	-	+	v
pectina	-	-	-	+	-	-	+	-
gelatina	-	-	-	+	+	-	ND	ND
uréia	-	-	-	+	+	-	ND	ND
Fermentação de:								
glicose	A	A	A	A	A	-	A	AG
arabinose	v	-	-	A	A	-	ND	ND
xilose	v	-	-	-	-	-	A	A
lactose	A	A	-	A	A	-	A	-
rafinose	A	A	-	-	-	-	-	-
trealose	A	A	A	-	-	-	-	-
salicina	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Gênero provável	L*	L	L	C	C	C	B	B

Legenda: + positivo; - negativo; A ácido; AG ácido e gás; v variável; ND não determinado; C coagulação; SA sem alteração, F fracamente positivo; VM vermelho de metila; VP Voges Proskauer; O/F oxidação/fermentação; L *Lactobacillus* spp.; C *Corynebacterium* spp. B *Bacillus* spp.; L\* possivelmente *L. plantarum*.

TABELA 9. Características de 31 isolados de enterobactérias encontrados durante a fermentação de raízes de mandioca para obtenção de puba

Testes	Número de isolados testados			
	01	02	15	13
Oxidase	-	-	-	-
Cápsula	-	+	+	-/+
Motilidade	-	-	-	+
Redução de nitratos	+	+	+	+/-
Gás glicose	+	+	+	+/-
Crescimento em:				
Citrato	+	+	+	+/-
Pectina	-	+/-	+	-/+
KCN	+	+	+	+/-
Reações em				
TSI	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG*
VM	+	-	+	+/-
VP	-	+	+	-/+
Lactose	+	+	+	+/-
Sacarose	+	+	+	+/-
Fenilalanina	-	-	-	-
Indol	-	-	+	-/+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-/+
Hidrólise de:				
Uréia	+	+	+	-/+
Amido	-	-/+	+	-/+
Organismos prováveis	<i>Klebsiella ozanae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacter/Erwinia</i>

Legenda: - negativo; + positivo; A ácido; AG ácido e gás; +/- maioria positivo; -/+ maioria negativo; TSI Tríplice açúcar e ferro; VM Vermelho de metila; \* Há outros resultados; VP Voges Proskauer.

#### 4.1.2. DETERMINAÇÕES QUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS E BIOQUÍMICAS

4.1.2.1. Acidez titulável e pH - A variação do pH do líquido das fermentações da puba apresenta-se na TABELA 10. A FIGURA 5 apresenta os valores mínimos, médios e máximos de pH. Como se pode observar, o pH que estava na faixa de 7,5 a 5,8 decresceu para cerca de 5,7 a 3,6, durante as primeiras 24 horas. A partir desse momento, a variação do pH foi muito diferenciada nas diversas fermentações. Na maioria das fermentações o pH permaneceu estável ou subiu ligeiramente durante o período subsequente às 24 horas até o fim da fermentação, enquanto que em poucas fermentações o pH oscilou nesse período. Alguns desses resultados correspondem àqueles relatados por OKAFOR et al. (1984) e OYEWOLE & ODUNFA (1988), quando analisaram as fermentações do foo-foo e lafun, respectivamente.

A acidez titulável aumentou com o desenvolver das fermentações (TABELA 11), mas nem sempre acompanhou a variação do pH, especialmente a partir das 48 horas. Após esse período a acidez titulável aumentou, enquanto os valores de pH permaneceram estáveis ou aumentaram ligeiramente. A FIGURA 6 mostra os valores mínimos, médios e máximos da acidez titulável encontrados nas 10 fermentações. De modo geral, esses dados são compatíveis com os relatados na literatura para alimentos fermentados da mandioca e seus produtos, conforme CEREDA (1973), OKAFOR et al. (1984) e OYEWOLE & ODUNFA (1988) quando analisaram as fermentações do polvilho azedo, foo-foo e lafun, respectivamente.

Tabela 10. Valores de pH encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Período (horas)	F e r m e n t a ç õ e s									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	6,1	6,5	6,8	6,7	6,6	6,0	6,8	6,5	5,7	7,5
12	5,6	5,8	ND	6,1	4,5	4,9	6,5	6,3	4,0	ND
24	5,2	5,6	4,5	5,6	3,6	4,0	5,1	5,7	3,9	4,5
36	4,6	5,2	4,4	5,7	3,8	4,3	5,0	5,6	4,4	ND
48	4,3	5,9	4,6	6,2	3,6	4,4	5,3	5,7	4,6	4,3
72	3,4	5,7	5,0	5,4	3,7	4,9	-	5,7	-	4,5

- Fermentação finalizou às 48 horas

ND Não determinado

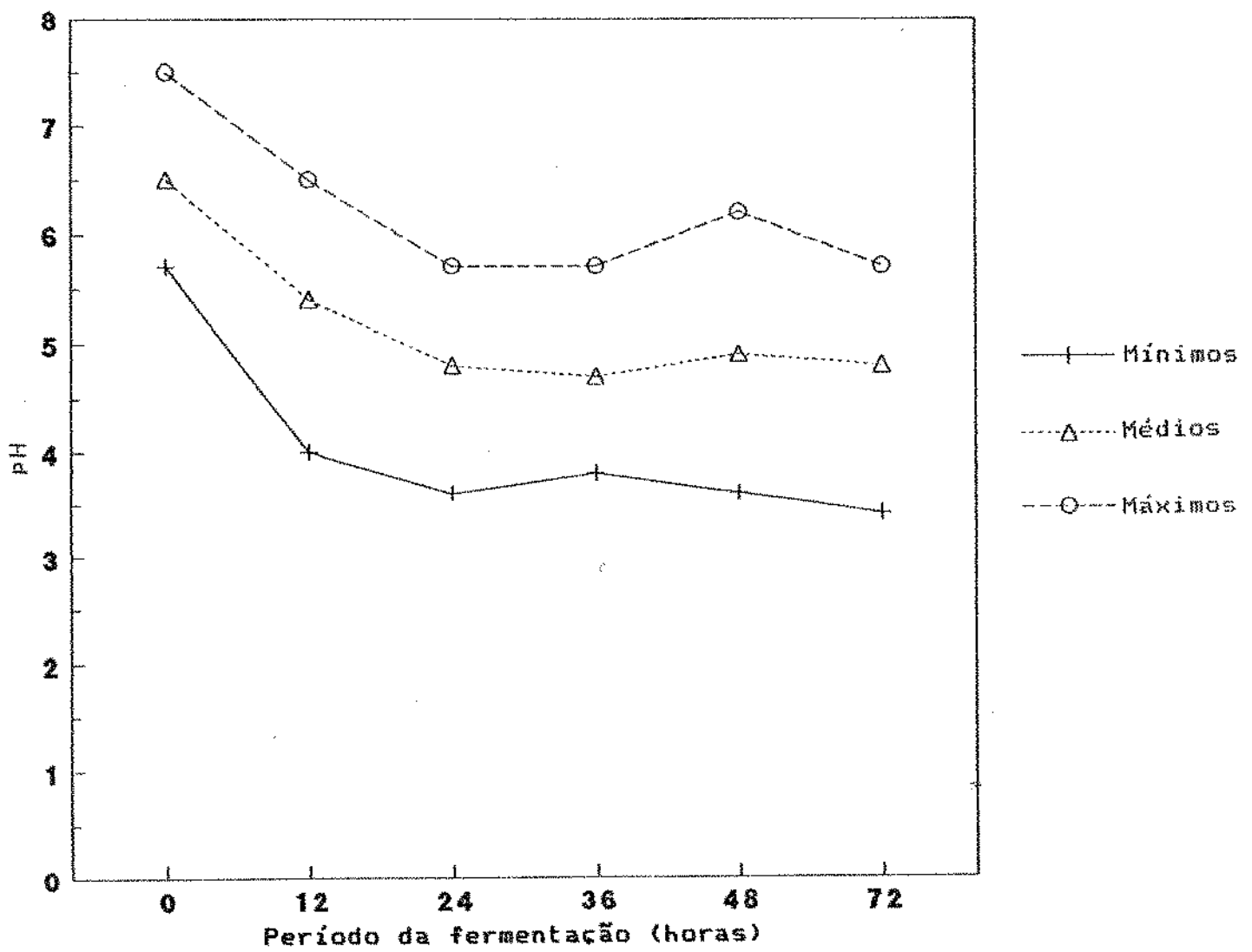


Figura 5. Valores mínimos, médios e máximos de pH encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba

Tabela 11. Valores de acidez titulável (% em ácido láctico) encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Período (horas)	F e r m e n t a ç õ e s									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	0,0	0,2	0,4	0,1	0,0	0,0	0,3	0,5	0,6	0,9
24	0,3	0,6	0,6	0,4	0,2	0,2	1,1	0,9	0,7	0,7
48	0,8	0,6	1,0	1,0	0,4	0,9	2,0	1,1	0,9	0,3
72	1,0	0,9	1,2	1,5	1,3	1,5	-	1,5	-	0,9

\*Fermentação finalizou às 48 horas

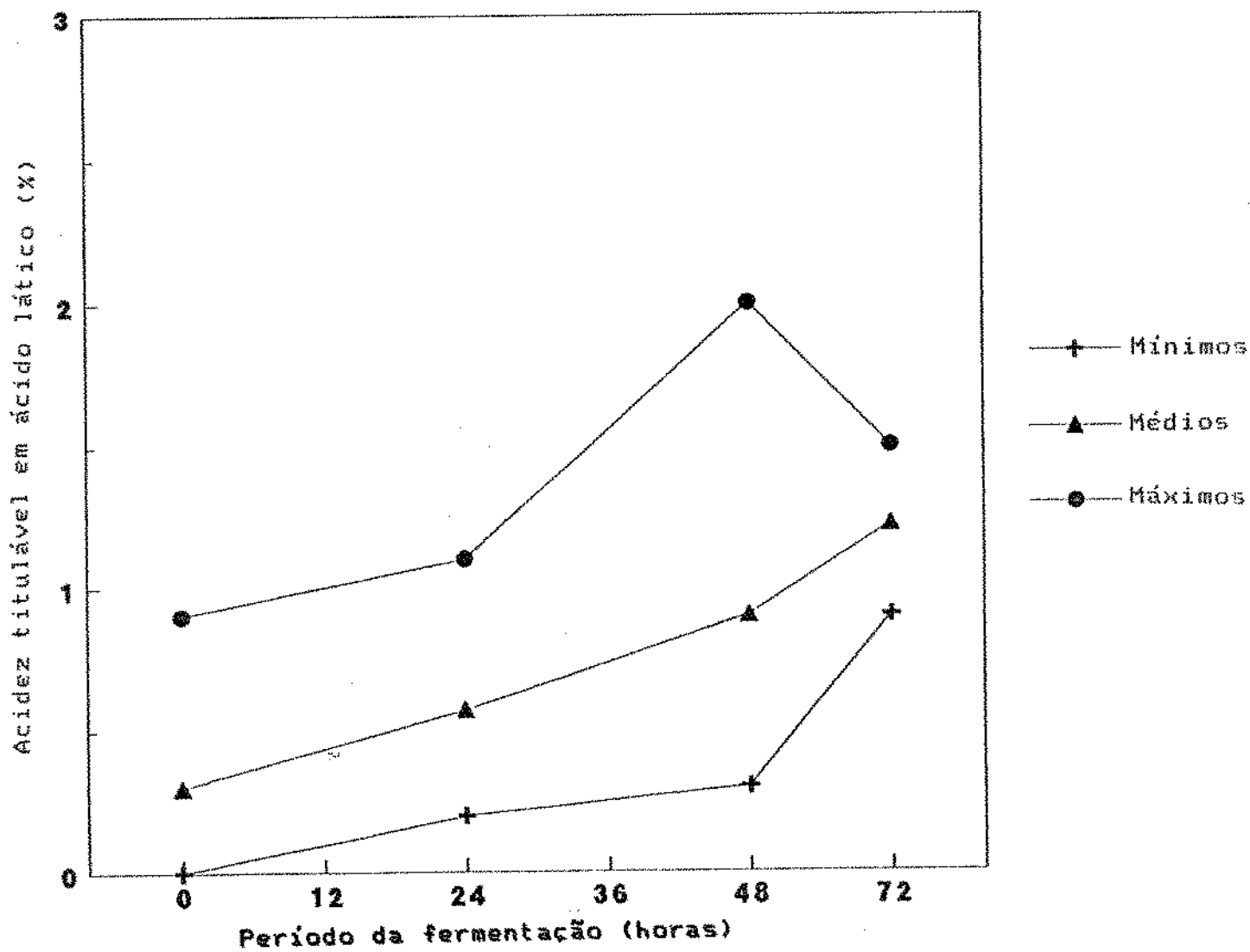


Figura 6. Valores mínimos, médios e máximos da acidez encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba

4.1.2.2. Temperatura - A FIGURA 7 mostra os resultados mínimos, médios e máximos da variação da temperatura no líquido da fermentação da puba durante 10 ensaios. Conforme se pode observar na TABELA 12 a maioria das fermentações foi conduzida à temperaturas entre 28 e 32°C. Em duas fermentações a temperatura oscilou na faixa de 26 a 32°C.

A mesma faixa de temperatura foi relatada por OYEWOLE & ODUNFA (1988), para obtenção do lafun .

#### 4.1.2.3. Produtos metabólicos no líquido da fermentação da puba:

a) Na TABELA 13 apresentam-se os valores da concentração de açúcares redutores em oito fermentações analisadas. A FIGURA 8 mostra os valores mínimos, médios e máximos dos mesmos. A média dos níveis da concentração de açúcares redutores, na maioria das fermentações, permaneceu relativamente estável (2 a 3 mg %).

b) A análise da atividade das enzimas dextrinizantes de uma fermentação típica mostrou que a mesma esteve ausente durante as primeiras 32 horas. A partir de 48 horas foi observada atividade, correspondente a 0,23 unidades da enzima amilase por mililitro do líquido da fermentação. Desde então a atividade dextrinizante apresentou valores crescentes para 0,80 e 1,70 às 54 e 60 horas respectivamente, para em seguida decrescer a 0,78 unidades da enzima, às 72 horas. Aparentemente estes valores estão relacionados com o fenômeno da maceração, pois as raízes começaram a amolecer em 48 horas e já se encontravam



completamente maceradas em 60 horas.

c) A FIGURA 9 obtida dos resultados da determinação de ácido cianídrico de uma fermentação típica, mostra as alterações nos níveis de cianeto no líquido e massa de fermentados. O teor de ácido cianídrico total decresceu de 79 mg/Kg para cerca de 18 mg/Kg de massa, correspondente a uma perda de 77,2 %. A redução da concentração de ácido cianídrico desde o início da fermentação até a secagem da massa ao sol, foi de 81 %

d) Ácidos orgânicos, álcoois e cetonas - Resultados obtidos da análise do líquido de uma fermentação típica analisada por cromatografia gasosa, mostram a presença de ácido acético, ácido butírico, acetona, álcool butílico e álcool etílico (FIGURA 10). Muito embora nessas análises tenha sido detectado ácido láctico, seu comportamento cromatográfico não permitiu a sua quantificação, nas condições analisadas.

e) Ácidos orgânicos por cromatografia líquida - a análise do líquido de uma fermentação típica, através de cromatografia líquida de alta eficiência, mostra a presença dos ácidos acético, butírico e láctico. Analisando a FIGURA 11, verifica-se que no início da fermentação (0 hora) o ácido acético encontrava-se presente na concentração de 23 mg %, enquanto os ácidos láctico e butírico ainda não eram detectados.

A concentração de ácido acético permaneceu relativamente estável até 24 horas de fermentação, para logo em seguida

apresentar valores crescentes, atingindo a concentração máxima de 144 mg % às 60 horas.

O ácido láctico começou a ser detectado em concentração de 13,5 mg % a partir de 8 horas de iniciada a fermentação. As concentrações do ácido láctico foram aumentando até 103 mg % às 32 horas, quando então decresceram no intervalo entre 32 a 48 horas e novamente aumentaram paulatinamente até atingir 193 mg % no final da fermentação (FIGURA 11).

O ácido butírico foi detectado às 32 horas do início da fermentação e sua concentração aumentou rapidamente para 40, 167, 234, 392 e 388 mg % às 41, 48, 54, 60 e 72 horas, respectivamente, caracterizando uma fermentação butírica.

As concentrações dos ácidos acético e láctico são aproximadamente  $1/3$  e  $1/2$ , respectivamente, da concentração do ácido butírico, ao final da fermentação. Esses dados são compatíveis com a fermentação láctica e acetobutírica, segundo STANIER et al. (1976). A primeira ocorre predominantemente no início do processo mas continua até o final, enquanto que a butírica é predominante após as 48 horas de iniciada a fermentação. Este fenômeno é comprovado com as presenças das bactérias do ácido láctico e do ácido butírico nas diversas fermentações analisadas. Supõe-se que a presença de acetona pode ser de origem microbiana, fermentação acetobutírica ou resultado da degradação do glicosídeo cianogênico (linamarina), pelas enzimas linamarase da própria raiz ou derivada de microrganismos. Os produtos ácidos também foram detetados por CEREDA (1973),

porém de modo geral em menores concentrações, na fermentação de fécula de mandioca para obtenção do polvilho azedo.

Tabela 12. Valores de temperatura (°C) encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Período (horas)	F e r m e n t a ç õ e s									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	33,0	29,0	28,5	29,5	28,0	29,0	29,5	28,0	30,5	28,0
3	32,0	29,5	29,0	30,5	30,0	31,0	31,0	30,5	32,0	30,5
12	31,0	29,5	31,0	29,5	30,5	30,5	31,0	29,0	30,5	30,0
18	33,5	30,0	31,5	32,5	32,0	32,0	32,0	33,0	31,5	32,0
24	34,0	29,0	30,5	30,0	27,0	30,5	30,5	30,5	26,0	ND
36	31,0	30,5	29,5	29,0	30,0	29,5	30,0	29,0	29,0	30,5
42	30,0	29,0	29,0	29,5	30,0	29,0	29,5	30,0	29,5	30,0
48	33,5	29,5	30,0	31,0	29,5	29,5	29,0	ND	29,0	29,5
60	32,0	30,5	31,0	31,0	32,0	30,5	-	30,0	-	30,5
72	34,5	30,0	30,5	29,5	26,5	29,5	-	29,5	-	26,5

- Fermentação finalizou às 48 horas

ND Não determinada

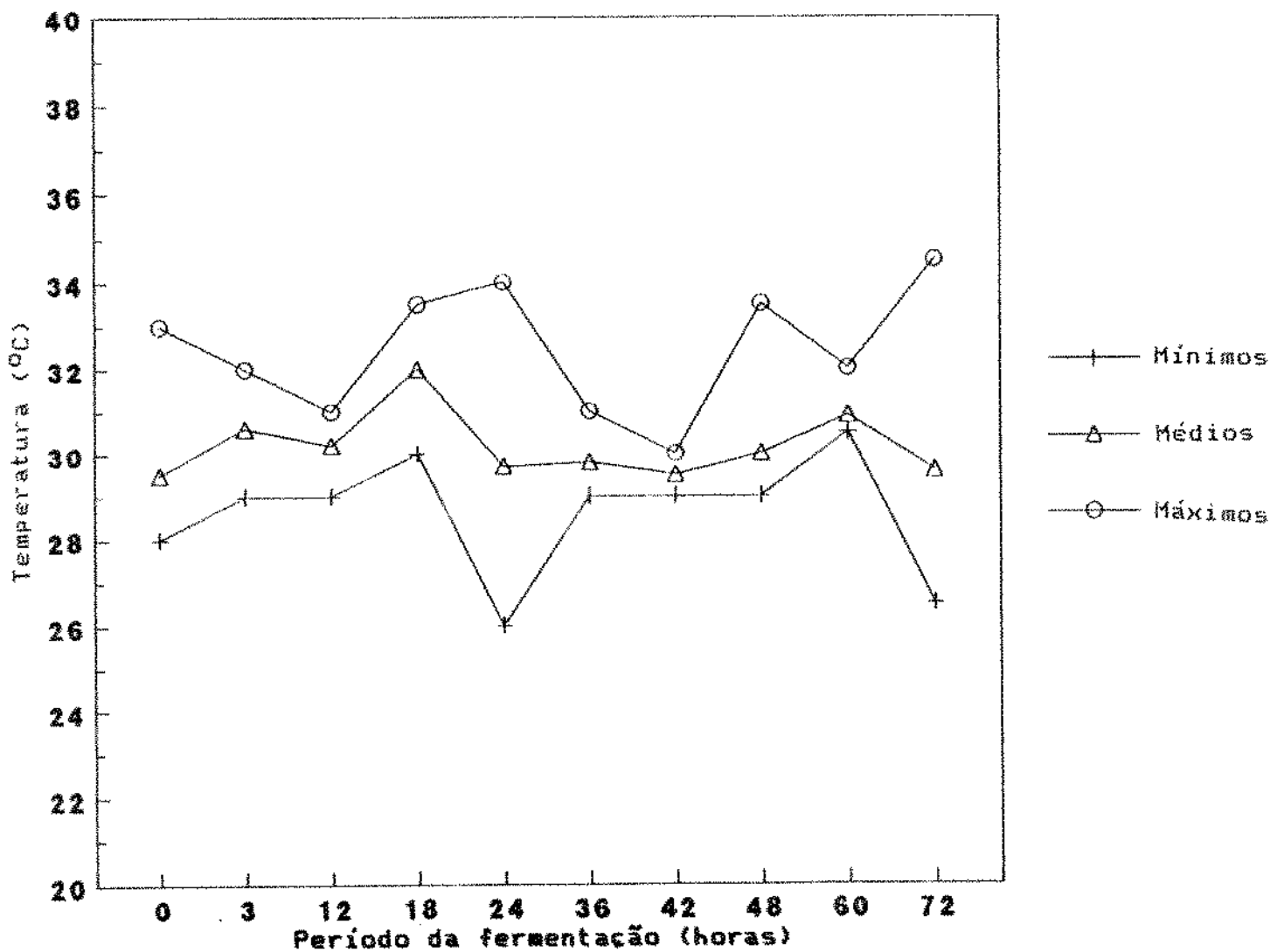


Figura 7. Valores mínimos, médios e máximos da temperatura encontrados no líquido de 10 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba

Tabela 13. Açúcares redutores (mg %) encontrados no líquido de 08 fermentações de raízes de mandioca para obtenção de puba.

Período (horas)	F e r m e n t a ç õ e s								
	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	0,5	2,8	0,9	2,4	0,6	1,8	4,8	3,2	
12	1,0	2,1	1,7	1,9	1,7	1,6	2,2	2,0	
24	0,5	3,4	1,7	2,3	7,5	2,0	1,4	2,6	
36	1,5	3,0	3,5	3,4	5,1	2,9	3,4	3,3	
48	0,8	2,6	2,2	2,7	1,8	2,0	3,1	2,1	
72	1,0	2,9	3,0	2,6	-	2,4	-	1,5	

\*Fermentação finalizou às 48 horas.

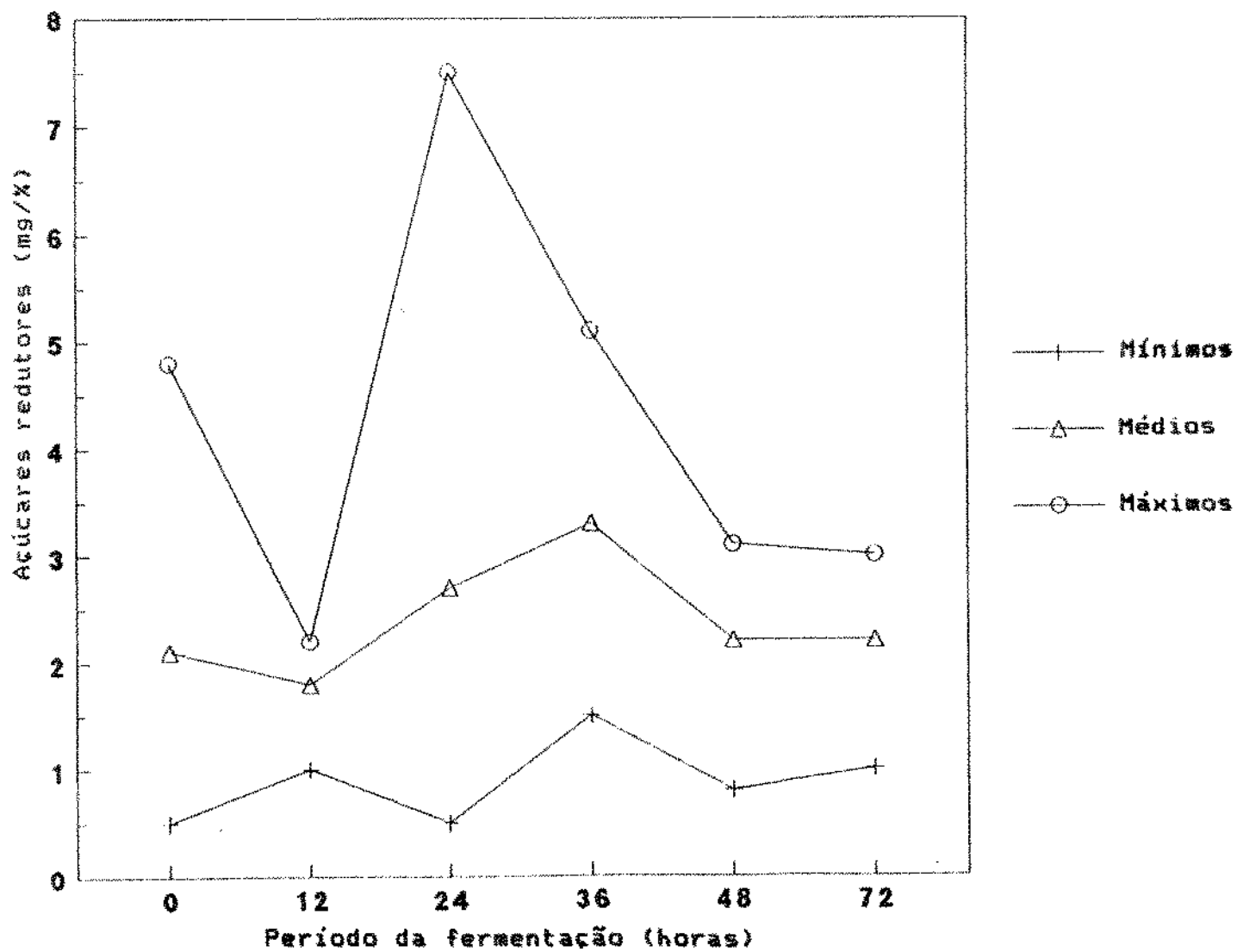


Figura 8. Valores mínimos, médios e máximos de açúcares redutores encontrados no líquido de 08 fermentações de mandioca para obtenção de puba

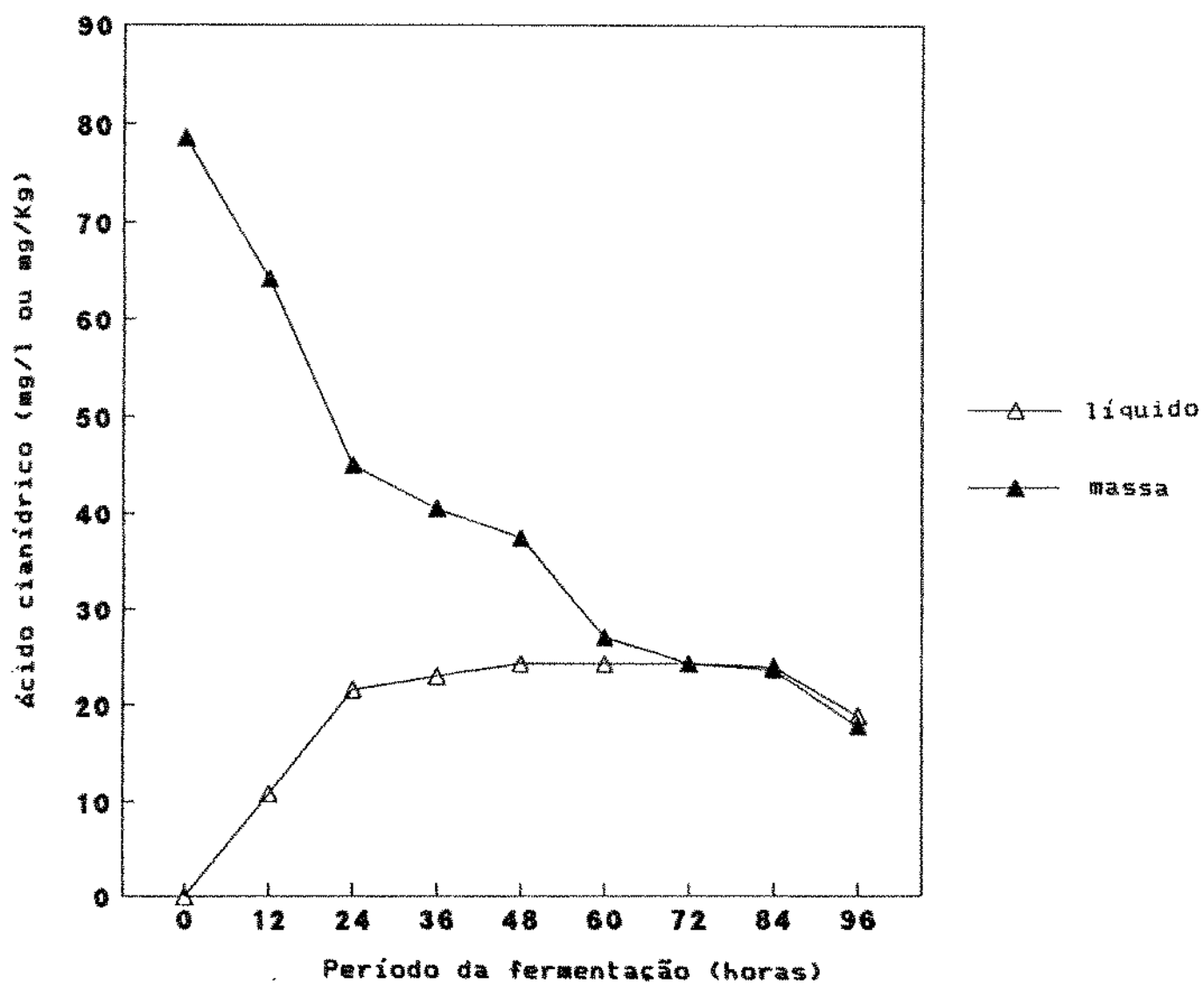


Figura 9. Teor de ácido cianídrico encontrado durante uma fermentação típica de raízes de mandioca para obtenção de puba



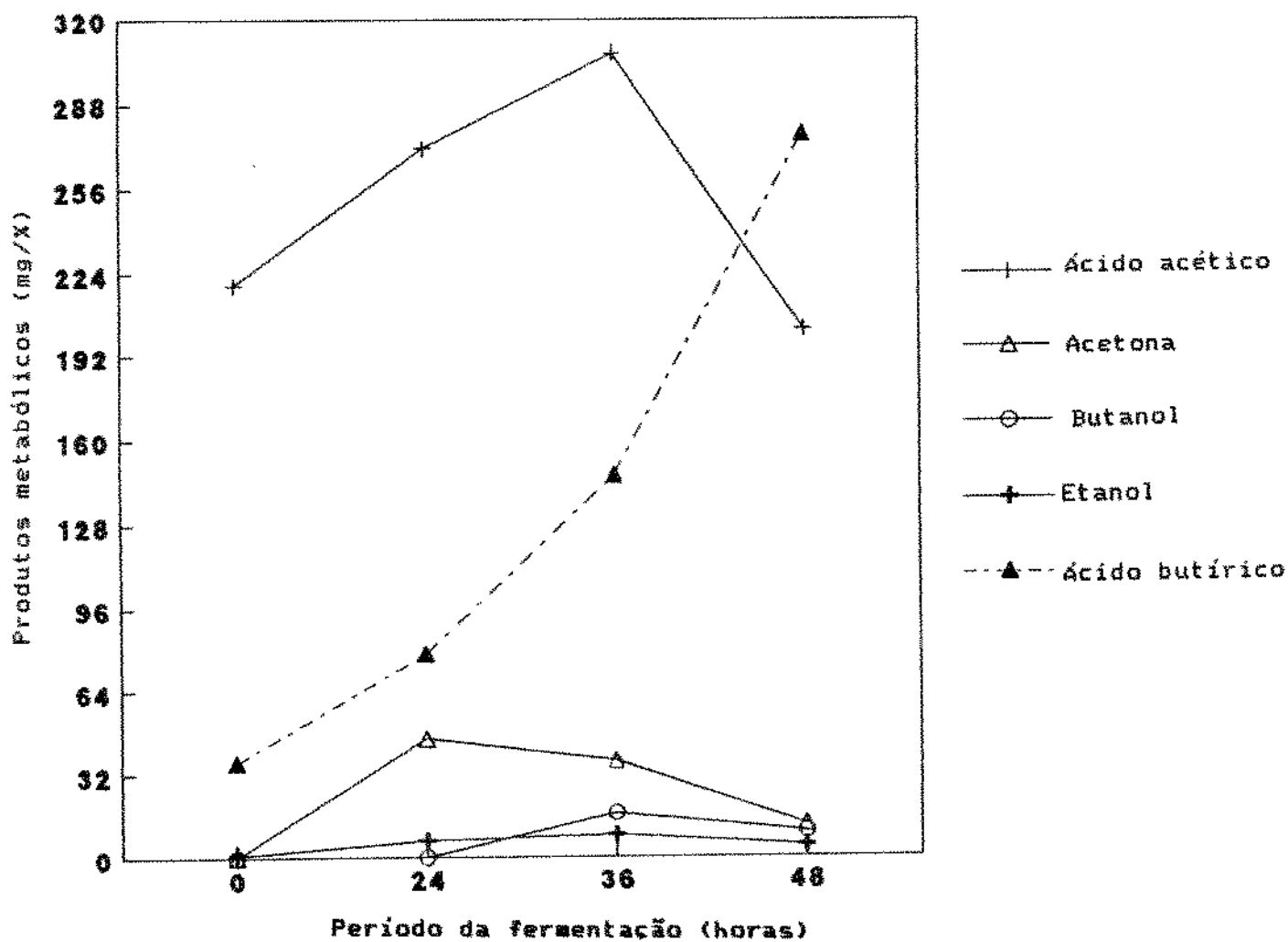


Figura 10. Produtos metabólicos encontrados, por cromatografia gasosa, durante uma fermentação típica de raízes de mandioca para obtenção de puba

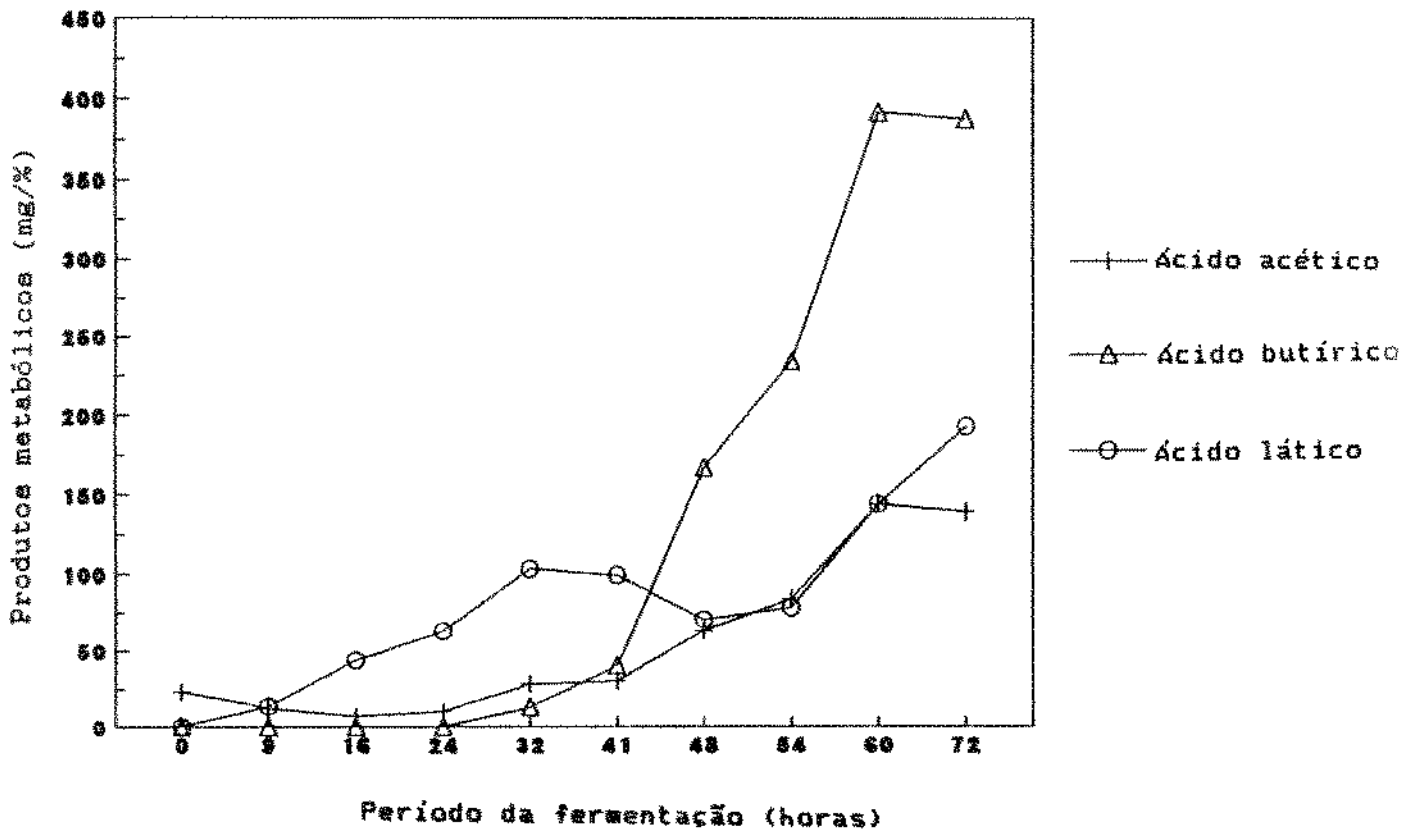


Figura 11. Produtos metabólicos encontrados, por cromatografia líquida de alta eficiência, durante uma fermentação típica de raízes de mandioca para obtenção de puba

## 4.2. ENSAIOS FERMENTATIVOS PARA OBTENÇÃO DE PUBA SOB DETERMINADAS CONDIÇÕES PRÉ ESTABELECIDAS

### 4.2.1. EFEITO DA INTRODUÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS

As raízes obtidas de ensaios nos quais foram introduzidos os organismos esporulados e as enterobactérias, particularmente *Klebsiella sp.*, isolados ou conjuntamente foram as únicas que se apresentaram maceradas, mesmo assim, o processo ocorreu muito lentamente. Esses organismos associados a *S. faecalis* e lactobacilos conseguiram macerar e originar aroma ligeiramente similar ao da puba. OYEWOLE (1990), estudando a otimização da fermentação da mandioca para produção de foo-foo observou que a cultura de *Candida Krusei* foi a que mais contribuiu para o odor característico do mesmo e o *Bacillus subtilis* apresentou o melhor desempenho para maceração.

### 4.2.2. EFEITO DA FRAGMENTAÇÃO DAS RAÍZES

As amostras de mandioca submetidas à trituração completa não lograram fermentação típica, mesmo após o período de 15 dias. Os fragmentos de mandioca com tamanhos entre 5 e 10 mm de comprimento, maceraram após 72 horas, mas mantiveram o aroma de raiz fresca por cerca de 5 dias de fermentação. Empregando fragmentos de raízes de 20 a 30 mm de comprimento ou mesmo maiores, a maceração e fermentação típicas ocorreram em 60 a 70 horas. Por sua vez, empregando raízes inteiras, a maceração e fermentação completaram-se entre 72 e 84 horas. A fragmentação

das raízes apresenta a vantagem de permitir maior redução da toxicidade da mandioca, segundo TINAY et al. (1984).

#### 4.2.3. EFEITO DA TEMPERATURA

A maioria das raízes de mandioca incubadas a 35°C, fermentou em 48 horas, mas a puba apresentou características organolépticas inferiores àquelas incubadas a 28-32°C, que parece ser a temperatura mais adequada para produzir uma boa puba, porém, o período de fermentação prolongou-se para 60 a 72 horas. Os experimentos conduzidos a temperaturas de 34 a 38°C, apresentaram maior formação de gases na superfície, ao final da fermentação (observação visual). O cheiro era pútrido e as raízes amareladas na fermentação a 38°C, enquanto que a 34°C o cheiro era pútrido e azedo e as raízes vieram à superfície. Nos experimentos conduzidos a temperaturas superiores a 40°C a maceração e fermentação típicas não ocorreram mesmo após o período de 96 horas. Da mesma forma, no experimentos conduzidos a temperaturas de 24 a 26°C, a fermentação e maceração ocorreram normalmente após 144 horas de incubação.

#### 4.2.4. EFEITO DO pH

A adição de solução de ácido tartárico abaixando o pH inicial do líquido da fermentação apesar de não permitir a produção de odores típicos, não interferiu na maceração, que foi observada após o período de 72 horas. CARDENAS & BUCKLE (1980) tentando obter fécula ou polvilho azedo ("almidón agrio")

adicionaram os mesmos ácidos encontrados na fermentação natural mas não lograram êxito na aplicação tecnológica do produto obtido, na confecção de biscoitos.

#### **4.2.5. EFEITO DO MATERIAL DO RECIPIENTE**

Experimentos conduzidos em recipientes confeccionados com diversos materiais, mostraram que a fermentação típica da puba ocorria independentemente do material, com exceção dos experimentos conduzidos em recipientes de zinco e em latas oxidadas em que a fermentação típica não ocorria, dando origem a uma fermentação de intenso cheiro acre.

#### **4.2.6. EFEITO DA ANAEROBIOSE**

Os experimentos conduzidos em anaerobiose não permitiram a ocorrência da fermentação e maceração típicas, mesmo mantendo-se por um período de 4 dias.

#### **4.2.7. EFEITO DA ADIÇÃO DE LÍQUIDO PRÉ-FERMENTADO COMO INÓCULO**

A adição de 10 % de meio de cultura com 36, 48 e 60 horas de pré-fermentação reduziu o período da fermentação propriamente dita para 48 horas.

#### 4.2.8. EFEITO DA ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS SELETIVAS

Controle - a fermentação natural ocorreu com maceração e odor típicos após 96 horas.

- Azida sódica - O tratamento com azida sódica não permitiu que as raízes macerassem nem que ocorresse aroma típico. Ao exame microscópico do sedimento, verificou-se a predominância de células esféricas a cocóides, aos pares, em tétrades e cadeias. Não foram observadas formas esporuladas. Conforme STANIER et. al. (1976), a azida sódica exerce sua ação inibitória particularmente sobre a cadeia citocrômica.

- Desoxicolato de sódio - No experimento conduzido com desoxicolato de sódio a 0,15 % as raízes maceraram e o cheiro era típico de puba às 72 horas. O exame microscópico demonstrou a predominância de bacilos Gram negativos, cocos gram positivos e raras formas esporuladas. O desoxicolato de sódio é um sal biliar que na concentração empregada inibe o desenvolvimento das bactérias Gram-positivas, segundo STANIER (1976).

- Cloreto de sódio - Nos tratamentos com cloreto de sódio às concentrações de 1, 2, 3, 5, 10 e 15 % , a fermentação e maceração não ocorreram até às 96 horas. O mesmo ocorrendo nos experimentos conduzidos com adições de cloreto de sódio efetuadas em 12 e 24 horas de iniciada a fermentação em concentrações de 1 e 2 %, respectivamente. De modo geral, nesses experimentos os exames microscópicos mostraram predomínio de bacilos e cocos Gram

positivos, leveduras e poucos bacilos Gram negativos.

#### **4.2.9. EFEITO DO TRATAMENTO TÉRMICO**

Nas amostras de raízes de mandioca tratadas a 65 e 75°C por 5 minutos, incubadas a 32°C, a fermentação e a maceração típicas ocorreram entre 72 e 84 horas, respectivamente. Os exames microscópicos dos sedimentos revelaram a presença de bacilos Gram positivos, isolados, em cadeias e palicada, e realizada a coloração de esporos, verificou-se muitos bacilos esporulados.

### **4.3. CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, FÍSICO-QUÍMICA, QUÍMICA, BIOQUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE AMOSTRAS DE PUBA COMERCIALIZADAS NO RECÔNCAVO BAIANO**

#### **4.3.1. CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DAS AMOSTRAS DE PUBA**

4.3.1.1. Cor - as amostras apresentavam-se com uma cor amarelada, branca ou acinzentada.

4.3.1.2. Impurezas - as amostras apresentavam presença de material estranho, como por exemplo, fragmentos de madeira, casca e outras sujidades.

4.3.1.3. Odor - as amostras apresentavam odor desde ligeiramente até fortemente ácido, sendo que naquelas obtidas em supermercados, o odor ácido era mais pronunciado. Todas as

amostras apresentavam cheiro característico, lembrando a ácido butírico. Quando submetidas a secagem em temperatura ambiente, as mesmas perdiam parte do odor característico.

#### 4.3.2. VIDA DE PRATELEIRA

4.3.2.1. Temperatura ambiente - As amostras úmidas apresentaram tempo de vida útil entre 4 a 15 dias (TABELA 14), avaliadas através de observações organolépticas. Após esse período ocorriam modificações acentuadas de odor, que se tornava mais acre à medida que aumentava o tempo de armazenamento, observando-se a seguir modificações de cor, que se tornava mais e mais acinzentada, e, finalmente ocorria o aparecimento de bolores verdes e amarelos. Algumas amostras apresentavam odor a ranço.

4.3.2.2. Temperatura de refrigeração (4 a 7°C) - As modificações ocorridas sob temperatura de refrigeração foram menos acentuadas que em temperatura ambiente, mas houve também modificações na coloração para cinza claro e presença esporádica de bolores, geralmente de cor escura. O odor não apresentou alterações acentuadas. O tempo de vida útil sob refrigeração foi geralmente superior a 05 dias (TABELA 14), sendo que as amostras com baixo teor de umidade (cerca de 50 %), permaneceram por mais de 40 dias sem modificações visíveis. Uma das amostras, com acidez aquosa de 11,30 %, teve uma vida de prateleira bem reduzida em relação às outras amostras, apenas 10 dias sob refrigeração e 4 dias à temperatura ambiente. Em contrapartida, outra amostra, com acidez aquosa de 1,00 % conservou-se por 40 dias em refrigeração e 10



dias à temperatura ambiente. Esses resultados sugerem que a

TABELA 14. Valores mínimos, médios e máximos da vida de prateleira de 25 amostras de puba analisadas

Temperatura de armazenamento	Vida de prateleira (dias)		
	Mínimo	Médio	Máximo
Refrigeração (4 a 7°C )	05	26	40
Ambiente (26 a 32°C)	04	07	15

acidez teve influência na vida de prateleira da puba.

As amostras de farinha de puba, secas e armazenadas em frascos de polietileno à temperatura ambiente apresentaram umidade residual média de 14,50 % e encontravam-se em boas condições organolépticas, apresentando vida útil de 1 ano.

Algumas amostras com umidade residual média de 17,4 %, armazenadas nas mesmas condições, em pouco tempo apresentaram-se

com modificações da cor e odor, e presença de larvas de insetos.

#### **4.3.3. DETERMINAÇÕES QUÍMICAS, FÍSICO-QUÍMICAS, BIOQUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS**

4.3.3.1. Composição Química - As TABELAS 15 e 16 mostram os resultados médios, mínimos e máximos da composição química e análises físico-químicas das 25 amostras de puba comerciais. Os valores percentuais médios encontrados para amido, umidade, fibras, cinzas, extrato etéreo e proteínas estão dentro da faixa relatada pela UFBA (1974).

4.3.3.2. Acidez e pH - Os valores médios de pH das amostras de puba foi de 4,72. Esse valor é próximo daquele apresentado para pubas obtidas experimentalmente, de acordo com a UFBA (1974).

Em relação à acidez, foi observada grande variação (TABELA 16). Esse comportamento já havia sido verificado por CEREDA (1973) ao analisar amostras de polvilho azedo comercial.

TABELA 15. Composição química centesimal das 25 amostras de puba úmida comercializadas no recôncavo baiano.

Análises	Valores		
	Mínimos	Médios	Máximos
Umidade	43,50	51,72	60,90
Cinzas *	0,07	0,33	0,80
Extrato etéreo *	0,13	0,52	1,88
Proteína *	0,16	0,51	1,20
Amido *	77,58	84,62	95,78
Fibras *	1,55	2,16	4,60
Acúcares redutores	8,00	31,13	90,00

(mg/100g)\*\*

\* Resultados expressos em base seca.

\*\* Resultados expressos em base úmida.

4.3.3.3. Atividade diastásica - Nas amostras de puba foi encontrado um valor médio para atividade diastásica (TABELA 16) de 581,20 mg de maltose/10 g de farinha, o que significa uma alta atividade da enzima alfa amilase. As farinhas com alta atividade dessa enzima geralmente acarretam problemas durante o processamento de pães e massas alimentícias, responsável pela hidrólise do amido durante a cocção, prejudicando a qualidade dos produtos finais (EL-DASH et al., 1982).

4.3.3.4. Produtos metabólicos- Os ácidos acético, butírico e láctico foram os compostos predominantes em amostra de puba seca, analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (TABELA 16).

TABELA 16. Análises químicas e físico-químicas das 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano.

Análises	Valores		
	Mínimos	Médios	Máximos
pH	4,00	4,72	6,44
Acidez alcoólica (X)*	0,07	1,67	5,50
Acidez aquosa (X)*	1,00	4,09	11,30
Atividade diastásica (mg malt./10g far.)	558,00	582,37	618,00
Ácidos orgânicos (mgX)*			
Acético		12	
butírico		27	
láctico		26	

\* Expressa em porcentagem de NaOH N gasta para titulação (v/v).

\*\* Resultados de uma análise.

A TABELA 17 mostra os resultados médios da análise de ácido cianídrico. A amostra obtida em laboratório apresentou o maior teor de HCN (37,3 mg/Kg). Como se pode observar, as amostras de puba comerciais apresentam baixas concentrações residuais de ácido cianídrico.

TABELA 17. Teor de ácido cianídrico nas 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano.

	Valores		
	Mínimos	Médios	Máximos
Ácido cianídrico (mg CN <sup>-</sup> /Kg)	2,6	19,9	34,9

4.3.3.5. Análises Visco-amilográficas - de acordo com a TABELA 18, das 11 amostras analisadas, as de número 4, 6, 7 e 8 apresentaram baixos valores de viscosidade a quente, o que provavelmente se explica pelo grau de tratamento que sofreram as amostras. Este grau de tratamento está relacionado à acidez das amostras bem como as modificações estruturais que ocorrem no grânulo de amido. Pelo grau de variação, a viscosidade a alta temperatura e a baixa, pode-se observar o comportamento das amostras na formação de pastas. Apenas as amostras 1 e 3 mostram

tendência a dar pastas mais viscosas a frio (50°C), enquanto as outras amostras apresentam tendência a dar pastas menos consistentes ou menos viscosas. Os resultados esperados para estes tipos de produtos são os apresentados pelas amostras de baixo valor de viscosidade a quente, uma vez que a fermentação

TABELA 18. Características visco-amilográficas de 11 das 25 amostras de puba comercializadas no recôncavo baiano.

Características	Amostras										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Viscosidade *											
inicial a 92,5°C	480	260	380	-	-	-	-	-	-	-	-
Viscosidade *											
a 92,5°C após											
20min	470	240	300	40	100	80	90	70	90	120	180
Viscosidade a *											
50°C	850	330	590	60	120	100	120	110	160	150	240
Viscosidade *											
máxima	850	330	590	40	100	80	90	70	90	120	180

\* Unidades amilográficas

origina produtos derivados do metabolismo microbiano que aumentam a acidez do meio, tornando os grânulos de amido mais suscetíveis ao rompimento, com o aquecimento prolongado e/ou agitação mecânica.

A amostra i, por sua vez, apresentou a mais alta viscosidade, enquadrando-se dentro da faixa estabelecida para fécula de mandioca não fermentada.

**4.3.3.6. Análises microbiológicas** - Os resultados da TABELA 19 mostram que as amostras de puba comercializadas não apresentaram coliformes fecais. Por outro lado, a presença de *Bacillus* com características de *B. cereus* em contagens médias de  $2,7 \times 10^5$  UFC/g podem ser consideradas elevadas, particularmente pelo fato da puba apresentar nutrientes e condições adequadas ao desenvolvimento desse microrganismo. Por sua vez, os resultados das contagens de bolores, leveduras, contagem total, de psicrófilos e inclusive de coliformes fecais podem servir para avaliação da qualidade microbiológica da puba, visto que nas amostras em que os valores das contagens desses microrganismos, com exceção de coliformes fecais, eram mais elevados, a puba apresentava sinais de deterioração.

TABELA 19. Médias das contagens de microrganismos indicadores nas 25 amostras de pupa úmida comercializadas no recôncavo baiano.

Análises(UFC/g) <sup>a</sup>	Valores		
	Mínimos	Médios	Máximos
Coliformes totais	< 1,0 X 10	8,0 X 10 <sup>4</sup>	9,8 X 10 <sup>5</sup>
Coliformes fecais	< 1,0 X 10	< 1,0 X 10	< 1,0 X 10
Bacillus cereus	< 1,0 X 10	2,7 X 10 <sup>5</sup>	4,0 X 10 <sup>6</sup>
Contagem total	7,0 X 10 <sup>5</sup>	2,9 X 10 <sup>7</sup>	1,1 X 10 <sup>8</sup>
Contagem de bolores	1,0 X 10 <sup>3</sup>	1,7 X 10 <sup>6</sup>	4,2 X 10 <sup>7</sup>
Contagem de leveduras	1,1 X 10 <sup>5</sup>	2,6 X 10 <sup>7</sup>	2,0 X 10 <sup>8</sup>
Contagem de psicrófilos	< 1,0 X 10	2,3 X 10 <sup>4</sup>	2,5 X 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup>UFC - unidades formadoras de colônias



#### 4.3.4. APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE UMA AMOSTRA DE PUBA

O bolo confeccionado com a puba, foi testado organolépticamente, para avaliar a aceitação do produto. O bolo de puba, como é chamado na culinária baiana, na verdade não apresenta as características de bolo e sim de pudim ou produto similar. Durante o assamento, o produto apresenta um aumento de volume, porém este aumento é perdido durante o resfriamento. Trata-se de um produto agradável, de sabor e aroma característicos, mascarado pela presença de leite de côco. Apresenta uma crosta macia, uniforme e de fina espessura.

De acordo com a avaliação sensorial, o produto obteve como nota média de 20 provadores, o valor de 8,0, que corresponde na Escala Hedônica a categoria "gostei muito".

ANÁLISE SENSORIAL

Produto: Bolo de pua

Método: Escala Hedônica

Estruturada Nominal (9 pontos)

Análise: Preferência

Provadores			
1.	6,0	11.	8,0
2.	7,0	12.	9,0
3.	7,0	13.	8,0
4.	7,0	14.	8,0
5.	8,0	15.	8,0
6.	9,0	16.	7,0
7.	7,0	17.	8,0
8.	8,0	18.	7,0
9.	7,0	19.	8,0
10.	8,0	20.	8,0

$X = 7,65 - 8,0 = \text{gostei muito}$

## 5. CONCLUSÕES

1. A fermentação de mandioca para obtenção de puba, sob condições naturais, é consequência da ação de vários microrganismos, particularmente espécies de *Klebsiella*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, que, por interação se desenvolvem promovendo as alterações características: físicas, físico-químicas e bioquímicas.

2. Observa-se o fenômeno da sucessão bacteriana de modo que a participação das enterobactérias e corinebactérias reduz-se durante o processo fermentativo, dando lugar ao desenvolvimento da flora láctica e esporulada que ao final da fermentação, atinge cerca de 80 % da microbiota total.

3. A média do pH do líquido das fermentações decresceu de 7,5 a 6,5 para cerca de 5,0 nas primeiras 24 horas da fermentação e manteve-se estável, nesse patamar, até o fim da fermentação.

4. A média da acidez do líquido aumentou desde 0,3 %, paulatinamente, até atingir cerca de 1,0 % ao final da fermentação.

5. A média da concentração de açúcares redutores situou-se entre 2,0 a 3,0 mg %.

6. Os compostos predominantes durante a fermentação da puba foram os ácidos acético, butírico e láctico.

7. O processo de maceração inicia-se a partir das 48 horas de fermentação e se completa quando a atividade amilolítica é máxima.

8. O teor de ácido cianídrico total, na massa de mandioca, decresceu de uma concentração inicial de 79 mg/Kg para cerca de 18 mg/Kg ao final da fermentação.

9. A fermentação das raízes de mandioca para obtenção de puba pode ser, obtida empregando inóculos constituídos de *Klebsiella sp.*, *Clostridium sp.* e *Bacillus sp.* Esses organismos isolados e/ou associados a *S. faecalis* e *Lactobacillus* conseguiram macerar a mandioca e originar aroma similar ao da puba.

10. As temperaturas de 28, 30 e 32°C mostraram-se adequadas para fermentação de mandioca para obtenção de puba.

11. A adição de 10 % de líquido pré-fermentado, a partir das 36 horas como inóculo, reduziu o período da fermentação em cerca de 25 %.

12. A fermentação foi acelerada tratando-se os fragmentos de raízes de mandioca em banho-maria a 60 ou 75°C por cinco minutos, antes de iniciar a fermentação.

13. As amostras de pupa comercializadas na Bahia apresentam concentrações residuais de ácido cianídrico entre 2,6 a 34,9 mg CN<sup>-</sup>/Kg.

14. Coliformes fecais não foram detectados nas amostras de pupa comerciais analisadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M. O. & LINDSAY, R. C. - Evidence for lactic streptococcal role in Nigerian acid cassava (*Manihot esculenta* Crants). *J. Food Prot.* 41:781-784, 1978.
- ADEGOKE, G. O. & BABALOA, A. K. Characteristics of micro-organisms of importance in the fermentation of fufu and ogi-two nigerian foods. *J. Appl. Bacteriol.*, 65:449-53, 1988.
- AKINRELE, I. A. - Fermentation of cassava. *J. Sci. Food Agric.*, 15:589-594, 1964.
- ALBUQUERQUE, M. - *A mandioca na Amazonia*. Belém, Superintendência de Desenvolvimento da Amazônia, Ministerio do Interior, 1969, 277pp.
- ALMEIDA, P. F.; CASTRO DE ALMEIDA, R. C.; VASCONCELOS, A. S. S. & MENEZES, T. B. Microbiology of cassava fermentation for puba production. Preliminar findings. In. *XIV Cong. Bras. Microbiol.*, Viçosa, MG, 1987, p45.
- AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. *Cereal Laboratory Methods*. 7th ed. St. Paul, Minn., 1962
- AMERICAN PUBLIC HEALTHY ASSOCIATION. *Compendium of methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington, D. C.

1976, 702p.

AMERINE, M. A. & OUGH, C. S. - Methods for analysis of must and wines. John Wiley & Sons, Inc. New York, 1980, 341pp.

ANGELUCCI, E. & MANTOVANA, D. M. B. - Minerais em Alimentos. Instituto de Tecnologia de Alimentos/Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 1986. 131p.

A.P.H.A. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, D. C., 1976, 702p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official Methods of analysis. AOAC, 9th. Ed., Washington, D. C., 1960. 832p.

AYRES, J. C. - Manioc: the potential exists for increase use of this tropical plant and its products. Food Technol., 26:128-138, 1972.

AYRES, J. C.; MUNDT, J. O. & SANDINE, W. E. Microbiology of foods. W. H. Freeman and Company, San Francisco. 1980, 708p.

BAHIA. Estatísticas da Agropecuária. Fundação Centro Estadual de Planejamento Agrícola. Secretaria da Agricultura do Estado da Bahia. 1985, 135p.

BRENNER, D. J. Family Enterobacteriaceae. In: KRIEG & HOLT, eds. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams &

Wilkins, Baltimore, 1984, vol 1, 408-420.

BUCHANAN, R. E. & GIBBONS, N. E. In: Bergeys Manual of Determinative Bacteriology. The Williams and Wilkins, 7<sup>th</sup> Ed. Baltimore, 1974.

CAMPBELL-PLATT, G. - Fermented Foods of the World - a Dictionary and Guide. Butterworths & Co. Ltd., London, 1987, 291p.

CÁRDENAS, O. S. & BUCKLE, T. S. - Sour cassava starch production: a preliminary study. J. Food Sci., 45:1509-1512, 1980.

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

CIACCO, C. F. & CRUZ, R. Tecnologia do Amido. Secretaria da Industria, Comércio, Ciência e Tecnologia, São Paulo, 1982.

CLAUS, D. BERKELEY, R. C. W. Genus *Bacillus*. In: SNEATH et al., eds. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986. vol. 2, 1105-1139.

COLLARD, P. & LEVI, S. A. - A two-stage fermentation of cassava. Nature, 183:620-621, 1959.

CORRÊA, H. - Mandioca: do indígena à mecanização. Sete Lagoas, IPEAE, Ministério da Agricultura, No 10, 1970, 10pp.



- COLLINS, C. H. & LYNE, P. M. - Microbiological Methods. 5th ed.,  
London, Butterworth & Co. Ltd., 1985, 450p.
- COLLINS, M. D. & CUMMINS, C. S. Genus *Corynebacterium*. In: SNEATH  
et al., eds. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology.  
Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, Vol. 2. p. 1266 - 1283.
- DARD, N. - A mandioca: alguns tipos de farinhas. Cameo,  
B:46-48, 1937a.
- \_\_\_\_\_ - A mandioca: alguns tipos de farinhas II. Cameo,  
B:69-70, 1937b.
- EL-DASH, A. A.; CAMARGO, C. O. & DIAZ, N. M. - Fundamentos de  
Tecnologia de Panificação. Secretaria da Indústria,  
Comércio, Ciência e Tecnologia. São Paulo. 1982.
- ESPINAL, J. L. R. & ALMY, S. W. A casa de farinha no recôncavo  
baiano. In: 1o Congresso Brasileiro da Mandioca., 2vol.,  
Salvador, 1979, 17-26p.
- ETCHELLS, J. L.; COSTILOW, R. N.; ANDERSON, T. E. & BELL, T. A. -  
Pure culture fermentation of brined cucumbers. Appl.  
Microbiol., 12:523-535, 1964.
- FRAZIER, W. C. Food Microbiology. 3rd Ed. McGraw-Hill Inc. New  
York, U.S.A., 1978, 537p.

- FUWA, H. - A new method for microdetermination of amylase activity by the use of amilose as the substrate. *J. Biochemistry*, 41(5):583-603, 1954
- GARVIE, E. I. Genus *Leuconostoc* and *Fediococcus*. In: SNEATH et al., eds. *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986. vol. 2, p. 1071-1079.
- GRACE, M. R. *Cassava processing*. FAO/WHO. ROME, 1977, No. 3, 155p.
- GRAMACHO, D. D. Ensaio sobre a utilização da matéria prima de mandioca (*Mandioca esculenta* Crantz) na obtenção de "carimã e polvilho azêdo". Nota prévia. In: *Projeto mandioca*. Série Pesquisa Ano II, no1, Cruz das Almas, Bahia, 1975, 187p.
- GRAVATÁ, A. G. - Mandioca for ever, carimã e polvilho azedo. *Chácaras e Quintais*, 62:440-441, 1940.
- HARDIE, J. M. Genus *Streptococcus*. In: SNEATH et al., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986, Vol. 2, p. 1043-1071.
- HARRIGAN, W. F. & McCANCE, M. E. - *Laboratory Methods in Microbiology*. Academic Press INC, New York, N.Y., 1966, 362p.
- HOLDMAN, L. V., CATO, E. P. & MOORE, E. C. - *Anaerobe Laboratory Manual*. Blacksburg, Virginia, V.P.I. Anaerobe Laboratory,

1977.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos Químicos e Físicos para Análises de Alimentos. In: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Ed. Débora D. Estella Rebocho, vol. 1, 2a. ed., São Paulo, Brasil, 1976, 371p.

KANDLER, O. & WEISS, N. Regular, nonsporng Gram-positive rods. In: SNEATH et al., eds. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1986. Vol. 2, p. 1206-1234.

LÁZARO, M. J., CARBONELL, E., ARISTOY, M. C., SAFÓN, J. & RODRIGO, M. Liquid Chromatographic determination of acids and sugars in homolactic cucumber fermentations. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72(1):52-55, 1989.

MALTA, A. - Cultura da mandioca. Boletim de Agric. Depto. de Produção Vegetal, Minas Gerais, Z:45-52, 1958.

MARAVALHAS, N. - Cinco estudos sobre a farinha de mandioca. INPA, Manaus, 1964, 9p.

MARIATH, M. M. R. & RIVERA, F. A. O consumo de mandioca e os riscos relacionados com os fatores tóxicos. Ciência, Cultura e Saúde, Paraíba, UFPB, B:43, 1986.

MAZURS, E. G.; SCHOCH, T. J. & KITE, F. E. Graphical analysis of the Brabender viscosity curves of various starches. *Cereal Chem.*, 34(3):141-52, 1957.

MENDES, B. A., MORAES, I. D. & MAUGERI, F. F. - Estudo comparativo entre as propriedades características da puba, polvilho azedo, polvilho doce e mandioca moída, visando aplicações em panificação e produção de etanol. *Anais do XI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Recife PE, 1989, pág. 141.

MOSSEL, D. A. A. & QUEVEDO, F. - *Control Microbiológico de los Alimentos*. Lima, Serie de monografias del Cleiba, 1967.

NAKAMURA, I. M. *Contribuição ao estudo da fécula de mandioca fermentada*. Campinas, 1975. 80 pp. (Tese de Mestrado) Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da UNICAMP.

NELSON, N. - A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 159:315-380, 1954.

NORMANHA, E. S. Mandioca tem variada aplicação. *In: Guia Rural*. 1966/1967, p. 240-244.

OHUCHUKU, N. S. & BALLANTINE, J. A. Fermented Cassava: Odor Active Components. *J. Agric. Food Chem.*, 31(6):1386-1387, 1983.

- OKAFOR, N.; IJIOMA, B. & OYOLU, C. Studies on the microbiology of cassava retting for fufu production. *J. Appl. Bacteriol.*, 56:1-13, 1984.
- OKE, O. L. Cassava as food in Nigeria. *World Rev. Nutr. Diet.* (London), 9:227-250, 1968.
- OYEWOLE, O. B. - Optimization of cassava fermentation for fufu production: effects of single starter cultures. *J. Appl. Bacteriol.*, 68:49-54, 1990.
- OYEWOLE, O. B. & ODUNFA, S. A. Microbiological studies on cassava fermentation for "lafun" production. *Food Microbiol.*, 5:125-133, 1988.
- OYEWOLE, O. B. & ODUNFA, S. A. Characterization and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. *J. Appl. Bacteriol.* 68:145-52, 1990.
- PEDERSON, P. *Microbiology of Food Fermentations*. 2nd ed., AVI Publishing Co., Westport CT, 1980.
- PICKEL, B. Cultura e Indústria da mandioca no século 17, segundo MacGrave. *Rev. Agric. (Piracicaba)*, 13:205-212, 1938.
- PONGSAWASDI, P. & YAGISAWA, M. - Screening and identification of a cyclomaltoextrin glucanotransferase-producing bacteria. *J. Ferment. Technol.*, 65(4):463-7, 1987.

- RYU, E. - Simple Methods for Staining Bacteria. International Laboratory for Zoonoses, Taipei, Tawan, 1979, 28p.
- SABIONI, J. B. - Produção e caracterização da ciclodextrina glicosil transferase do *Bacillus lentus* alcalofílico. Campinas, 1990. 105p (Tese de Doutorado).
- SCHOLTZ, H. B. W. - Aspectos Industriais da Mandioca. Banco do Nordeste do Brasil, Fortaleza, 1971, 203p.
- SELLARS, R. L. - Bacterial starter cultures. In: Microbial Technology. Ed. Henry J. Peppler. Reinhold Publishing Corporation, New York., 1966, 454 p.
- STANIER, R. Y., ADELBERG, E. A. & INGRAHAM, J. L. Microbial World. 4th ed.. Prentice Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1976.
- STANTON, W. R. & WALLBRIDGE, A. Fermented food process. Process Biochemistry, 4(4):123, 1969.
- TINAY, A. H., BURENG, P. L. & YAS, A.E. Hydrocyanic levels in fermented cassava. J. Food Technol., 19:197-202, 1984.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA/ ESCOLA DE AGRONOMIA. Convênio UFBA/BRASCAN Nordeste - Projeto Mandioca - Relatório Semestral de Pesquisas. No. 4, 1974, Cruz das Almas BA.

VAUGHN, R. N. - Lactic acid fermentation of cabbage, cucumbers, olives and other produce. In: Industrial Microbiology. 4th ed. Gerald Reed. AVI Publishing Co., Inc. Westport, Connecticut, 1982, 884p.

ANEXO I

TABELA 20. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 1)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (Horas)			
	0	24	48	72
<i>Agar MacConkey</i>				
Enterobactérias	$5,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^4$	0
<i>A. Sel. Corinebac.</i>				
Corinebactérias	$1,3 \times 10^2$	$3,9 \times 10^5$	$1,5 \times 10$	0
<i>Agar BHI</i>				
Contagem total	$7,9 \times 10^3$	$3,9 \times 10^7$	$1,1 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$
<i>Bacillus</i> spp.	$1,9 \times 10^3$	-	-	-
<i>Agar RCM</i>				
<i>Clostridium</i> spp.	$4,0 \times 10^2$	-	-	-
<i>Agar Azida</i>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$1,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^7$	$3,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^3$
<i>Agar MRS</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,0 \times 10$	$1,7 \times 10^6$	$2,9 \times 10^9$	$1,0 \times 10^{10}$
<i>Leuconostoc</i> spp.	$2,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^7$	$6,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$
<i>Agar Batata Dextrose</i>				
Leveduras	$1,0 \times 10$	$5,0 \times 10$	$2,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^6$

- Não quantificado



## ANEXO II

TABELA 21. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 2)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (Horas)			
	0	24	48	72
<i>Agar MacConkey</i>				
Enterobactérias	$1,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	$8,0 \times 10$
<i>A. Sel. Corinebac.</i>				
Corinebactérias	$1,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10$	0
<i>Agar BHI</i>				
Contagem total	$2,5 \times 10^4$	$6,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$	$9,2 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> spp.	$3,0 \times 10^3$	-	-	-
<i>Agar RCM</i>				
<i>Clostridium</i> spp.	$7,9 \times 10^3$	$7,3 \times 10^5$	-	-
<i>Agar Azida</i>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$5,0 \times 10$	$4,1 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^6$
<i>Pediococcus</i> spp.	-	-	-	$3,2 \times 10^6$
<i>Agar MRS</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$4,1 \times 10^3$	$1,4 \times 10^6$	$4,3 \times 10^7$	$4,0 \times 10^9$
<i>Pediococcus</i> spp.	$6,3 \times 10^2$	$1,7 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	-
<i>Agar Batata Dextrose</i>				
Leveduras	$5,0 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^5$

- Não quantificado

## ANEXO III

TABELA 22. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 3)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (Horas)			
	0	24	48	72
<i>Agar MacConkey</i>				
Enterobactérias	$2,5 \times 10^2$	$7,9 \times 10^4$	$5,0 \times 10^4$	$6,3 \times 10^2$
A. Sel. Corinebac.				
Corinebactérias	$4,0 \times 10$	$1,0 \times 10^2$	$3,2 \times 10^2$	$1,7 \times 10$
<i>Agar BHI</i>				
Contagem total	$6,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$	$1,0 \times 10^{10}$
<i>Bacillus</i> spp.	$4,0 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$
<i>Agar RCM</i>				
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-
<i>Agar Azida</i>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$7,9 \times 10^2$	$1,4 \times 10^3$	$8,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
<i>Leuconastoc</i> spp.	$4,0 \times 10$	$3,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$9,7 \times 10^4$
<i>Agar MRS</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$3,2 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$5,0 \times 10^9$
<i>Agar Batata Dextrose</i>				
Leveduras	$2,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$

- Não quantificado

ANEXO IV

TABELA 23. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 4)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)			
	0	24	48	72
<i>Agar MacConkey</i>				
Enterobactérias	$7,8 \times 10^3$	$4,0 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$3,2 \times 10^6$
A. Sel. Corinebac.				
Corinebactérias	$2,0 \times 10^3$	$2,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10$	$1,5 \times 10^2$
<i>Agar BHI</i>				
Contagem total	$2,5 \times 10^4$	$5,1 \times 10^7$	$2,8 \times 10^8$	$8,7 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> spp.	$3,0 \times 10^3$	-	-	-
<i>Agar RCM</i>				
<i>Clostridium</i> spp.	$2,1 \times 10^4$	$4,1 \times 10^4$	$5,0 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$
<i>Agar Azida</i>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$6,2 \times 10^2$	$3,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^6$
<i>Agar MRS</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,8 \times 10^4$	$4,1 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$
<i>Agar Batata Dextrose</i>				
Leveduras	$1,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	0

- Não quantificado

ANEXO V

TABELA 24. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 5)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)			
	0	24	48	72
<b>Agar MacConkey</b>				
Enterobactérias	$1,4 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$9,8 \times 10^3$	$2,0 \times 10^4$
<b>A. Sel. Corinebac.</b>				
Corinebactérias	$4,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$
<b>Agar BHI</b>				
Contagem total	$7,7 \times 10^6$	$2,1 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{10}$
<i>Bacillus</i> spp.	$2,0 \times 10^4$	-	-	-
<b>Agar RCM</b>				
<i>Clostridium</i> spp.	$8,0 \times 10^4$	-	-	-
<b>Agar Azida</b>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$5,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^8$	$7,9 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
<b>Agar MRS</b>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,0 \times 10^2$	$6,3 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$8,5 \times 10^7$
<i>Leuconostoc</i> spp.	$1,9 \times 10^3$	$1,6 \times 10^7$	$9,7 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$
<b>Agar Batata Dextrose</b>				
Leveduras	$4,2 \times 10^2$	$3,5 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$

- Não quantificado

## ANEXO VI

TABELA 25. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 6)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)			
	0	24	48	72
<b>Agar MacConkey</b>				
Enterobactérias	$2,0 \times 10^3$	$8,1 \times 10^3$	$6,3 \times 10^3$	$3,3 \times 10^4$
<b>A. Sel. Corinebac.</b>				
Corinebactérias	$3,4 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5$	$3,0 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$
<b>Agar BHI</b>				
Contagem total	$2,9 \times 10^4$	$5,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	-	-
<b>Agar RCM</b>				
<i>Clostridium</i> spp.	$7,8 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	$3,3 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$
<b>Agar Azida</b>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$8,2 \times 10^2$	$2,9 \times 10^8$	$8,9 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$
<b>Agar MRS</b>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$6,8 \times 10^2$	$3,5 \times 10^7$	$7,7 \times 10^8$	$2,0 \times 10^9$
<i>Leuconostoc</i> spp.	$4,2 \times 10^2$	$6,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$
<b>Agar Batata Dextrose</b>				
Leveduras	$2,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$5,0 \times 10^3$

- Não quantificado

## ANEXO VII

TABELA 26. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 7)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)*		
	0	24	48
<i>Agar MacConkey</i>			
Enterobactérias	$1,7 \times 10^3$	$2,1 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$
<i>A. Sel. Corinebac.</i>			
Corinebactérias	$1,6 \times 10^2$	$9,3 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$
<i>Agar BHI</i>			
Contagem total	$2,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^6$	$9,8 \times 10^8$
<i>Bacillus spp.</i>	$1,0 \times 10^3$	-	-
<i>Agar RCM</i>			
<i>Clostridium spp.</i>	$2,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^3$	$7,0 \times 10^6$
<i>Agar Azida</i>			
<i>Streptococcus spp.</i>	$2,0 \times 10^3$	$9,5 \times 10^5$	$6,1 \times 10^4$
<i>Agar MRS</i>			
<i>Lactobacillus spp.</i>	$1,9 \times 10^3$	$1,0 \times 10^6$	$1,3 \times 10^9$
<i>Leuconostoc spp.</i>	$6,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^8$
<i>Agar Batata Dextrose</i>			
Leveduras	$3,0 \times 10$	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$

\* Fermentação finalizou às 48 horas

## ANEXO VIII

TABELA 27. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 8)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)			
	0	24	48	72
<i>Agar MacConkey</i>				
Enterobactérias	$2,2 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
<i>A. Sel. Corinebac.</i>				
Corinebactérias	$1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
<i>Agar BHI</i>				
Contagem total	$2,9 \times 10^6$	$3,5 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$	$9,4 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> spp.	$3,0 \times 10^4$	-	-	-
<i>Agar RCM</i>				
<i>Clostridium</i> spp.	$9,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^6$	$9,4 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^{10}$
<i>Agar Azida</i>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$7,0 \times 10^3$	$3,3 \times 10^8$	$9,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
<i>Leuconostoc</i> spp.	$1,0 \times 10^3$	$3,0 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^8$
<i>Agar MRS</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$1,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^9$	$9,5 \times 10^8$	$2,4 \times 10^8$
<i>Agar Batata Dextrose</i>				
Leveduras	$1,2 \times 10^3$	$6,7 \times 10^2$	$6,4 \times 10^2$	0

- Não quantificado

## ANEXO IX

TABELA 28. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 9)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)*		
	0	24	48
<b>Agar MacConkey</b>			
Enterobactérias	$2,5 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4$
<b>A. Sel. Corinebac.</b>			
Corinebactérias	$1,3 \times 10^3$	$2,7 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$
<b>Agar BHI</b>			
Contagem total	$3,1 \times 10^4$	$8,0 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> spp.	$1,4 \times 10^3$	$6,0 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6$
<b>Agar RCM</b>			
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-
<b>Agar Azida</b>			
<i>Streptococcus</i> spp.	$1,7 \times 10^2$	$9,6 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
<i>Pediococcus</i> spp.	$3,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$
<b>Agar MRS</b>			
<i>Lactobacillus</i> spp.	$5,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^7$	$3,2 \times 10^7$
<i>Leuconostoc</i> spp.	$1,6 \times 10^3$	$2,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$
<b>Agar Batata Dextrose</b>			
Leveduras	$2,8 \times 10^3$	$4,0 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$

\* Fermentação finalizou às 48 horas

- Não quantificado



ANEXO X

TABELA 29. Contagens de microrganismos por meio de cultura empregado  
(Fermentação 10)

Meio de cultura/ Microrganismos (UFC/ml)	Período da fermentação (horas)			
	0	24	48	72
<i>Agar MacConkey</i>				
Enterobactérias	$1,0 \times 10^4$	$1,0 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$2,0 \times 10$
<i>A. Sel. Corinebac.</i>				
Corinebactérias	$1,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
<i>Agar BHI</i>				
Contagem total	$6,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	$8,1 \times 10^8$
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	-	-
<i>Agar RCM</i>				
<i>Clostridium</i> spp.	-	-	-	-
<i>Agar Azida</i>				
<i>Streptococcus</i> spp.	$2,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^8$	$5,3 \times 10^8$	$9,6 \times 10^8$
<i>Agar MRS</i>				
<i>Lactobacillus</i> spp.	$3,0 \times 10^4$	$3,2 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$7,4 \times 10^7$
<i>Agar Batata Dextrose</i>				
Leveduras	$1,0 \times 10^4$	$2,8 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$

- Não quantificado