

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE FARINHA
DE MANDIOCA (MANIPUEIRA) POR ACETIFICAÇÃO**

VANESSA CASSONI

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VALORIZAÇÃO DE RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE FARINHA
DE MANDIOCA (MANIPUEIRA) POR ACETIFICAÇÃO**

VANESSA CASSONI

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marney Pascoli Cereda

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Agronomia (Energia na Agricultura).

BOTUCATU-SP
Janeiro – 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C345v Cassoni, Vanessa, 1980-
Valorização de resíduo de processamento de farinha de mandioca (manipueira) por acetificação / Vanessa Cassoni.
- Botucatu : [s.n.], 2008.
xiii, 76 f. : il. color., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2008
Orientador: Marney Pascoli Cereda
Inclui bibliografia.

1. Manipueira. 2. Mandioca. 3. Águas residuais. 4. Farinha de mandioca. 5. Fermentação. 6. Acetobacter. I. Cereda, Marney Pascoli. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILI
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

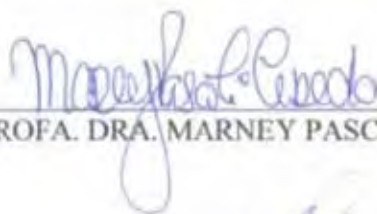
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "VALORIZAÇÃO DE RESÍDUO DE PROCESSAMENTO DE FARINHA DE
MANDIOCA (MANIPUEIRA) POR ACETIFICAÇÃO"

ALUNA: VANESSA CASSONI

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARNEY PASCOLI CEREDA

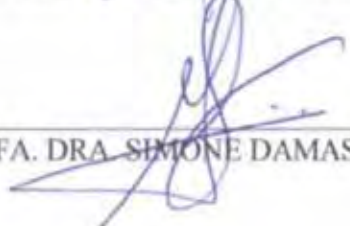
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROFA. DRA. MARNEY PASCOLI CEREDA



PROF. DR. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO



PROFA. DRA. SIMONE DAMASCENO

Data da Realização: 25 de janeiro de 2008.

Dedico:

Aos meus Pais Vagner e Sueli, pela vida, pelos ensinamentos, pelas lições, por acreditarem em mim e por fazerem parte de todos os momentos desta trajetória. À minha irmã Natália e meu namorado Fábio.

A minha irmã Sabrina (*in memoriam*), todo meu amor, minha admiração, minha saudade. Essa conquista é sem dúvida nenhuma, a nossa conquista.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que, de alguma forma, colaboram com a realização deste trabalho, e em especial:

- Ao Centro e Raízes e Amidos Tropicais – Cerat / Unesp, na pessoa de Luiz Henrique Urbano pela análise de Cromatografia.
- Aos funcionários do Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Odaléia Brasil Gomes, João Antônio Gomes Filho, Wilson Emílio, e em especial a Prof.^a Dr.^a Maria Isabel Franchi Vasconcelos Gomes pelo uso do laboratório de microbiologia.
- Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia de Botucatu e principalmente à Prof.^a Dr.^a Vera Lúcia Mores Rall pela orientação nas análises bioquímicas para a identificação das bactérias acéticas.
- Aos funcionários Jean Carlos de Oliveira e Ismael Thomazini Filho do CeTeAgro - Centro de Tecnologia para o Agronegócio da Universidade católica Dom Bosco, Campo Grande-MS que me acolheram e possibilitaram que grande parte dessa dissertação se realizasse, em especial as análises de cianeto realizadas pelo acadêmico Arioval T. Baltha.
- Ao Departamento de Recursos Naturais da Faculdade de Ciências Agronômicas- Laboratório de Fertilizantes e Corretivos, pela colaboração na realização das análises de minerais.
- À Quitando da Sun pelo fornecimento das frutas para a realização desse trabalho.
- Ao Prof. Dr. Waldemar Gastoni Venturini Filho, pela amizade, pelos ensinamentos, pela oportunidade, muito obrigada.
- Aos alunos do Laboratório de Bebidas, Andressa, Maíra, Roberto, Ana Paula, Érica, Gisele, Priscila, Suzana, Muris, pela amizade e companheirismo.
- Aos funcionários da biblioteca da FCA - Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu , que sempre me atenderam com muito carinho e respeito, minha total admiração.

- Às funcionárias da Pós Graduação. Muito obrigada pela constante eficiência, gentileza e amizade.
- À minha mãe querida, muito obrigada pela paciência nesta fase da minha vida, o seu apoio foi essencial para a realização desse trabalho.
- À Estela, minha segunda mãe, pela amizade, pela confiança em mim depositada, pelo incentivo incondicional aos estudos, pelo exemplo de bondade.
- À minha irmã Natália, minha cúmplice, minha melhor amiga, meu incentivo, sem a sua força e sua coragem eu jamais seria o que sou hoje.
- Ao meu Pai Vagner pelo carinho, amizade e total confiança em minhas decisões.
- Ao meu namorado Fábio Eduardo pelo companheirismo em tempo integral, pela inesgotável paciência, pelo apoio, pela ajuda, por tornar possível minha estadia em Campo Grande-MS para a realização deste trabalho.
- Aos meus amigos e amigas Mariângela, Juliana, Priscila, Tathiana, Isabela e Lessandra meus sinceros agradecimentos, vocês com toda certeza colaboraram de muitas formas para a realização deste trabalho.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto Processo 504208/2003-9 *Valorização dos produtos e subprodutos da mandioca em pequenos produtores e indústrias rurais*

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIV
RESUMO.....	01
SUMAMRY.....	03
1. INTRODUÇÃO.....	06
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
2.1 Mandioca.....	08
2.2 Manipueira.....	08
2.2.1 Uso da manipueira.....	12
2.3 Vinagre.....	14
2.3.1 Tipos de vinagre.....	15
2.3.2 Processo de elaboração do vinagre.....	16
2.3.2.1 Inóculo.....	16
2.3.2.2 Fermentação Alcoólica.....	17
2.3.2.3 Fermentação acética.....	18
2.3.2.3.1 Processo lento.....	18
2.3.2.3.2 Processo rápido.....	19
2.3.2.3.3 Processo submerso.....	20
2.4 Bactérias acéticas.....	21
2.5 Obtenção do inóculo.....	26
2.6 Cultivo das bactérias acéticas.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Material.....	30
3.2 Procedimento.....	31
3.2.1 Obtenção das bactérias acéticas.....	31
3.2.2 Manipueira.....	32

3.2.3 Preparo do inóculo – Caldo de laranja.....	33
3.2.4 Fermentação alcoólica.....	33
3.2.5 Fermentação acética.....	34
3.3 Ensaio.....	36
3.3.1 Primeiro conjunto de ensaios.....	36
3.3.2 Segundo conjunto de ensaios.....	38
3.3.3 Determinação de °Brix.....	43
3.3.4 Determinação do pH.....	43
3.3.5 Determinação do grau alcoólico (°GL).....	43
3.3.6 Determinação de açúcar redutor (AR) e açúcar redutor total (ART)	43
3.3.7 Determinação de acidez titulável.....	43
3.3.8 Determinação o teor de cianeto livre.....	44
3.3.9 Determinação do teor de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, manganês, enxofre, ferro, zinco, magnésio e cobre.....	44
3.3.10 Determinação do teor de umidade.....	44
3.3.11 Determinação dos ácidos orgânicos.....	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Obtenção das bactérias acéticas.....	45
4.2 Caracterização do substrato manipueira.....	47
4.3 Preparo do inóculo e caracterização do suco de laranja.....	50
4.4 Fermentação alcoólica da manipueira.....	52
4.5 Fermentação alcoólica da laranja.....	54
4.6 Ensaio de Acetificação.....	56
4.6.1 Primeiro conjunto de ensaios.....	56
4.6.2 Segundo conjunto de ensaios.....	57
4.6.2.1 Ensaio B.....	58
4.6.2.2 Ensaio C.....	61
4.6.2.3 Ensaio D.....	64
5. CONCLUSÃO.....	69

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 70

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Composição físico-química da manipueira.....	11
Tabela 2 - Composição do suco de laranja <i>in natura</i>	28
Tabela 3 - Meio básico de <i>Frateur</i>	31
Tabela 4 - Valores médios da manipueira estudada, comparados com dados de outros autores.....	49
Tabela 5 - Valores médios de análise do suco de laranja.....	52
Tabela 6 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado alcoólico de manipueira, expressos em mg L ⁻¹ em percentagem.....	55
Tabela 7 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado alcoólico de laranja, expressos em mg L ⁻¹ e percentagem.....	56
Tabela 8 – Evolução do pH e da acidificação no ensaio A (A1 e A2, repetição), expressa em g ácido acético/100 mL.....	57
Tabela 9 – Evolução do pH e da acidificação no ensaio B (B1 e B2, repetição), expressa em g ácido acético/100 mL.....	59
Tabela 10 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado acético de laranja (12 dias), expressos em mg L ⁻¹	60
Tabela 11 - Resultados do perfil de ácidos orgânicos obtidos no final da fermentação acética do suco de laranja (12 dias), ensaio B (B1 e B2, repetição) expressos em % (peso/peso).....	61
Tabela 12 – Evolução do pH e da acidificação no ensaios C (C1 e C2, repetição), expressa em g ácido acético/100 mL.....	62
Tabela 13 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado acético de manipueira (12 dias), expressos em mg L ⁻¹	63
Tabela 14 – Resultados do perfil de ácidos orgânicos obtidos no final da fermentação acética da manipueira (12 dias), ensaio C (C1 e C2, repetição) expressos em % (pe/peso).....	64
Tabela 15 – Evolução do pH e da acidificação no ensaio D, expressa em g ácido acético/100 mL.....	66

Tabela 16 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado acético de laranja e manipueira (12 dias), expressos em mg L^{-1} e percentagem.....	67
Tabela 17 - Resultados do perfil de ácidos orgânicos obtidos no final da fermentação acética da laranja e da manipueira, (12 dias), ensaio D, expressos em % (peso/peso).....	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de farinha de mandioca.....	10
Figura 2 - Modelo de representação de um fermentador para o processo lento.....	19
Figura 3 - Modelo de representação de um fermentador para o processo rápido.....	20
Figura 4 - Modelo de representação de um fermentador para o processo submerso.....	21
Figura 5 - Figura representativa dos ensaios B e C.....	35
Figura 6 - Figura representativa do ensaio D.....	35
Figura 7 - Esquema representativo do primeiro conjunto de ensaio. A metodologia foi desenvolvida em repetição.....	37
Figura 8 - Esquema representativo do ensaio de fermentação acética de laranja, ensaio B, realizado com repetição (B1 e B2).....	40
Figura 9 - Esquema representativo do ensaio de fermentação acética de manipueira, ensaio C, realizado com repetição (C1 e C2).....	41
Figura 10 - Esquema representativo do ensaio de fermentação acética de laranja e manipueira, ensaio D.....	42
Figura 11 - Aspecto das placas com meio de <i>Frateur</i> modificado com inibidores de leveduras: violeta genciana (A) e nistatina (B).....	46
Figura 12 - Aspecto das bactérias em aumento de 1000 vezes, com coloração de <i>Gram</i> e isoladas no meio de <i>Frateur</i> , utilizando nistatina como inibidor de levedura.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Açúcar redutor
ART	Açúcar redutor total
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CeTeAgro	Centro de Tecnologia de Agronegocio
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CO ₂	Dióxido de carbono
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DQO	Demanda química de oxigênio
FCA	Faculdade de Ciências Agronômicas
H ₂ S	Àcido sulfídrico
IBB	Instituto de Biociências de Botucatu
PABA	Ácido p-aminobenzóico
P.A.	Puro para análise
(NH ₄)SO ₄	Sulfato de amônio
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco
UNESP	Universidade Estadual Paulista
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

RESUMO

Tucupi é um molho ácido preparado e usado na culinária dos estados do Norte do país. Há poucas informações sobre seu preparo. A pesquisa teve por objetivo verificar a viabilidade de fermentação acética da manipueira, água residual do processamento de farinha.

A manipueira foi obtida em laboratório a partir da Fécula Branca, cultivar de polpa branca, indicada tanto para fim industrial como alimentício, cultivada em Campo Grande-MS, onde foi realizado o experimento. A manipueira foi caracterizada para cianeto livre, Brix, pH, açúcar redutor, açúcar redutor total e minerais. Para fins de comparação e compreensão do processo de acetificação da manipueira, foram estabelecidos ensaios simultâneos com suco de laranja, considerando que as frutas são tidas como substrato ideal para produção de vinagre. O suco de laranja também foi caracterizado como a manipueira e para ajustar a concentração de açúcares fermentescíveis adicionou-se sacarose comercial a manipueira com o intuito de se igualar o Brix de ambos os substratos.

Os ensaios constaram de fermentação alcoólica seguida de acetificação. A fermentação alcoólica da manipueira e do suco de laranja foram realizadas com inoculação com 10 g L⁻¹ de fermento seco da marca *Fleischmann*. Os fermentados alcoólicos obtidos foram caracterizados para °GL, AR, ART, acidez, pH, dosagem de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, manganês, enxofre, ferro, zinco, cobre e ácidos orgânicos.

Para iniciar o processo de acetificação, a fase inicial constou do isolamento de bactérias acéticas a partir de frutas fermentadas naturalmente em temperatura

ambiente. Em seguida, os microrganismos foram purificados, mantidos e multiplicados por isolamento em meio de cultura seletivo adaptado do meio de *Frateur* e a partir destes foi preparado o inóculo.

As bactérias isoladas em meio de *Frateur* apresentaram características morfológicas e bioquímicas compatíveis com o gênero *Acetobacter*, como segue: oxidase negativa, catalase positiva, ausência de formação de H₂S, ausência de formação de indol e ausência de liquefação gelatinosa.

Apesar dos substratos manipueira e suco de laranja terem iniciado a fermentação alcoólica com o mesmo valor 8,0 de Brix, o fermentado alcoólico de manipueira apresentou 4,8°GL e o de laranja apresentou 3,7°GL, além de um perfil de minerais bastante diferentes. O tempo necessário para a fermentação alcoólica de ambos os substratos foi de 48 horas em temperatura ambiente (cerca de 25-30°C). O nitrogênio presente na manipueira (700mg L⁻¹) reduziu-se em 95% após a fermentação alcoólica e houveram reduções de outros minerais (fósforo, potássio, ferro, manganês, zinco) enquanto que na fermentação alcoólica do suco de laranja destacou-se a redução do cálcio (33,33%).

O processo de acetificação adotado pode ser considerado como lento. O fermentado alcoólico de laranja apresentou maior facilidade acetificação do que o da manipueira, o que é compatível com as informações da literatura sobre a importância de fatores de crescimento encontrados naturalmente nas frutas. Entretanto a conversão de etanol em ácido acético foi baixa, com o maior valor de acidez de 1,8g de ácido acético/100 mL, enquanto que para manipueira a acetificação foi de 0,88g de ácido acético/100 mL. O baixo conteúdo de cianeto livre da cultivar utilizada e o fato da concentração de 0,00259 mg L⁻¹ permanecer estável nas fases de fermentação alcoólica e acética mostram o composto tóxico não interferiu no processo metabólico. Na fase anaeróbia não era esperada interferência, pois o cianeto livre só age sobre formas aeróbias, tanto que o teor alcoólico foi maior para a manipueira. Na fase acetogênica a baixa conversão ocorreu também para o fermentado alcoólico de suco de laranja, onde não havia cianeto livre. Resta a necessidade nutricional das bactérias acéticas como fator para explicar os resultados obtidos.

Palavra-Chave: manipueira, água residual, farinhas, mandioca, fermentação acética, *Acetobacter*, vinagre.

CASSAVA FLOUR PROCESSING RESIDUE (CASSAVA WASTE WATER) VALORIZATION BY ACETIFICATION

Botucatu, 2008. 76p.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: VANESSA CASSONI

Adviser: MARNEY PASCOLI CEREDA

ABSTRACT

The cassava waste water from Brazilian flour processing is used as base for the *tucupi* manufacture. *Tucupi* is a sauce prepared and culinary used in the north region of the country and are few information about it in the scientific literature. The research had as objective the evaluation of the cassava wastewater acetification in the *tucupi* processing.

The cassava wastewater was obtained in laboratory from the Fécula Branca with white pulp cultivar, indicated for both industrial and culinary uses, cultivated in Campo Grande-MS, where the experiment was performed. The cassava waste water was characterized for free cyanide, Brix, pH, acidity, reducing sugar, total reducing sugar and minerals.

In order to compare and understanding the acetification process of the cassava waste water there were established simultaneous assays using orange juice, considering that fruits are known as ideal substrate for vinegar production. The orange juice was characterized as the cassava wastewater and to adjust the fermentable sugar to the same concentration it was used commercial sugar cane in cassava wastewater.

The essays were alcoholic fermentation following by acetification. The alcoholic fermentation of both cassava wastewater and orange juice were performed by the inoculation dried Fleischmann yeast 10 g l^{-1} . The alcoholic fermented obtained were characterized for °GL, reducing sugar, total reducing sugar, acidity, pH, nitrogen, phosphorus, potassium, calcium, manganese, sulfur, iron, zinc, copper and organic acids

To beginning the acetic fermentation it was isolated the acetic bacteria from natural fermented fruits in room conditions. The microorganisms were purified, maintained and multiplied by isolation in a selective medium adapted from *Frateur's* medium, and from those was prepared the inoculums.

The isolated bacteria in the *Frateur's* medium presented morphologic and biochemical characteristics compatible with the *Acetobacter* genus, as following: negative oxidase, positive catalase, absence of H_2S formation, absence of indol formation and absence of gelatinous liquefaction.

Besides both the substrates had started the alcoholic fermentation with the same 8,0 Brix value, the alcoholic fermented cassava wastewater presented $4,80^\circ\text{GL}$, and the orange juice alcoholic the value of $3,74^\circ\text{GL}$. The minerals profile from the essays had different patterns. The time for the alcoholic fermentation of both the substrates to be completed was 48 hours at 25 to 30°C . The nitrogen present in the cassava wastewater (700mg l^{-1}) was reduced in 95% after the alcoholic fermentation and happened reductions in phosphorus, potassium, iron, manganese and zinc. In the orange juice alcoholic fermentation only calcium showed a 33% reduction.

The acetification process adopted may be considered as a slow one. The alcoholic fermented orange juice presented more facility for acetification than the cassava wastewater. This result is compatible with the literature information that the growing factors naturally founded in fruits are very important for the acetic bacteria to grow. However the

ethanol conversion to acetic acid was low and the biggest acidity founded was 1,8g acetic acid /100 mL for orange juice and 0,88g acetic acid %/100 ml for cassava wastewater.

The influence of cassava cyanide may be considered. In the alcoholic fermentation the cyanide influence was not expected because it acts only over the aerobic organisms. In the acetic fermentation both orange juice and cassava wastewater acetic acid content were low. The low cyanide content of the cassava variety used and the fact of this content remained stable in the alcoholic and acetic fermentation show that the level of free cyanide $0,00259 \text{ mg L}^{-1}$ was not been considered as an impeachment for the conversion of sugars in ethanol and of ethanol in acetic acid. Remaining to explain the low acetic acid yields the nutritional conditions for acetic acid bacteria to grown. Although with low acetic acid content the research proved that it is technically possible to have an acetic fermentation of the cassava wastewater.

Key words: cassava, wastewater, Brazilian cassava flour, acetic fermentation, *Acetobacter*, vinegar.

1 INTRODUÇÃO

A manipueira é gerada no processo de fabricação de farinha, pela prensagem da massa ralada da mandioca. Apresenta composição rica em nutrientes como carboidratos e minerais. Além dos nutrientes, a manipueira apresenta glicosídeos cianogênicos, como a linamarina.

Apesar das propostas baseadas em pesquisas realizadas por diversos autores, com o objetivo de agregar valor à manipueira como subproduto e diminuir a poluição ambiental, a manipueira ainda continua sem uso comercial.

No Norte do país a manipueira é fermentada e condimentada para produzir um molho ácido, o tucupi. Por razões culturais, no preparo do tucupi, os produtores locais selecionam apenas plantas de mandioca com elevado teor de cianeto.

Apesar de muito utilizado na culinária, e comercializado na região Norte do país, existem poucas informações sobre a fermentação do tucupi. Uma das hipóteses é que ocorra acetificação durante seu processamento. O tucupi é bastante valorizado, mas para que possa ser divulgado como forma de utilização da manipueira, na forma de tecnologia de baixo custo, é primordial que se estabeleçam as bases do processo de produção do tucupi.

A viabilidade de valorização da manipueira para produção de tucupi, levou à pesquisa do processo de acetificação da manipueira. A pesquisa consistiu no

isolamento de agentes de acetificação, fermentação alcoólica e acética da manipueira em seqüência.

Objetivo:

O objetivo da pesquisa foi estabelecer a viabilidade técnica de acetificação da manipueira, como forma de viabilizar futuros usos mais valorizados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mandioca

A mandioca é uma planta de origem latino americana, e sua produção está voltada para o consumo humano. Devido a sua adaptabilidade, é uma planta extremamente cultivada em áreas onde outras espécies amiláceas não se desenvolvem com a mesma desenvoltura. A mandioca pode ser utilizada diretamente para o consumo ou destinada para a indústria na fabricação de farinha ou fécula.

2.2 Manipueira

A mandioca é uma planta cianogênica, ou seja, que acumula glicosídeos cianogênicos, dos quais o principal e de maior concentração na mandioca é a linamarina. A linamarina é hidrolisada enzimaticamente por uma β -glicosidase, denominada linamarinase. Esta enzima encontra-se separada da linamarina quando o tecido da mandioca está intacto, mas quando o mesmo é dilacerado, a reação enzimática ocorre, em condições ótimas de 25°C e pH entre 5,5 e 6,0. Com isso, quando a enzima hidrolítica da própria planta

(linamarinase) permanece ativa em seus derivados, esta catalisa a reação que libera moléculas de glicose, acetona e ácido cianídrico (PANTAROTO e CEREDA, 2001).

No processo de produção da farinha, tem-se um líquido residual, obtido na prensagem da massa ralada da mandioca, denominado manipueira. A linamarina e seus metabólitos, por serem solúveis em água, são arrastados com a manipueira (CEREDA, 2001). A massa ralada, no processo de obtenção de farinha de mandioca, perde de 20 a 30% de água. A manipueira resultante da prensagem da massa ralada arrasta cerca de 5 a 7% de fécula, 2 a 3 % de carboidratos, 1,0 a 1,5% de proteínas e menos de 1% de minerais. O processamento de uma tonelada de raiz produz cerca de 200 a 300 litros de manipueira, que contém 12 a 18 Kg de fécula (polvilho) em suspensão (INSTITUTO AGRONÔMICO, 1989). Já Del Bianchi (1998) relatou, em um estudo de balanço de massa no processamento da mandioca, que o processamento de uma tonelada de raiz requer entre 970 a 1100 litros d`água para lavagem das raízes, e gera de 200 a 400 litros de manipueira.

Na industrialização da mandioca são gerados diversos resíduos, tais como casca, farelo e manipueira, que é o resíduo líquido. Os efluentes de uma fábrica de farinha de mandioca podem ser divididos em duas categorias básicas: as águas de lavagem das raízes e a água proveniente da prensagem da massa de mandioca, denominada água da prensa ou manipueira. As águas de lavagem possuem DQO de 2600 mg L⁻¹ (PAWLOWSKI, 1991) embora em maior quantidade (1 a 3 m³.t.⁻¹ de mandioca processada) possuem menor poder poluente. A manipueira é bem mais agressiva ao ambiente, tanto pelo alto teor de cianeto total quanto pela carga orgânica.

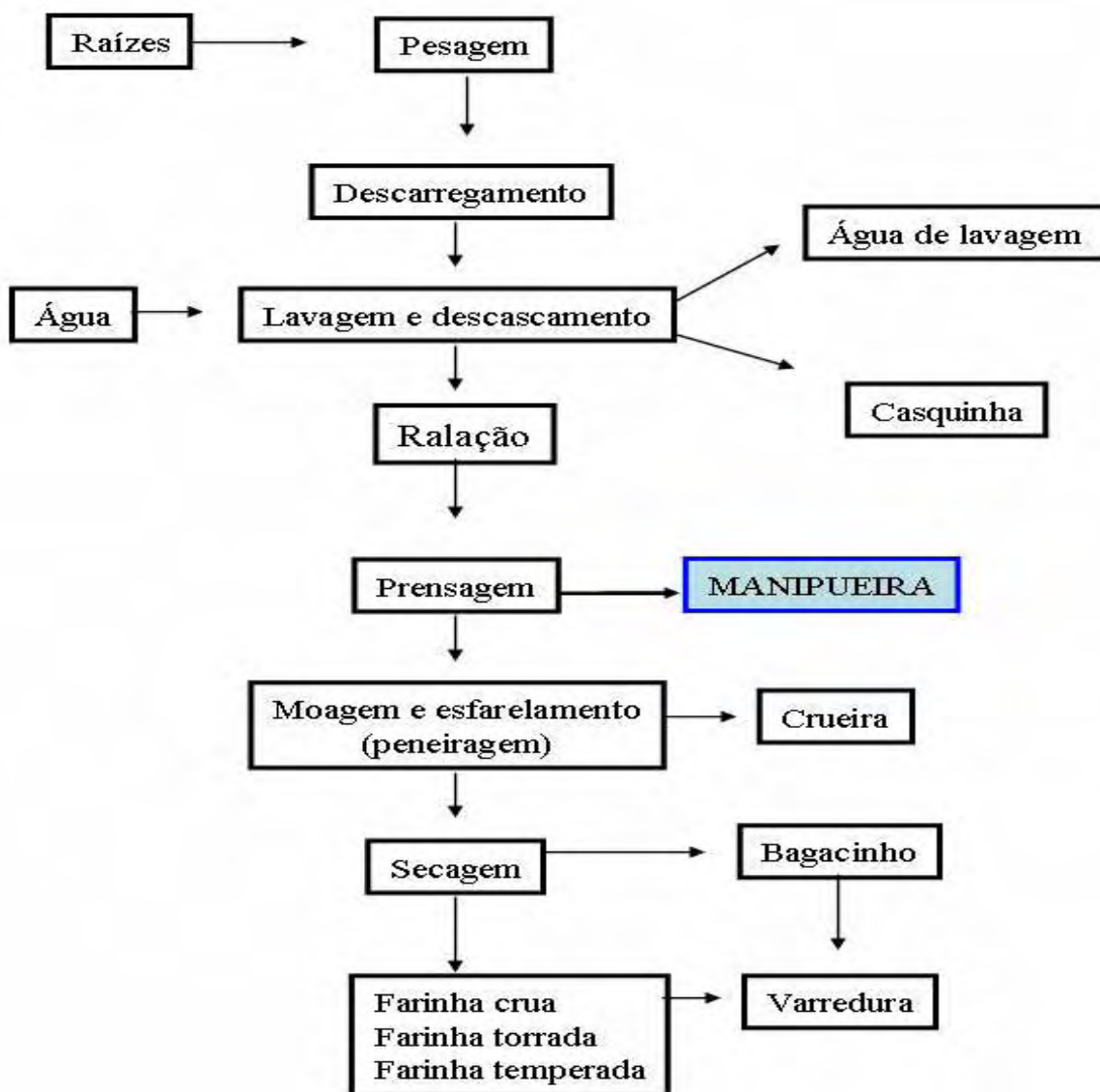


Figura 1 - Fluxograma do processo de produção de farinha de mandioca.

Fonte: NEVES, 2004.

A composição físico-química da manipueira é variável, dependendo da forma de processamento da raiz, principalmente em relação à matéria orgânica. Todo amido residual deve ser retirado da manipueira antes de seu despejo ou tratamento. A manipueira caracteriza-se por conter a maioria das substâncias solúveis do tubérculo além de algumas insolúveis em suspensão. A composição química da manipueira sustenta a potencialidade desta como nutriente, haja vista sua riqueza em potássio, magnésio, fósforo, cálcio, enxofre, ferro e micronutrientes em geral. Porém, a presença do cianeto ainda é vista como um grande obstáculo para a utilização desse resíduo como subproduto da mandioca (MAGALHÃES, 1998).

Tabela 1 - Composição físico-química da manipueira segundo diversos autores

Componentes	Damasceno, 1998	Cereda, 2001	Nitschke, 2003	Maróstica, 2006
Umidade (%)	-*-	93,75	-*-	-*-
Acidez titulável	-*-	3,27	-*-	-*-
pH	5,50	6,27	5,8	5,3
	mg L⁻¹			
Fósforo	83,30	160,84	244,5	368,8
Potássio	895,00	1863,50	3472,60	3641,00
Magnésio	173,00	405,00	519,00	438,10
Ferro	8,00	15,35	7,80	2,72
Cobre	0,75	1,15	1,00	1,11
Zinco	4,50	4,20	2,80	3,01
Manganês	1,50	3,70	1,70	3,46
Enxofre	38,00	19,50	154,00	61,35
Cálcio	184,00	227,50	292,53	236,00
Nitrogênio Total	1,60	0,49	2,08	1,72

Legenda: -*- Sem informações

Na maioria das indústrias, a manipueira gerada tem como destino as lagoas de estabilização, aonde sofre ação de agentes naturais, tais como fotodecomposição, precipitação e atividade microbiana local. Não ocorre qualquer tratamento adicional no sentido da otimização do processo, para o aproveitamento deste efluente como um subproduto. Este resíduo tende a penetrar no solo, alcançando lençóis freáticos e contaminando aquíferos, além de produzir odor desagradável, atrair insetos e degradar a vegetação adjacente (CAMILI, 2007).

Várias alternativas de uso da manipueira já foram estudadas, mas permanecem como potencial.

Visando o controle de danos ambientais, a CETESB exige que as lagoas de tratamento sejam impermeabilizadas com geomembrana ou outra técnica de efeito semelhante ou superior (CETESB, 2005).

2.2.1 Uso da manipueira

Segundo Pantaroto (2001) microorganismos presentes em manipueira, assim como os presentes nos ambientes sujeitos a contínuos descartes destes efluentes líquidos, encontram-se naturalmente adaptados ao conteúdo cianogênico de seu habitat. Portanto, estes microorganismos degradam tal conteúdo cianogênico por atividade enzimática ou metabolismo alternativo à cadeia respiratória, podendo assim, serem aplicados na destoxificação destes resíduos. A autora selecionou linhagens hábeis em metabolizar linamarina *in vitro*, usando culturas microbianas anaeróbias, isoladas de amostras de manipueira e solos adjacentes aos locais de descartes dos efluentes. Neste estudo foram isoladas 118 culturas, e destas 33 linhagens foram avaliadas quanto à degradação de linamarina “in vitro”, porém apenas 8 linhagens apresentaram-se capazes de degradar a mesma.

As análises físico-químicas da manipueira encontradas na literatura mostram que a manipueira é apropriada para o cultivo do fungo *Aspergillus niger*, com alto potencial de rendimento na conversão de carboidratos para ácido cítrico. Portanto, este resíduo poderia ser utilizado como substrato para a produção de ácido cítrico, porém haveria a necessidade de enriquecimento da manipueira com sacarose, devido a ausência de carboidratos suficientes para a conversão (CABELLO e LEONEL, 2001).

Pesquisa realizada por Menezes (2001) apontou a possibilidade de se produzir proteína microbiana a partir de manipueira, já que este resíduo não tem valor comercial. Esta seria uma forma de se agregar um valor ao resíduo, diminuindo seu potencial poluidor. Foi relatado que, além do alto custo do processo, a baixa quantidade de carboidrato disponível no resíduo inviabilizaria a produção.

Segundo Damasceno (1998) é possível cultivar o microrganismo *Geotrichum fragrans* em manipueira. Este microrganismo originário do próprio resíduo é resistente ao cianeto, produz biomassa e exala aroma de frutas em decorrência da síntese de compostos voláteis. A manipueira apresenta o teor médio de açúcares totais de 58,18g L⁻¹, dos quais 37,96g L⁻¹ são açúcares redutores. Considerando-se que o metabolismo do microrganismo apresenta consumo de açúcares redutores (frutose e glicose) seu cultivo resulta em redução de 40% da DQO da manipueira.

Além de Damasceno, Maróstica (2006) também utilizou a manipueira como meio de cultura para a biotransformação de terpenos (hidrocarbonetos, principais responsáveis pelo aroma dos óleos essenciais) com o objetivo de produzir compostos de aromas funcionais.

Saraiva (2007) utilizou a manipueira na irrigação de uma lavoura de milho, e em seguida avaliou a fertilidade do solo. Este trabalho foi justificado pela riqueza da manipueira em compostos como nitrogênio, fósforo e principalmente potássio. Os resultados da pesquisa demonstraram que de modo geral a irrigação do solo com manipueira tratada por sistema de lagoas, proporcionou o aumento de todos os parâmetros químicos do solo em proporções adequadas (SARAIVA, 2007).

O incentivo para a utilização da manipueira como matéria-prima vem se desenvolvendo, já que além de contribuir para a redução da poluição ambiental, permite uma valorização econômica deste produto. Ponte (2001) relatou que a eficácia da manipueira como nematicida e fungicida é baixa. Como nematicida, a manipueira reduziu a comunidade rizobiana (*Rhizobium* ssp) do solo, um agravante quando o solo tratado destinava-se ao plantio de leguminosas. Contudo, o autor constatou a potencialidade da manipueira como inseticida, já que em Madagascar a sua utilização para tal fim é conhecida e aprovada.

O tucupi é um condimento caseiro, típico do Amazonas, Pará e norte do Maranhão. É preparado a partir de manipueira, obtida tradicionalmente de mandioca amarela. A manipueira é coletada e em seguida decantada para a retirada da goma. Após, é fermentada por 24 horas, antes de ser fervida com pimenta, sal, alho e coentro (CEREDA e VILPOUX, 2003). Tem-se assim o tucupi, o qual pode ser considerado um tipo de vinagre.

E, neste sentido, ressalta-se que a grande maioria dos molhos utilizados na culinária nacional e internacional é elaborada à base de vinagre.

2.3 Vinagre

A palavra vinagre é originária do francês e significa vinho azedo, o que se explica uma vez que foi originalmente obtido pela acetificação do álcool do vinho. Pode-se produzir vinagre com diferentes matérias primas, basicamente a partir de qualquer substância que contenha açúcar e nutrientes necessários para uma fermentação alcoólica seguida de uma fermentação acética. As características do vinagre dependem da matéria-prima utilizada para fermentação (MARTINELLI FILHO, 1982).

A fabricação do vinagre proporciona um meio de utilização de matéria-prima inaproveitável dos estabelecimentos industriais de frutas, ou qualquer outra indústria, que gere material açucarado, e especialmente de propriedades rurais, que de outra forma, não poderiam competir no mercado (BORTOLINI, et al., 2001).

Em muitos países, o vinagre é produzido a partir do suco fermentado de frutas, como uva, maçã, abacaxi, framboesa, laranja, ameixa, pêssigo, morango, entre outras. Também se encontra vinagre de tubérculos amiláceos como batata, mandioca, batata-doce, de cereais como a cevada, trigo, arroz, milho e outras matérias açucaradas ou alcoólicas como mel, melaço, aguardente, champanhe, cerveja, etc. No caso dos mostos amiláceos, há necessidade prévia de conversão do amido em açúcares fermentescíveis. Na Europa, o vinagre fino chega a custar dezenas de dólares, sendo comum a realização de testes organolépticos por degustadores experientes, semelhantes aos testes com vinhos, cervejas e uísques. Já em muitos lugares, como o Brasil, o vinagre não tem valor, e é produzido por matéria-prima cada vez mais barata, obtendo-se soluções ácidas sem qualidade (AQUARONE et al., 2001).

Em vinagre produzido através de um fermentado de suco de fruta, por vezes é necessário acrescentar certos nutrientes, como enxofre e fósforo, indispensáveis ao crescimento de microrganismos (BORTOLINI, et al., 2001).

Na Europa e na Ásia, consagrou-se o uso do vinagre como condimento e alimento funcional, realizando-se estudos detalhados sobre a composição dos vários tipos destes e seus efeitos benéficos à saúde. Embora as propriedades funcionais do vinagre não

estejam totalmente esclarecidas, acredita-se que exerça efeito positivo no controle da pressão arterial, e no pH do estômago, para combater a gastrite. Seu efeito bactericida, a ação antioxidante nas células, e o ataque aos radicais livres (que poderia evitar a manifestação de certos tipos de cânceres) também são considerados (AQUARONE et al., 2001).

Segundo Tan (2005) do total da produção de vinagre nos Estados Unidos, 33,7% destina-se para consumo de mesa, 16,8% é destinado para a produção de temperos e molhos, 14,8% para conservas como picles, 11,5% no preparo de mostarda, 8,5% no preparo de derivados de tomate, 10,5% destina-se a outros produtos alimentícios e 4,2 % destina-se a outros produtos não alimentícios.

2.3.1 Tipos de vinagre

O vinagre *Agrim*, uma mistura do vinagre de álcool com vinagre de vinho tinto ou branco é uma das várias opções do mercado (AQUARONE et al., 2001).

O vinagre balsâmico ou *Aceto* balsâmico é elaborado a partir de extratos vegetais de carvalho, sacarose e carboidrato caramelizado, e possui acidez de 6%. Esta categoria, que provém da união de vinho tinto ou vinho branco ao mosto de uva, é diferenciada pelo longo tempo de maturação em barris de madeira. Tem sabor doce e levemente azedo. A uva utilizada é da espécie *Trebbiano* (CASTELO, 2007; TAN, 2005).

Alguns tipos de vinagres, conhecidos nos Estados Unidos como vinagre de champanhe, são produzidos a partir de vinho branco e seco, obtido a partir de uvas *Chardannay* ou *Pinot Noir*, ambas utilizadas para fazer champanhe (TAN, 2005).

Existe também o vinagre destilado, que apresenta sabor adstringente e é feito a partir de grãos. Geralmente incolor, sua utilização é destinada ao preparo de picles (TAN, 2005).

O vinagre de malte é popular na Inglaterra, e é produzido a partir de cevada fermentada e grãos. Seu sabor é influenciado pelo armazenamento em barris de madeira (TAN, 2005).

O vinagre de vinho de arroz, consumido pelos Chineses a mais de 5000 anos pode ser de três tipos: vermelho, usado para conserva de alimentos, ou como

condimento em sopas; o branco, mais utilizados em refeições doces e azedas; e o preto, mais comum em molhos (TAN, 2005).

O material de origem do vinagre agrega paladar diferenciado a cada tipo. Nos EUA, o preferido é o vinagre de suco de maçã. Nos países latinos, o mais vendido é o de uva, e na Inglaterra, o vinagre originário de malte é o mais procurado (MARTINELLI FILHO, 1982).

A metodologia para a produção de vinagre diferencia-se somente no preparo das diferentes matérias-primas. O processo de fermentação acética segue um padrão empírico. O arroz, por exemplo, passa primeiramente por uma sacarificação, que é a transformação de arroz em sakê, também chamado de vinho de arroz. O próximo passo é a fermentação alcoólica seguida de fermentação acética (CASTELO, 2007).

2.3.2 Processos de elaboração de vinagre

2.3.2.1 Inóculo

Chama-se inóculo, pé-de-cuba ou pé-de-fermentação um volume de suspensão de microrganismos, em concentração adequada, capaz de garantir, em condições econômicas, a fermentação de um dado volume de mosto. Para que se obtenha um inóculo com capacidade produtiva elevada, deve-se dar condições para que o microrganismo desejado seja propagado, que incluam desde sua manutenção até a propagação propriamente dita. Durante a fase de propagação do inóculo deve-se tomar cuidados especiais a fim de evitar contaminações. Nessa fase, em processos aeróbios, um foco potencial de contaminação é o ar fornecido ao sistema, o qual deve ser previamente esterilizado. A partir da cultura estoque, propaga-se o microrganismo por meio de metodologia conveniente. Normalmente na fase inicial, passa-se do meio sólido, em condições assépticas, para um tubo de ensaio contendo meio líquido esterilizado, adequado para o desenvolvimento microbiano. Após incubação por um determinado tempo, que depende do tipo de microrganismo cultivado, transfere-se o conteúdo desse tubo a frascos apropriados para agitadores rotativos contendo meio

esterilizado. Todas as transferências devem ser feitas em condições assépticas e os frascos devidamente fechados, porém permitindo a entrada de ar, devido à natureza aeróbia dos microrganismos. A cada passo, os organismos devem crescer rapidamente, sendo as transferências feitas na fase logarítmica de crescimento (ARORA e CARIOCA, 1984).

O inóculo para a produção de vinagre é o iniciador do processo de acetificação. Normalmente é utilizado um vinagre forte não pasteurizado. O vinagre forte é adicionado ao mosto após o fim da fermentação alcoólica. É a partir deste ponto que se diferencia o processo de acetificação e este deve ser escolhido dependendo do objetivo que se pretende atingir. Como por exemplo, as fábricas de vinagre utilizam o processo rápido de fermentação, em acetificadores, com o objetivo de produzir maior quantidade de vinagre em menor tempo (WOOD, 1998).

2.3.2.2 Fermentação alcoólica

Ao iniciar o processo de produção de vinagre, primeiramente, a matéria-prima deve passar pelo processo de fermentação alcoólica e em seguida para fermentação acética.

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbio. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é, em geral, a principal no processo. As fermentações alcoólicas e acéticas devem ocorrer de forma separada. Caso a fermentação acética inicie sem que a fermentação alcoólica tenha sido finalizada, ocorrerá a inibição das leveduras, proporcionando resíduos de açúcares não convertidos, gerando baixa acidez. A temperatura ideal para a fermentação alcoólica está na faixa de 25°C e o pH ótimo é 4,5 (WOOD, 1998).

Para o processo de fermentação alcoólica proporcionar um produto final de boa qualidade, o melhor é partir de uma cultura pura da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Em relação à fermentação acética, o mais indicado é utilizar uma cultura mista de bactérias acidificantes e de mesmo gênero (AQUARONE et al., 2001).

No processo de fermentação alcoólica a conversão de açúcar para álcool, apresenta a proporção de geralmente de 2:1 (AQUARONE, 2001).

Quando o homem adquiriu conhecimento sobre a produção do vinagre, o método de produção utilizado foi denominado processo lento. Com a

industrialização, e o aumento do consumo de vinagre, tornou-se imprescindível a elaboração de novos métodos para a obtenção do mesmo. Foram criados então o processo rápido e processo submerso de fermentação acética.

2.3.2.3 Fermentação acética

2.3.2.3.1 Processo Lento

Também conhecido como processo de Orleans, é o meio mais antigo de se produzir vinagre. Utiliza-se um barril de madeira na horizontal, com orifícios em suas laterais que permitem a passagem de ar. Na porção inferior do barril, existe uma torneira lateral utilizada para retirar material acetificado. Na porção superior, existe um orifício utilizado para a introdução de material a ser acetificado (MARTINELI FILHO, 1982; WOOD, 1998).

Inicialmente, adiciona-se cerca de 60L de vinagre forte não pasteurizado, juntamente com 15L de fermentado alcoólico. A cada 7 dias, durante um mês, adiciona-se 15L de fermentado alcoólico, até se atingir 2/3 da capacidade do barril. Na superfície do fermentado alcoólico, forma-se um filme de bactérias ou “mãe do vinagre”. O ideal é que este filme não seja rompido, para que a acetificação ocorra mais rapidamente. Na quarta semana, retira-se 15L de vinagre e repõe-se 15L de fermentado alcoólico, repetindo-se essa operação semanalmente (AQUARONE et al., 2001).

Para aperfeiçoar este processo, algumas medidas de controle foram desenvolvidas, tais como: controle de temperatura na faixa de 20° a 25°C; rígida periodicidade na retirada de vinagre e adição de fermentado alcoólico; trabalhar com maior teor de acidez possível; trabalhar em ambiente escuro para evitar contaminação por fungos e catálises indesejáveis (AQUARONE et al., 2001; MARTINELI FILHO, 1982; WOOD, 1998).

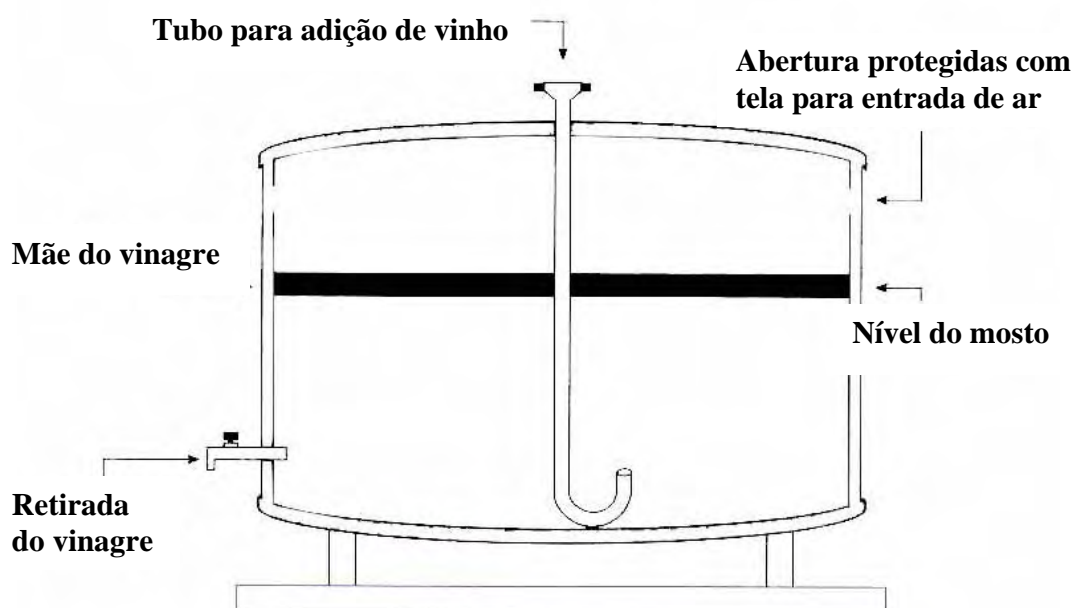


Figura 2 – Modelo de representação de um fermentador para o processo lento

Fonte: AQUARONE, 2001

2.3.2.3.2 Processo Rápido, de *Shuzinback*, *boerhave* ou alemão

Teve início em 1832, é ideal para produção em grande escala. Este método utiliza um fermentador simples, que consiste em um tanque cilíndrico que pode ser de diversos tamanhos. O interior é dividido em três partes, a superior (onde entra o líquido) a intermediária e a inferior (onde o vinagre é retirado). A parte intermediária é a maior e é preenchida com aparas de madeira, sabugos de milho ou outro material, o que propicia uma grande superfície, e é nela que as bactérias acéticas se desenvolvem. O líquido é introduzido na porção superior, por meio de um alimentador automático, de forma gotejante sobre o material de suporte, no qual também se desenvolve um filme de bactérias acéticas. O ar entra pelo fundo falso da região mediana, torna-se quente e sobe para ser aspirado por cima. O processo de oxidação libera calor em quantidade considerável, e com isso há necessidade de controlar a temperatura para que não ultrapasse 30°C. O controle de temperatura é feito por serpentinas resfriadoras, pelo ajustamento de fluxo de ar, da entrada de líquido a ser acetificado e também por resfriamento da matéria-prima antes de ser introduzida no fermentador. Quando um novo

fermentador for usado, inicialmente, deve-se colocar o vinagre na parte mediana contendo bactérias acetificantes ativas que possam inocular o material de suporte. Com isso, formará um novo filme de microrganismos necessários para futura acetificação. Posteriormente, o líquido acetificado com vinagre é gotejado, passando pelas aparas de madeira para o desenvolvimento bacteriano e a seguir é recirculado (MARTINELLI FILHO, 1982).

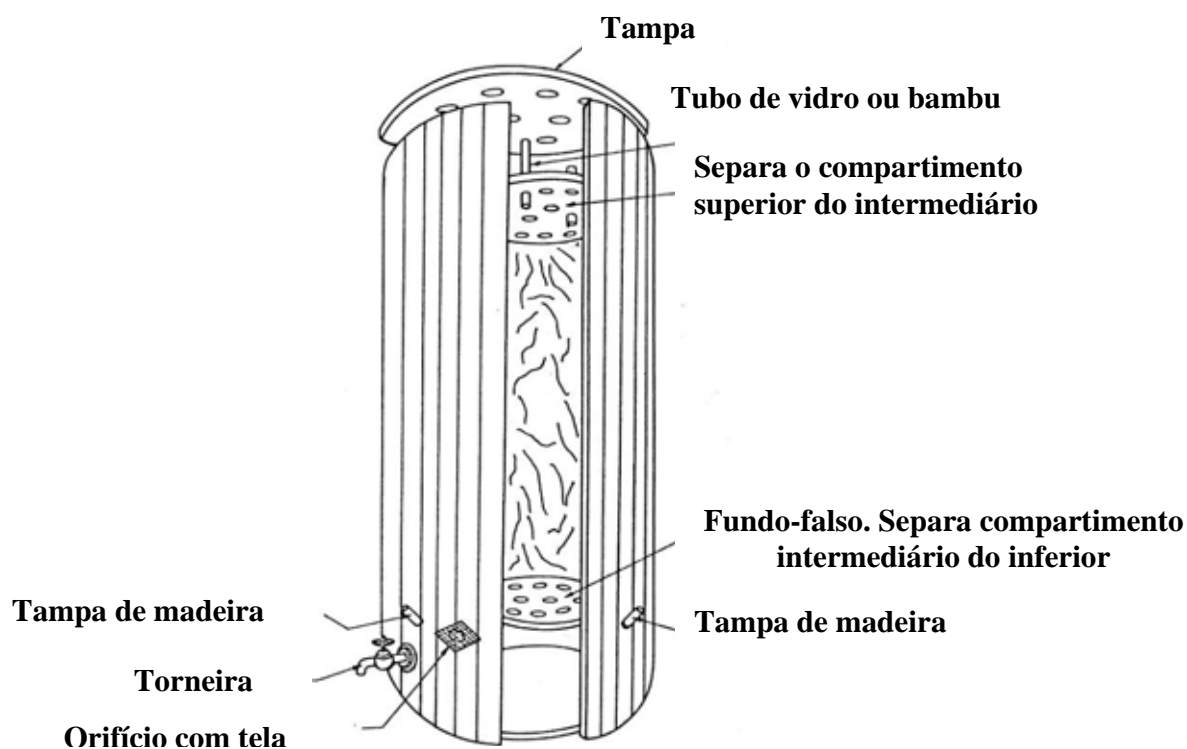


Figura 3 - Modelo de representação de um fermentador para o processo rápido.

Fonte: MARTINELLI FILHO, 1982.

2.3.2.3.3 Processo Submerso

A alta eficiência é um dos fatores que se destaca neste processo. São utilizados fermentadores de aço ou madeira, com equipamentos que fornecem um monitoramento contínuo à fermentação acética. Henrich Frings-Bonn, na Alemanha, na década de 50, foi o responsável por desenvolver e colocar em prática a fermentação acética submersa. O acetificador possui um sistema de aeração tipo auto-aspirante, localizado no

fundo do tanque, um dispositivo quebra-espuma por centrifugação, localizado na parte superior do tanque, por onde também saem os gases efluentes e um sistema automático de descarga do vinagre forte e admissão de novo meio. Uma seleção natural das bactérias acéticas gera uma melhor produtividade e rendimento através de uma fermentação induzida em meio de concentração total elevada. Essas concentrações elevadas selecionam uma única cepa de bactérias acéticas, as quais são especializadas e altamente competentes (AQUARONE et al., 2001).

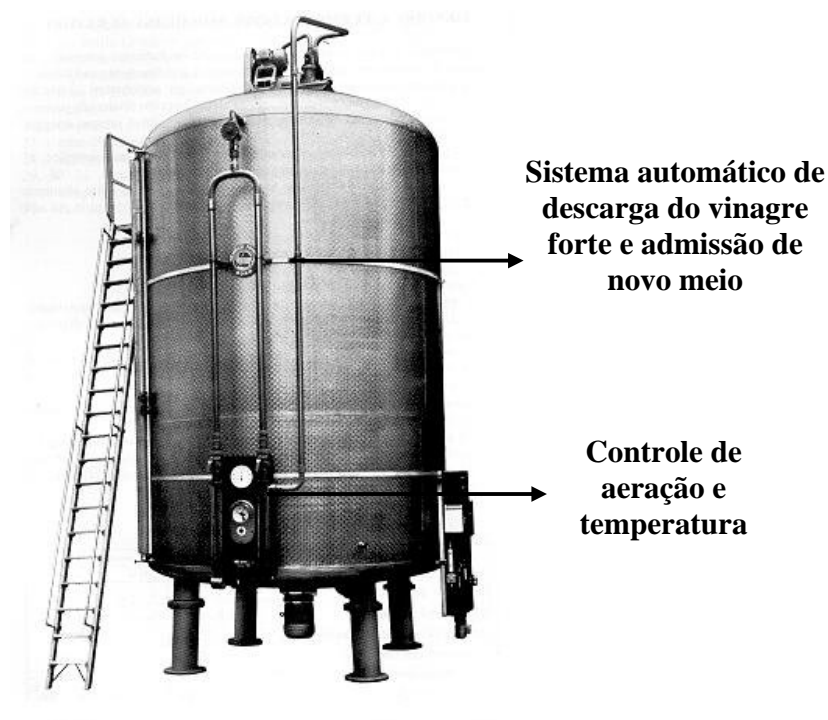


Figura 4 – Modelo de representação de um fermentador para o processo Submerso.

Fonte: MENEGUZZO E RIZZON, 2006.

2.4 Bactérias acéticas

As bactérias acéticas pertencem à família *Acetobacteraceae* e apresentam-se em dois gêneros, *Acetobacter* e *Gluconobacter*. O grupo de bactérias com melhor produtividade de fermentação acética são as *Acetobacter* (DE LEY et al., 1984 apud HOLT et al., 1994).

Segundo Holt et al., (1994) o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* tem três espécies do gênero *Acetobacter*: *A. aceti*, *A. pasteurianus* e *A. peroxidans*. A espécie *A. aceti* possui quatro subespécies: *A. aceti*; *A. orleanensis*, *A. xylinum*; *A. liquefaciens*. A espécie *A. pasteurianus*, por sua vez com cinco subespécies: *A. pasteurianus*, *A. lovaniensis*, *A. estunensis*, *A. ascendens* e *A. pavadoxus*.

As bactérias do gênero *Acetobacter* apresentam dimensões de 0,6-0,8µm, com formato de bastonetes elipsoidais, retos ou ligeiramente curvos. Formas involuídas são frequentes em algumas cepas e podem ser em forma de espiral, alongadas, em forma de bastão, curvadas ou filamentosas. Algumas células apresentam motilidade, outras não. Quando móveis, os flagelos são periféricos ou laterais. Não há formação de endósporo. São *Gram* negativas e algumas vezes *Gram* variáveis. Apresentam metabolismo respiratório. Suas colônias são pálidas. A maioria das cepas não possui pigmentos, porém uma pequena parcela produz pigmentos marrons solúveis em água, ou colônias rosa. As *Acetobacter* apresentam catalase positiva, oxidase negativa, ausência de liquefação gelatinosa, ausência de formação de indol como também formação de H₂S. Apresentam-se isoladas, em pares ou em cadeias. São comumente encontradas em frutas, vegetais, mel, flores, sakê, tequila, vinho de palma, kefir, levedura de cervejaria, vinagre, cana de açúcar, nata e solo de jardim. Estão envolvidas na acidificação bacteriana de sucos de frutas e bebidas alcoólicas como cerveja e vinho, e na produção de vinagre. São capazes de fermentar vários açúcares e oxidam etanol para ácido acético. O acetato e o lactato são oxidados para CO₂ e H₂O. As melhores fontes de carbono para seu crescimento são etanol, glicerol e lactato. As espécies capazes de oxidar o ácido acético estão subdivididas em dois grupos de organismos, pela capacidade ou não de utilizar sais de amônio como única fonte de nitrogênio. A temperatura ótima é de 25-30°C. O pH para seu crescimento é de 5,4-6,3. A espécie representativa do gênero *Acetobacter* é o *A. aceti*, que é capaz de utilizar sais de amônio como única fonte de nitrogênio, tais como as espécies: *A. mobile* e *A. suboxidans* (DE LEY et al., 1984 apud HOLT et al., 1994).

Outro grupo de bactérias produtoras de ácido acético são as do gênero *Gluconobacter*, as quais apresentam semelhanças com as bactérias do gênero *Acetobacter*. Suas células são elipsoidais ou em forma de bastões, de 0,5-1,0 x 2,6-4,2 µm. Ocorrem sozinhas ou em pares, raramente em correntes. Por vezes apresentam formas involuídas como células alargadas e irregulares. Não são formadoras de esporos. São *gram* negativas, raramente

gram variáveis. Podem ser móveis ou não, e quando móveis as células possuem de 3-8 flagelos polares e raramente um flagelo único. São obrigatoriamente aeróbias, entretanto, artigos recentes demonstram que essas cepas são capazes de reduzir o tiosulfato para H₂S. O ácido sulfídrico é formado em meio contendo açúcar e tiosulfato. As colônias são pálidas. A temperatura de crescimento ideal está na faixa de 25-30°C e não crescem em temperatura de 37°C ou mais. O pH ótimo está entre 5,5-6,0, porém a maioria das cepas crescem em pH 3,6. São catalase positiva e oxidase negativa, não há formação de nitrato, assim como não há liquefação gelatinosa e produção de indol. Uma das principais diferenças em relação às bactérias do gênero *Acetobacter* é que as do gênero *Gluconobacter* oxidam etanol para ácido acético, porém não apresentam a capacidade de oxidar acetato ou lactato para CO₂ e H₂O e ainda, o ácido produzido é formado a partir de D-glicose e D-xylose. Há preferência por açúcar a álcool. As melhores fontes de carbono são, em ordem decrescente, D-manitol, sorbol, glicerol, D-frutose e D-glicose. Todas as cepas produzem ácido 2-cetogluconico a partir de D-glicose, e a maioria das cepas também forma ácido 5-cetogluconico. As cepas são encontradas nas mesmas fontes em que as bactérias *Acetobacter*, como flores, frutas, mel de abelha, cidra, cerveja, vinho, vinagre, cerveja Bantu Sul Africana, seiva de palmeira e solo de jardim. O meio padrão para isolamento é o meio etanol de *Frateur* (DE LEY et al., 1984 apud HOLT et al., 1994).

No processo de fabricação de vinagre, parte-se do álcool obtido de matéria-prima fermentada, que pode ser de fruta, malte, soro de leite, glicose ou arroz. É a partir desses substratos que as necessidades de adição de nutrientes para o metabolismo celular das bactérias são calculadas. Contudo, os fatores de crescimento dependem da fonte de carbono fornecida. Por esta razão a necessidade de vitaminas está diretamente relacionada ao substrato oferecido para fermentação acética. Todos os seres vivos necessitam de fontes de energia e nutrientes para poder exercer suas atividades metabólicas, neste caso, para transformar o etanol em ácido acético (SANTOS JR, 2004).

A massa celular das bactérias acéticas é formada basicamente pelos elementos carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio. Elementos como fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, sódio e ferro são menos abundantes, porém não menos significativos para o metabolismo bacteriano. Um dos fatores mais importantes requeridos pelas bactérias são as vitaminas. Para o cultivo de microrganismos em laboratório é necessário

a adição de minerais e vitaminas ao meio, principalmente quando são utilizadas fontes de nutrição com composição desconhecida, o que pode acarretar deficiência desses elementos (SANTOS JR, 2004).

As bactérias do gênero *Acetobacter* apresentam algumas exigências nutricionais e necessitam de algumas vitaminas do complexo B, tais como, tiamina, ácido pantotênico e nicotínico. Algumas espécies demonstram necessidade de ácido p-aminobenzênico (DE LEY et al., 1984).

Santos Jr. (2004) avaliou os fatores nutricionais de duas linhagens de bactérias acéticas, uma provinda de uma fábrica de vinagre, *Acetobacter* sp, e outra linhagem padrão, *Acetobacter aceti* CCT 2565. O autor constatou que as necessidades nutricionais foram diferentes para as bactérias avaliadas. Avaliou 7 tipos de vitaminas e 5 tipos de minerais, em diferentes concentrações. Ao fim de seu experimento, encontrou como resultado que, para a linhagem padrão de *Acetobacter aceti*, além das fontes de carbono e nitrogênio como manitol e sulfato de amônio respectivamente, a máxima produção de massa celular ocorreu quando foi adicionada solução de sais (macronutrientes) de boro, ferro, PABA (ácido p-aminobenzóico) tiamina e ácido nicotínico nas condições de pH 6,0 e 30°C. Para a bactéria selvagem *Acetobacter* sp, além das mesmas fontes de nitrogênio e carbono utilizada para *Acetobacter aceti* CCT 2565, foi necessário adicionar solução de sais (macronutrientes) molibdênio, boro, zinco, ferro, manganês e vitaminas como PABA, piridoxina (B6) cianocobalamina (B12) nas condições de pH 6,0 e 30°C.

Mostos obtidos a partir de frutas, cereais, mel, ou qualquer outra substância que contenha fonte de açúcar, vitaminas e alguns minerais, normalmente são suficientes como nutriente, enquanto o mosto obtido por diluição de etanol ou açúcar necessita complementação (AQUARONE et al., 2001).

A questão do meio de cultura ideal para isolar bactérias acéticas é discutida desde 1868 por Pasteur (apud RAO e STOKES, 1953). Rao e Stokes (1953) também realizaram estudos a esse respeito e chegaram a conclusão de que as diferentes espécies de *Acetobacter* desenvolvem-se com seu melhor desempenho nos diferentes meios de culturas. No *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de Krieg e Holt (1984) consta-se que o meio de *Frateur* é o indicado para isolar *Acetobacter* sp.

O *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1984) e a nona edição do *Manual of Determinative Bacteriology* (1994) relataram que o meio de cultura capaz de proporcionar o desenvolvimento de todas as cepas do gênero *Acetobacter* é o meio de *Frateur*, com 10g de extrato de levedura, 20g de etanol, 20g de CaCO₃ e 20g de agar em 1litro de água destilada, com pH ajustado entre 6,0-7,0. Ainda nos manuais, encontra-se que as melhores fontes de carbono para o crescimento de *Acetobacter* são, etanol, glicerol e lactato. Aminoácidos sozinhos não podem ser usados como fonte de nitrogênio e carbono. Porém, alguns autores como Ndoye et. al. (2006) utilizaram meio de cultura contendo 10g/L de extrato de levedura, 20g L⁻¹ de glicose, 20g L⁻¹ de manitol, 2,5% de etanol e 0,5% de ácido acético, com bons resultados.

Frateur (1950, apud RAO e STOKES, 1953) informou que a *A. aceti* exige meio de cultura com etanol, água destilada e fosfatos. Outros estudos com diferentes espécies de *Acetobacter* foram realizados para verificar se o meio de cultura poderia ser o mesmo definido para *A. aceti*. Hoyer (1898, apud RAO e STOKES, 1953) e Beijerinck (1898, apud RAO e STOKES, 1953) comprovaram que espécies de *Acetobacter* como *A. xylinum* e *A. rancens* não podem crescer em meio etanol-ácido acético, adaptado para *A. aceti*, mas podem se desenvolver bem quando glicose, sacarose, manitol ou glicerol são adicionados.

Rao e Stokes (1953) confirmaram Hoyer (1898, apud RAO e STOKES, 1953) Beijerinck (1898 apud RAO e STOKES, 1953) e Pasteur (1868, apud RAO e STOKES, 1953) demonstrando que *A. aceti* não pode crescer em meio contendo etanol, mineral, sais de amônia e nitrogênio, sem que este meio contenha ácido acético, acetato ou glicose, justificando que tais compostos estimulam o crescimento de *A. aceti*. Os autores sugeriram que a presença de um açúcar redutor seria necessária para iniciar o crescimento das bactérias acéticas, que utilizariam o etanol como uma fonte adicional de carbono e energia, oxidando-o a ácido acético.

Os autores avaliaram diferentes meios de cultura para *A. suboxydans* e *A. melanogenum*, e demonstraram que nenhuma das espécies cresce utilizando etanol como fonte de carbono, em meio contendo (NH₄)SO₄ ou aminoácidos como fonte de nitrogênio, mas crescem abundantemente se tais meios são suplementados com pequenas quantidades de autolisado de levedura, peptona ou extrato de fígado. Para *A. suboxydans* e *A. melanogenum* a utilização de açúcares, como 10% de glicose, frutose, manitol ou glicerol, juntamente com

etanol, proporcionou abundante crescimento. Os pesquisadores observaram que os açúcares são iniciadores do crescimento das bactérias de ácido acético, e com isto, as bactérias estão habilitadas a oxidar o etanol para ácido acético.

Na África Sub-Sahariana, o vinagre utilizado como condimento alimentar é obtido da diluição de ácido acético, ou é importado da Europa, não sendo comum a produção artesanal de vinagre. Por isso Ndoye et al. (2006) desenvolveram pesquisa com o objetivo de isolar bactérias acéticas de manga e de *dolo*, uma cerveja local, para então, testar a capacidade das bactérias acéticas de adaptação à alta temperatura, com o intuito de produzir vinagre. O trabalho foi desenvolvido nas regiões do Senegal e Burkina Faso, onde a temperatura é sempre alta, geralmente maior que 30° C. Sabe-se que a temperatura ideal para o bom crescimento das bactérias acéticas encontra-se normalmente em torno de 25°C. O autor conseguiu dentre 17 cepas, selecionar duas com propriedades termotolerantes, e obter através do processo lento um vinagre com 6% de acidez.

2.5 Obtenção do inóculo

Spinosa (2002) relatou que uma quantidade de $1,0 \times 10^9$ células mL^{-1} é o ideal para um inóculo de bactérias acéticas.

A fim de produzir inóculo para fermentação acética, Spinosa (2002) iniciou o processo com $0,1 \text{ m L}^{-1}$ da cultura purificada de bactérias, que estavam armazenadas a 196°C negativos. Também foi possível obter inóculo com uma alçada leve da cultura mantida em meio de cultivo contendo extrato de levedura, manitol, peptona bacteriológica e água destilada e deionizada a 5°C, mantida em incubadora rotativa a 120rpm por 48 horas. Após esse período, o volume total foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL, com 50 mL do mesmo meio e incubado nas mesmas condições anteriores. Acompanhou-se o crescimento da população bacteriana pela contagem total em câmara de Neubauer, até obtenção de inóculo com no mínimo $1,0 \times 10^9$ células mg L^{-1} , utilizando-se o corante vital azul Trypan.

Segundo Cassoni, Cereda e Vilpoux (2005) e Cassoni et al., (2006) partindo do princípio de que as bactérias acéticas são encontradas na acidificação das frutas, é possível selecionar estas bactérias, isolá-las e multiplicá-las em condições favoráveis. As

principais condições são temperatura, pH e substrato disponível. Após identificar as bactérias acéticas nas frutas, é preciso selecioná-las, para então começar a multiplicação.

2.6 Cultivo das bactérias acéticas

Segundo Cassoni, Cereda e Vilpoux (2005) a partir da suspensão de células purificadas de bactérias acéticas é possível fazer a multiplicação. Os autores concluíram que é possível que as bactérias acéticas se desenvolvam em tubos com água estéril contendo ácido nicotínico de autolisado de leveduras e álcool como substrato. Entretanto, será necessário encontrar meios naturais para continuar tal processo.

O suco de laranja é passível de ser usado como substrato para produção e multiplicação do inóculo. De acordo com os dados obtidos através do sítio eletrônico da UNIFESP (Tabela 2) o suco de laranja apresenta uma composição como consta da Tabela 2.

Essa composição pode ser considerada como favorável para o crescimento de bactérias acéticas, pois além de conter açúcares e minerais, ainda apresenta vitaminas como Tiamina, Piridoxina B6 e cianocobalamina B12, todas citadas por Santos Jr. (2004). Neste trabalho o autor avaliou as necessidades nutricionais das bactérias acéticas.

Tabela 2 – Composição do suco de laranja *in natura*

Nutrientes	unidade	Valor por 100g
Água	g	88,30
Lipídeos totais	g	0,70
Carboidratos	g	0,20
<i>Minerais</i>	g	10,40
Cálcio	mg	11,00
Ferro	mg	0,20
Magnésio	mg	11,00
Fósforo	mg	17,00
Potássio	mg	200,00
Sódio	mg	1,00
Zinco	mg	0,050
Cobre	mg	0,044
Manganês	mg	0,014
Selênio	µg	0,10
<i>Vitaminas</i>		
Vitamina C, ácido ascórbico total	mg	50,00
<i>Tiamina</i>	mg	0,09
Riboflavina	mg	0,03
Niacina	mg	0,40
Ácido pantotênico	mg	0,19
<i>Vitamina B6</i>	mg	0,04
Folato total	µg	30,00
<i>Vitamina B12</i>	µg	0
Vitamina A	UI	200,00
Vitamina A, RAE	µg	10,00

Fonte: UNIFESP, 2007.

As bactérias acéticas são isoladas de frutas, e com isso inúmeros microrganismos não desejáveis também estão presentes, em geral, leveduras que estão presentes naturalmente e se desenvolvem na fase de fermentação alcoólica inicial. Devido ao seu tamanho ser muitas vezes maior do que o das bactérias acéticas elas impedem a visualização das colônias formadas, isoladas em placas de *Petri* (CASSONI et al., 2006).

Dois tipos de fungicida, a nistatina e a violeta genciana são normalmente utilizados no tratamento da levedura *Candida ssp* (FERRAZZA et al., 2005).

Nistatina é conhecida como um dos fármacos mais utilizados para o tratamento de infecção por fungos e leveduras, como a candidíase, principal infecção oportunista do ser humano, causada pela levedura do gênero *Candida*. Sua eficácia foi relatada

por Menezes (2004) quando avaliou a susceptibilidade do antifúngico à *Candida* ssp isolada do mamilo de lactantes. Menezes (2004) afirma ainda que há relatos que a nistatina é normalmente utilizada em usinas de cana-de-açúcar, no controle biológico de leveduras no processo de fermentação alcoólica.

Outro estudo mostra a utilização de nistatina para inibir a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comparando sua atividade antimicrobiana com outros fármacos em duas técnicas farmacopéicas de avaliação. A nistatina a 5.212 UI mg (1489 $\mu\text{g mg}^{-1}$) mostrou-se adequada (VITAL et al., 2004).

Segundo Cury (1986) a violeta genciana é o nome conhecido do composto cloreto de metilrosanilina. Apesar de ser utilizado como corante, apresenta propriedades antibacterianas (para as bactérias *Gram* positivas), antifúngicas e antihelmínticas. Aplicada topicamente controla infecções da pele e mucosas associadas com bactérias *Gram*-positivas e fungos. Estudos mostraram sua utilização no tratamento de candidíase, porém sua eficácia varia de acordo com a espécie de levedura e sua respectiva toxicidade. O mesmo autor avaliou os agentes fungicidas cloreto de cetilpiridino, hexaclorofeno, iodo (sob forma de tintura) permanganato de potássio, rubiazol, timerosal, triclosan e violeta genciana, para seis espécies de cândida. O único destaque foi dado ao permanganato de potássio que mostrou fraca ação fungistática e ausência de ação fungicida. Os outros agentes mostraram-se eficazes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida nos laboratórios do CeTeAgro – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS, com análises complementares realizadas nos laboratórios da FCA – Unesp - Campus de Botucatu/SP. Em uma primeira etapa, foram isoladas e purificadas as bactérias acéticas de fermentação natural sobre frutas. A manutenção e multiplicação das bactérias acéticas isoladas foram feitas no Laboratório de Tecnologia dos Produtos de Origem Animal – FCA - Unesp - Campus de Botucatu/SP e as provas bioquímicas para sua classificação foram feitas no Laboratório de Microbiologia e Imunologia - IBB – Unesp - Campus de Botucatu/SP. Em uma segunda etapa, foi feita a fermentação acética da manipueira. Essa etapa constou da extração e caracterização da manipueira e suco de laranja, produção do inóculo, ensaios de fermentações alcoólica e acética da manipueira e suco de laranja. Contou com apoio de laboratórios da UNESP em algumas fases e análises específicas.

3.1 Material

Frutas da estação como caqui, acerola, uva, pêsego e banana serviram como fonte de bactérias acéticas. Como substrato para as fermentações alcoólicas e acéticas foi utilizado a manipueira obtida da cultivar Fécula Branca ralada e prensada e caldo de laranja. Sacarose comercial foi utilizada para ajustar o °Brix da manipueira ao mesmo valor do °Brix do suco de laranja utilizando a equação de balanço de massa.

Reagentes e vidrarias comuns a laboratório químico e microbiano foram utilizados sempre que necessário. Garrafas de vidro de 400 mL foram utilizadas para armazenar os fermentados acéticos obtidos após a fermentação acética da manipueira e da laranja, e foram mantidos a 4°C. Recipientes especiais de vidro foram adaptados como reatores para a fermentação acética dos fermentados alcoólicos de suco de laranja e manipueira.

3.2 Procedimento

3.2.1. Obtenção das bactérias acéticas

As frutas maduras foram deixadas em recipientes abertos, cobertos por tela em temperatura ambiente (25 a 27°C). Em 24 horas, as frutas mostravam início de fermentação alcoólica, passando em seguida e com facilidade, para o processo de fermentação acética. Amostras do líquido formado foram retiradas e observadas em microscópio óptico, coradas com azul de metileno (corante vital) e pela coloração de *Gram*, para comprovar a existência de bactérias típicas.

As bactérias produtoras de ácido acético foram isoladas em meio de cultura seletivo. O meio de cultura seletivo utilizado para isolar *Acetobacter* sp segundo sugerido no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* de Holt e Krieg (1984) foi o de *Frateur* (Tabela 3). A identificação das bactérias acéticas foi feita através da observação de um halo transparente em volta das colônias, resultado da solubilização do CaCO₃ pelos ácidos produzidos. Extrato de levedura foi utilizado como fonte de vitamina, ácido nicotínico e álcool etílico como fonte de carbono.

Tabela 3 - Meio básico de *Frateur*

Componentes	Frateur (HOLT e KRIEG, 1984)
Extrato de levedura, g L ⁻¹	10
Agar, g L ⁻¹	20
Carbonato de cálcio, g L ⁻¹	20
Etanol, g L ⁻¹	20
Água destilada, mL	1000

Para inibir leveduras foram avaliados dois agentes, nistatina e violeta de genciana. Adicionou-se solução aquosa de nistatina 10^5 UI, nas seguintes concentrações em mL L^{-1} de meio básico de *Frateur*: 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5. A violeta genciana comercial, com teor de 10mg mL^{-1} , foi adicionada nas seguintes concentrações de mL L^{-1} de meio básico de *Frateur*: 0,0; 0,5; 1,0 e 1,5. Ambas as substâncias adicionadas com o intuito de inibir o crescimento de leveduras, foram acrescidas aos meios de cultura após a esterilização dos mesmos.

Em seguida 0,1mL do caldo de frutas contendo as bactérias acéticas identificadas em fermentados de frutas foi adicionado e espalhado sobre três placas com meio de cultura de *Frateur* sólido.

As placas foram incubadas a 25°C e após cinco dias foram amostradas colônias para observação em microscópio óptico. Caso as colônias apresentassem o halo transparente, estas eram submetidas à sementeira, por estriamento, para constatação da pureza das mesmas. As colônias com a mesma morfologia foram transplantadas para novos meios de *Frateur* a cada 7 dias, sempre por estriamento, como forma de manter e multiplicar a cepa isolada. O procedimento de transferência das bactérias foi executado em 8 vezes (tempo necessário para a realização de todos os ensaios de fermentação acética). Ao fim de cada transferência foi feita coloração de *Gram*, testes de oxidase, catalase, formação de indol e H_2S , para identificar o gênero das bactérias isoladas (HOLT e KRIEG, 1984). As culturas isoladas foram mantidas a 4°C .

3.2.2. Manipueira

A manipueira foi extraída da massa ralada da mandioca Fécula Branca cultivada no Instituto São Vicente da Universidade Católica Dom Bosco-MS, altitude 532m, $20^\circ26'34''$ latitude-sul e $54^\circ38'47''$ oeste. A planta de mandioca tinha cerca de 10 meses de idade quando colhidas. A manipueira foi analisada em $^\circ\text{Brix}$, pH, acidez total, cianeto livre, açúcar redutor, açúcar redutor total, umidade, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, cobre, ferro, magnésio, zinco e cianeto livre. A metodologia de todas as análises é descrita a partir do item 3.3.3.

A fermentação alcoólica e acética da manipueira foi comparada com a do caldo de laranja. O uso do caldo de laranja foi uma forma de verificar se as necessidades dos microrganismos podiam ser supridas em vitaminas importantes para o metabolismo das bactérias acéticas (SANTOS, JR. 2004) uma vez que não há muitas informações sobre essas características nutricionais da manipueira.

3.2.3 Preparo do inóculo – caldo de laranja

O caldo de laranja foi extraído de laranjas frescas disponíveis no mercado de Campo Grande, MS. As análises deste caldo foram °Brix, pH, acidez total, açúcar redutor, açúcar redutor total, umidade, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco, descritas a partir do item 3.3.3.

3.2.4 Fermentação alcoólica

A manipueira foi ajustada para o mesmo valor de °Brix do caldo de laranja com sacarose comercial, com a finalidade de uniformizar os teores alcoólicos, reduzindo as variáveis entre os substratos. Para tal ajuste foi efetuado o seguinte cálculo:

$$\text{Brix} = \frac{\text{Massa de sólido solúvel} \times 100}{\text{Massa da solução}}$$

Foi realizado o balanço de massa sobre a fórmula:

$$B_1M_1 + B_2M_2 = B_3M_3$$

Onde o B_1 é igual a Brix da manipueira, M_1 é igual a massa da manipueira, B_2 é o Brix do açúcar, M_2 é a massa do açúcar e B_3 e M_3 são Brix e massa da solução obtida.

O caldo de laranja e a manipueira (2 L de cada substrato) ambos com 8°Brix, receberam igual volume de suspensão (10g L^{-1}) de fermento seco biológico, da marca Fleischmann e foram deixados em temperatura ambiente para fermentar durante 24 horas. Após as 24 horas de fermentação foram consideradas encerradas as fases alcoólicas dos dois

substratos quando o valor do °Brix tornou-se estável por mais de 24 horas (SCHMIDELL, 2001).

Os fermentados alcoólicos foram analisados para °GL, pH, acidez total, açúcar redutor, açúcar redutor total, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco, conforme metodologias descritas no item 3.4 e armazenados em geladeira (4°C) para uso nos ensaios de fermentação acética. Na manipueira, além das análises supracitadas, foi realizada a dosagem de cianeto livre.

3.2.5 Fermentação acética

A fermentação acética foi feita em erlenmeyer de 500 mL fechado com uma rolha de cortiça, a qual foi transpassada por dois tubos de vidro de 4mm de diâmetro. Um dos tubos era usado para adição de solução alcoólica, mergulhando até o fundo do vasilhame para evitar o rompimento do véu formado pelas bactérias acéticas no processo de fermentação acética. O outro ia abaixo e próximo à superfície líquida do erlenmeyer, e servia para retirada de amostras. A alimentação e a retirada das amostras era feita com auxílio de uma seringa adaptada à extremidade externa dos tubos de vidro pelo uso de escalpes estéreis, que são dispositivo endovenoso geralmente utilizado em hospitais para infusão medicamentosa e/ou retirada de sangue. Este modelo (Figura 5) foi desenvolvido para a fermentação acética do ensaio A (primeiro conjunto de ensaio, item 3.3.1) e para os ensaios B e C (segundo conjunto de ensaios, item 3.3.2).

Os fermentados alcoólicos de manipueira e laranja, armazenados em geladeira foram utilizados para alimentar os ensaios de fermentação acética.



Figura 5 – Figura representativa dos frascos adaptados usados nos ensaios B e C



Figura 6 – Figura representativa do frasco usado no ensaio D.

A Figura 6 representa o frasco usado na fermentação do ensaio D (segundo conjunto de ensaios, item 3.3.2). O modelo não apresenta tubos de vidro para a entrada e saída de material como o modelo descrito para os ensaios de fermentação acética A (primeiro conjunto de ensaios, item 3.3.1) e B e C (segundo conjunto de ensaios, item 3.3.2).

A razão deste modelo de reator ter sido elaborado diferentemente dos anteriores foi a de se observar o comportamento da fermentação acética quando o véu formado pelas bactérias acéticas fosse rompido, o que é considerado inadequado na literatura consultada.

3.3 Ensaio

3.3.1 Primeiro conjunto de ensaios

O erlenmeyer A foi instalado com uma repetição (A1 e A2). Como demonstra a Figura 7, inicialmente, 100 mL de fermentado alcoólico de laranja foram adicionados pouco a pouco em placas de *Petri* contendo bactérias acéticas isoladas em meio de cultura seletivo. Com o auxílio de uma alça de Drigalski fez-se a homogeneização do fermentado com as bactérias acéticas na placa de *Petri*, e em seguida transferiu-se a suspensão para o erlenmeyer. Assim, obteve-se o inóculo de suco de laranja.

O inóculo foi incubado a 25°C por 24 horas. No 3º dia, foi retirado 10 mL de amostra fermentada para a realização das análises de acompanhamento, acidez e pH. Ainda no 3º dia, adicionou-se 100 mL do fermentado alcoólico de manipueira ao erlenmeyer. Após o 3º dia, diariamente foram retiradas 100mL de amostras fermentadas e em seguida foram adicionados 100mL de fermentado alcoólico de manipueira a ser fermentada. Esta metodologia foi repetida até o 9º dia, quando então foi finalizado o primeiro conjunto de ensaio.

Com os 100 mL retirados a cada dia, cerca de 10mL foram utilizados para a realização das análises de acidez e pH. As análises de acidez e pH foram realizadas no 3º, 6º e 9º dias de fermentação acética.

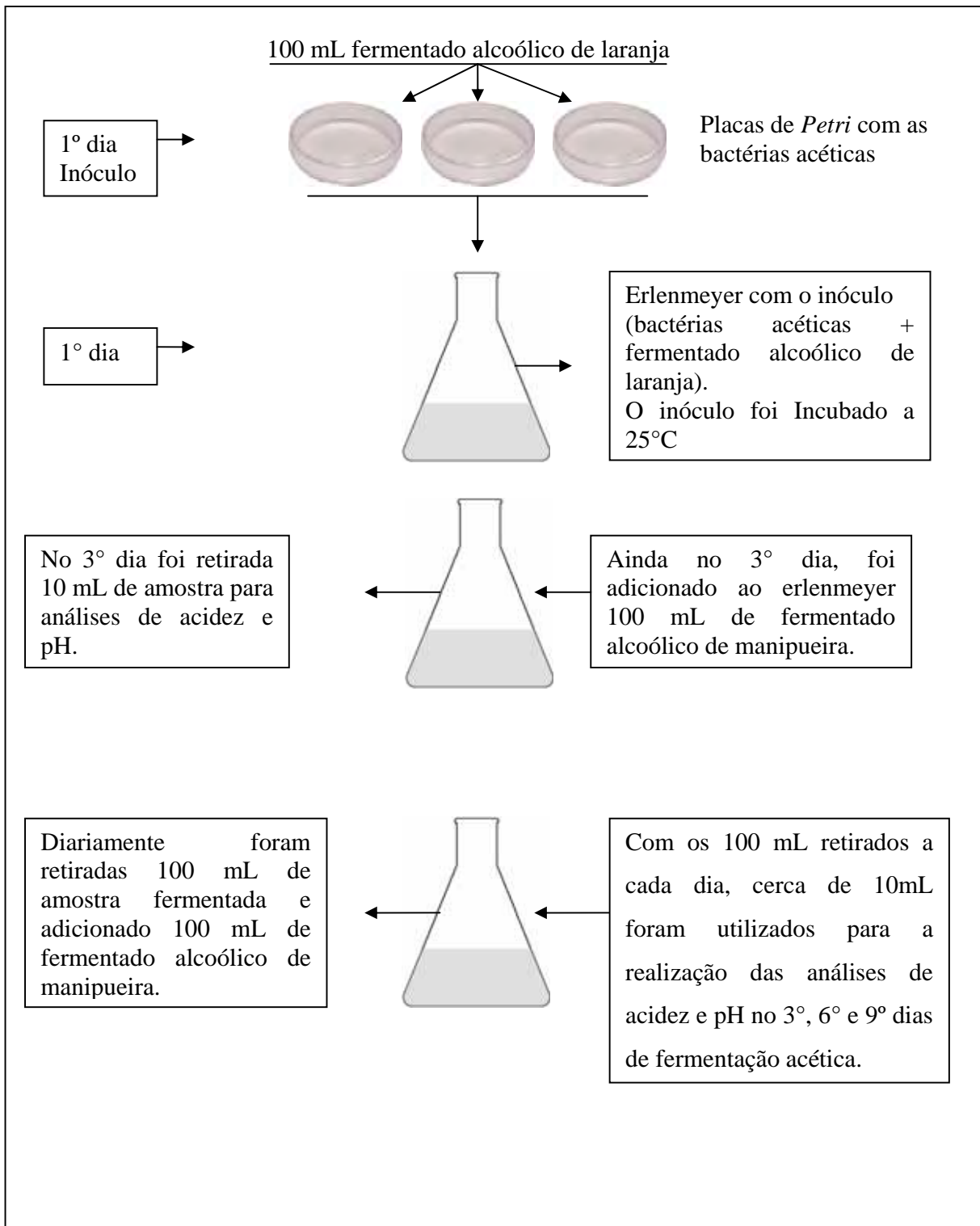


Figura 7 – Esquema representativo do primeiro conjunto de ensaio, ensaio A, realizado com repetição.

3.3.2 Segundo conjunto de ensaios

Três novos ensaios, seguindo a metodologia do item 3.2.5, foram montados na tentativa de melhorar o rendimento do processo de acidificação. Assim, foram desenvolvidos ensaios em erlenmeyers identificados por B, C e D.

Nos três ensaios de fermentação acética, inicialmente, 100 mL de fermentado alcoólico de laranja (50 mL para o ensaio C) foram adicionados pouco a pouco, em 3 placas de *Petri* contendo bactérias acéticas isoladas em meio de cultura seletivo. Com o auxílio de uma alça de Drigalski, fez-se a homogeneização do fermentado alcoólico com as bactérias acéticas nas placas de *Petri*, e em seguida transferiu-se a suspensão para o erlenmeyer, chamada de inóculo.

Para os três tratamentos a produção do inóculo foi desenvolvida com a mesma metodologia, exceto o tratamento D que recebeu 50mL de fermentado alcoólico de laranja ao invés de 100mL como nos tratamentos B e C.

Como demonstra a Figura 8 e 9, inicialmente os ensaios B e C foram alimentados com 100 mL de fermentado alcoólico de laranja juntamente com as bactérias acéticas (1º dia, inóculo) e a Figura 10 mostra o ensaio D que foi alimentado com 50 mL de fermentado alcoólico de laranja juntamente com as bactérias acéticas (1º dia, inóculo).

Este procedimento repetiu-se a cada 48 horas, variando-se o tipo e quantidade de fermentado alcoólico de acordo com os ensaios. Sendo assim, o ensaio B foi alimentado com fermentado alcoólico de laranja. O ensaio C foi alimentado com fermentado alcoólico de manipueira. O ensaio D foi alimentado com fermentado alcoólico de laranja até o pico da curva de fermentação acética, e após, foi alimentado somente com fermentado alcoólico de manipueira.

Durante os 12 dias de fermentação acética dos ensaios B, C e D, a cada 48 horas, foram retiradas dos ensaios amostras de 100 mL (exceto o ensaio D do qual foram retirados 50 mL) alternadamente aos dias de alimentação e o material retirado foi armazenado em garrafas de 400 mL em temperatura de geladeira.

Diariamente, durante os 12 dias de fermentação acéticas dos três ensaio (B, C e D) foram retidas cerca de 10 mL de amostra para as análises de acidez e pH.

Ao fim de 12 dias de fermentação, a análise de cromatografia líquida foi realizada em amostras retiradas dos ensaios B, C e D. Esta análise teve o objetivo de verificar o perfil dos ácidos orgânicos produzidos. Foi também realizada análise de cianeto livre nas amostras. A análise de cromatografia foi feita no CERAT/ FCA – Unesp - Campus de Botucatu/SP e a análise de cianeto livre foi realizada no CeTeAgro / UCDB – Campus de Campo Grande/MS.

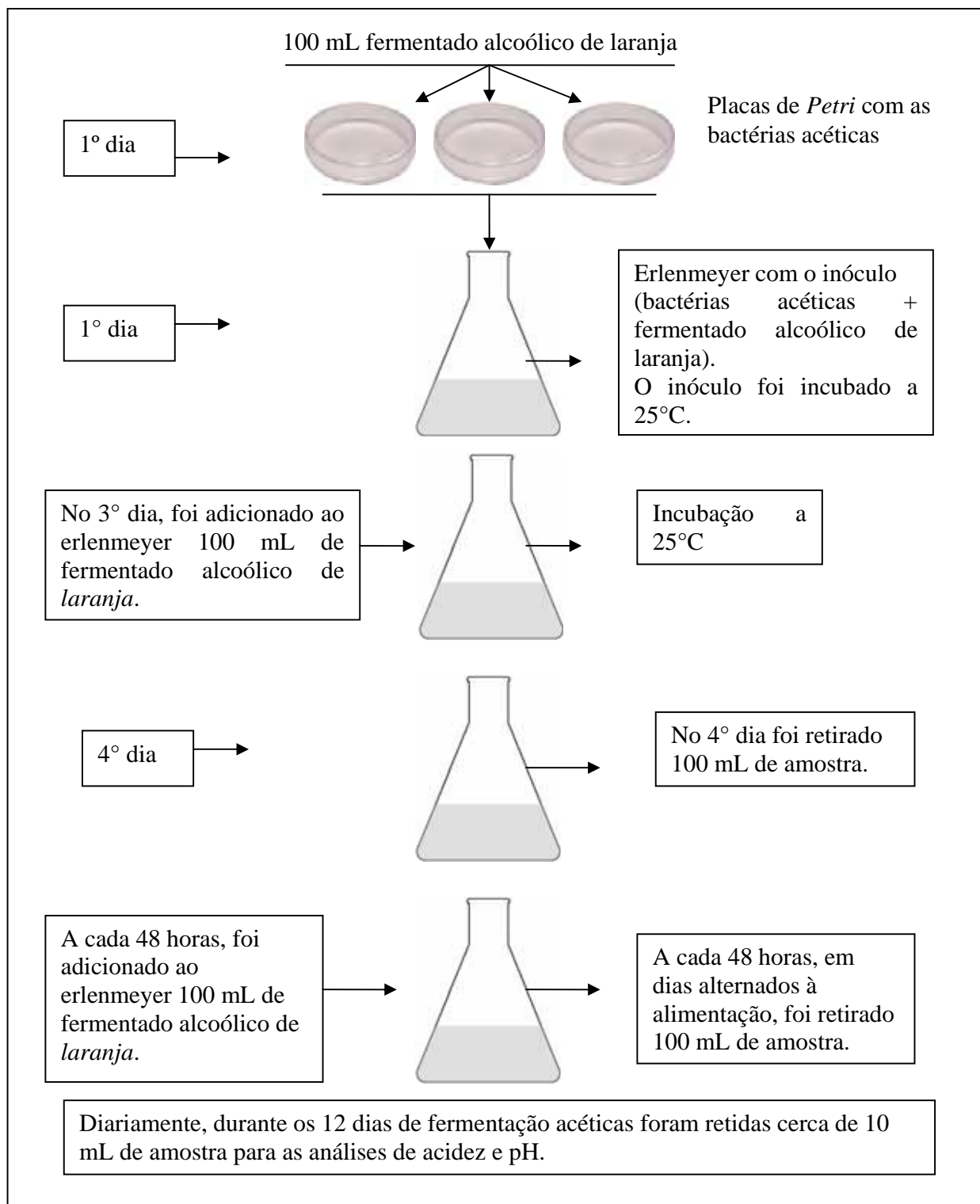


Figura 8 – Esquema representativo do segundo conjunto de ensaio, ensaio B, realizado com repetição.

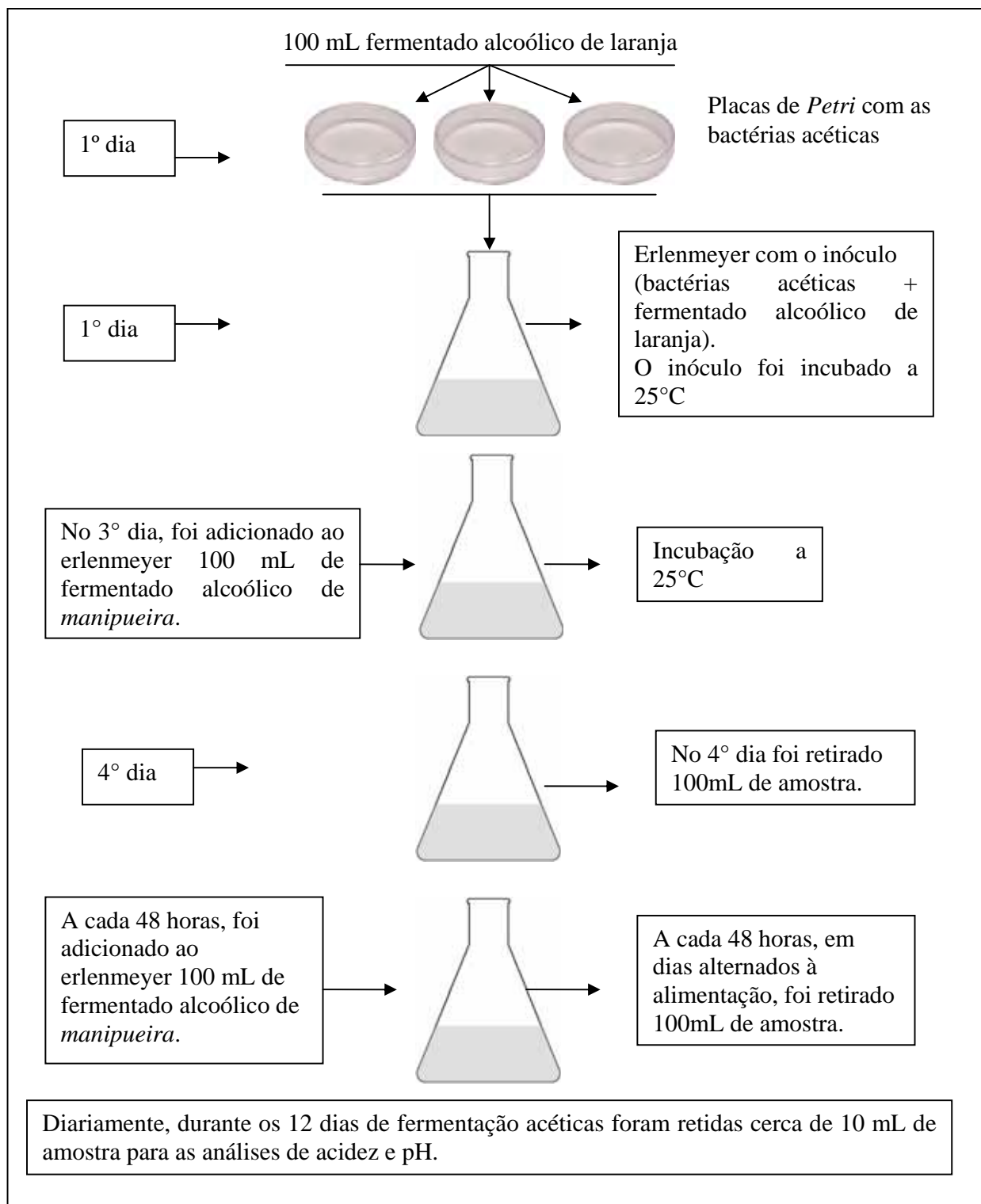


Figura 9 – Esquema representativo do segundo conjunto de ensaio, ensaio C, realizado com repetição.

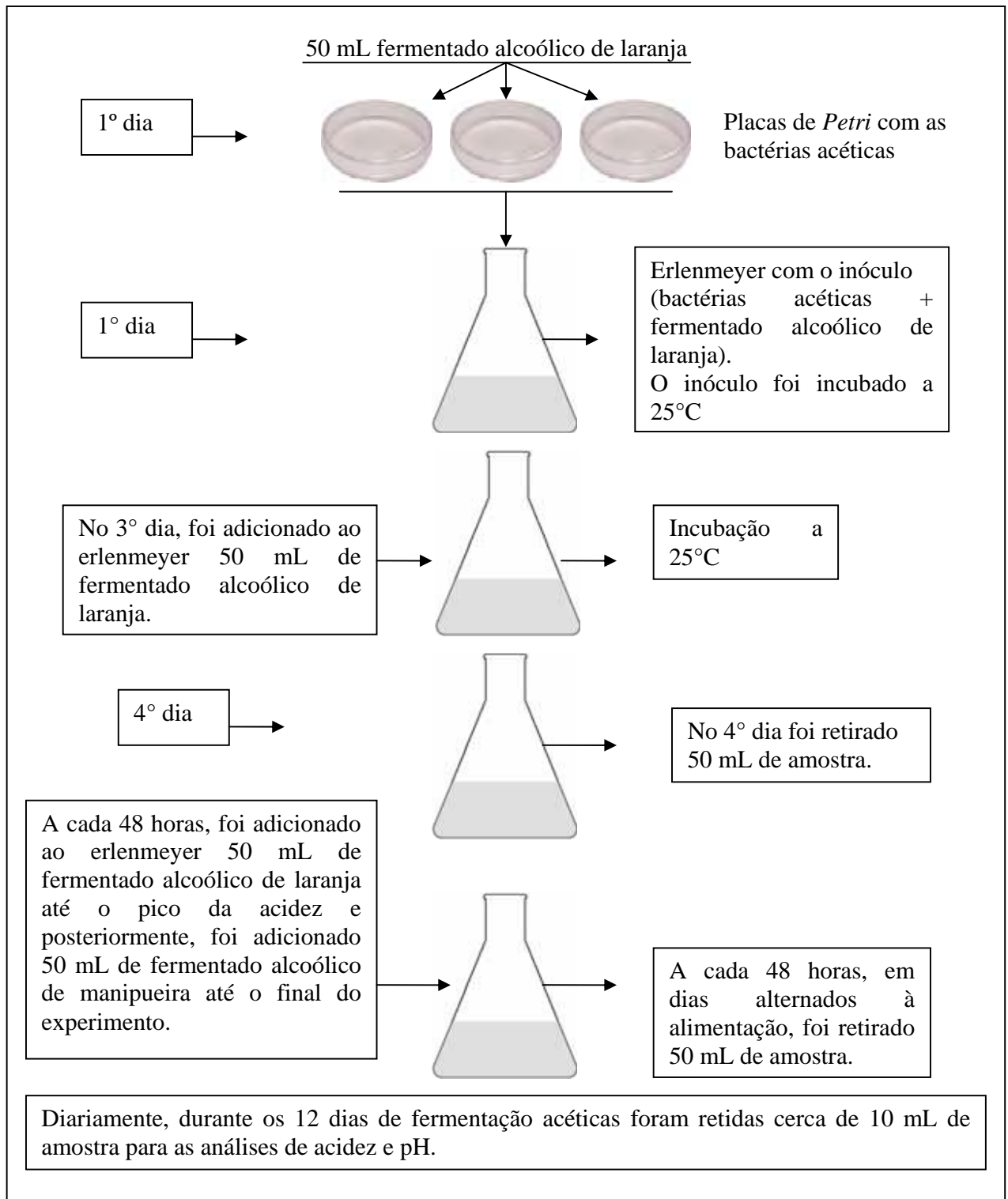


Figura 10 – Esquema representativo do segundo conjunto de ensaio, ensaio D.

Metodologia analítica

3.3.3 Determinação de °Brix

A determinação do °Brix das amostras foi realizada através de dois métodos, dependendo da quantidade de amostra disponível. Quando em quantidade suficiente foi utilizado o sacarímetro. Em amostras de pequeno volume, utilizou-se o densímetro digital.

O densímetro digital utilizado nesta pesquisa foi o da marca METTLER, modelo DA-310-1992/12. O sacarímetro utilizado foi o da marca INCOTERM, calibrado a 20°C.

3.3.4 Determinação do pH

Foi determinado por pH-metro digital da marca MICRONAL, modelo B-474.

3.3.5 Determinação do grau alcoólico (°GL)

Determinado através da destilação da amostra fermentada, segundo a metodologia do Ministério da Agricultura (Brasil, 2005).

3.3.6 Determinação de açúcar redutor (AR) e açúcar redutor total (ART)

Segundo o método de Lane-Eynon (1934) foi feita a análise de açúcar redutor e de açúcar redutor total. O resultado foi expresso em gramas de glicose por 100 mL de amostra. A metodologia do Ministério da Agricultura (Brasil, 2005).

3.3.7 Determinação de acidez titulavel

Através da titulação, com solução padronizada de 0,66 % de NaOH, e fenolfetaleína como corante de viragem de cor, pelo método do Ministério da Agricultura (Brasil, 2005) e foi expressa em % de ácido acético (v/m).

3.3.8 Determinação do teor de cianeto livre

Como apenas o cianeto livre é tóxico, seu teor livre foi estabelecido pelo método de Baltha e Cereda (2006).

3.3.9 Determinação do teor de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, manganês, enxofre, ferro, zinco, magnésio e cobre

Foi realizada pelo Laboratório de Fertilizantes e Corretivos do Departamento de Recursos Naturais – FCA / Unesp – Campus de Botucatu/SP. O laboratório utiliza os Métodos Oficiais de Lanarv (Laboratório Nacional de Referência Vegetal) em Análise de Corretivos, Fertilizantes e Inoculantes.

3.3.10 Determinação do teor de umidade

Realizada pelo método de secagem em estufa e determinada com a perda de peso da amostra quando aquecida a 105°C segundo o método do Ministério da Agricultura (Brasil, 2005).

3.3.11 Determinação dos ácidos orgânicos

O perfil de ácidos orgânicos foi determinado através da análise de cromatografia líquida pelo Cerat – FCA / Unesp – Campus de Botucatu/SP.

Preparo da amostra: a amostra foi centrifugada a 12000 rpm por 8 minutos e em seguida filtrada em membrana de PVDF de teflon, com porosidade de 0.22 micras. Foi utilizado para esta análise coluna de HPLC da marca Varian, modelo Pró Star, com injetor automático e detector de IR (índice de refração). Coluna da marca Bio Rad, Aminex HPX87H, fase móvel H2SP4 0,005M, fluxo de 0,6mL m⁻¹ e temperatura de 65°C.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados correspondem ao isolamento, caracterização e manutenção de bactérias acéticas, utilizadas como inóculo para fermentação acética da manipueira e do caldo de laranja.

Também são demonstrados os resultados dos ensaios de fermentação alcoólica e acética, baseados no processo lento de fermentação acética, que foram realizados em manipueira e caldo de laranja (este realizado somente para comparação com o rendimento da fermentação acética da manipueira).

4.1 Obtenção das bactérias acéticas

A iniciativa de obter inóculo acético de fermentação natural veio do fato de que os microrganismos para produzir vinagre não são facilmente disponíveis no mercado, seja por se tratar de processos comerciais em empresas, seja pela falta de pesquisas sobre o tema.

As frutas que fermentaram naturalmente apresentaram, após dois dias, apresentavam o aroma de ácido acético e o véu sobre a superfície do líquido liberado pelas frutas, característicos de colonização por bactérias acéticas.

A análise do líquido obtido das frutas ao microscópio óptico mostrou microrganismos com características morfológicas próprias de bactérias acéticas em mistura

com leveduras e outros. As bactérias isoladas foram então replicadas em meio de cultura seletivo.

Para inibir o crescimento de leveduras, que se desenvolvem bem nas mesmas condições das bactérias acética, foi avaliada a violeta genciana e a nistatina. Apesar da afirmação da literatura (CURY, 1986) não foi constatada inibição do crescimento das leveduras que se encontravam no material fermentado quando a violeta genciana foi adicionada ao meio de cultura descrito por Frateur (HOLT e KRIEG, 1984) em qualquer dos três volumes em teste (0,5/1,0/1,5 mL por 20mL) nas condições pesquisadas. Entretanto, o mesmo meio de cultura, quando acrescido de 0,5 mL de solução aquosa de nistatina na concentração de 10^5 UI por placa (aproximadamente 20mL de meio) inibiu parcialmente o crescimento das leveduras. Já nas proporções de 1,0 e 1,5 mL por placa de meio de cultura, restringiu completamente o crescimento das leveduras, permitindo o desenvolvimento de colônias visualmente homogêneas de bactérias acéticas (Figura 13). Portanto, o uso de meio 1,0 mL de nistatina de 10^5 UI por 20 mL de meio de Frateur foi o selecionado para o isolamento das bactérias acéticas.

Pode-se observar na Figura 13, como indicação da seta vermelha, o halo correspondente ao início da reação do ácido formado pelas bactérias acéticas com o carbonato de cálcio, nas placas B (nistatina). O ácido formado pelas bactérias acéticas dissolveu o carbonato de cálcio e pode ser observado pela alteração de coloração no local onde houve a produção de ácido.

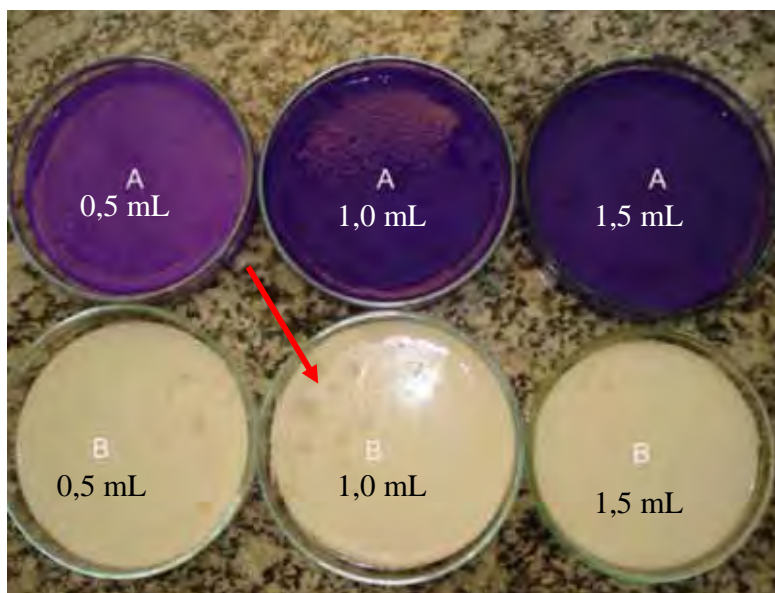


Figura 11 - Aspecto das placas com meio de *Frateur* modificado com inibidores de leveduras: violeta genciana (A) e nistatina (B).

As colônias selecionadas, ao microscópio óptico apresentaram bactérias com morfologia de bastonetes *Gram* negativos e colônias pálidas envoltas em halo transparente, devido à reação com carbonato de cálcio. Além dos testes feitos para a certificação da morfologia, foram feitas análises bioquímicas, nas quais obtiveram-se os seguintes resultados: oxidase negativa, catalase positiva, ausência de formação de H₂S, ausência de formação de indol e ausência de liquefação gelatinosa. Tais características morfológicas e bioquímicas coincidem com a descrição do gênero *Acetobacter* sp citados na literatura (DE LEY et al., 1984 apud HOLT et al., 1994).

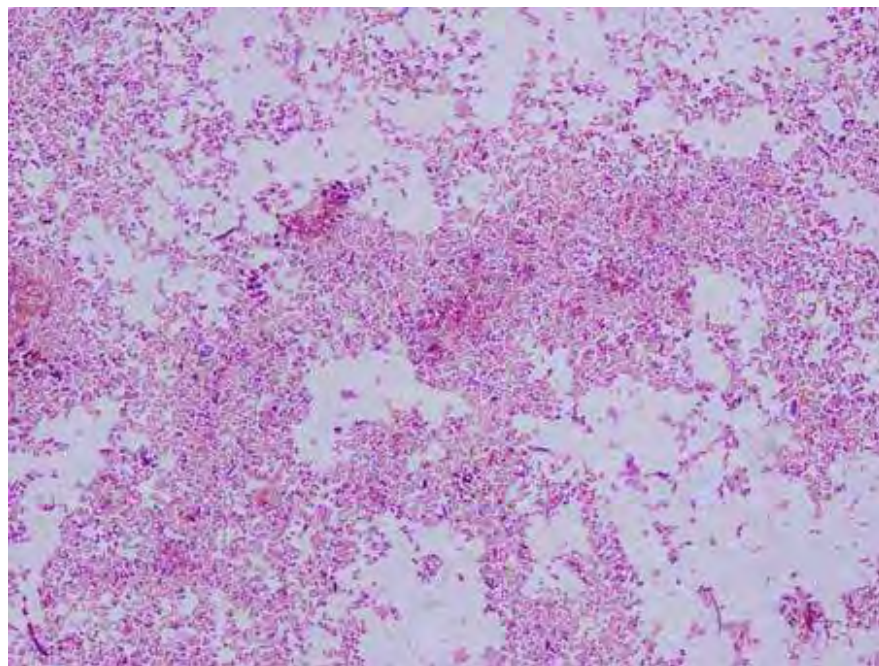


Figura 12 - Aspecto das bactérias com coloração de *Gram* isoladas no meio de *Frateur*, utilizando nistatina como inibidor de levedura (aumento de 1000 vezes).

4.2 Caracterização do substrato manipueira

Seguindo-se a metodologia descrita no item 3.4, foram realizadas as análises para a caracterização da manipueira. Os resultados das análises se encontram na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios da manipueira estudada comparados com dados de outros autores.

Análises	Experimento em estudo	Maróstica, 2006	Nitschke, 2003
Brix	6,00	_*_	_*_
pH	6,56	5,30	5,80
Umidade (%)	92,89	_*_	_*_
Açúcar redutor g glicose / L	21,78	19,38	18,25
Açúcar redutor total g glicose / L	43,38	39,50	41,45
	mg L⁻¹		
Cianeto livre	0,00259	_*_	_*_
Nitrogênio	700,00	1720,00	2080,00
Fósforo	260,00	368,80	244,50
Potássio	1500,00	3641,00	3472,60
Cálcio	110,00	236,00	292,53
Magnésio	260,00	438,10	519,00
Enxofre	40,00	61,35	154,00
Sódio	95,00	_*_	_*_
Cobre	3,00	1,11	1,00
Ferro	3,00	2,72	7,80
Manganês	5,00	3,46	1,70
Zinco	2,00	3,01	2,80

Legenda: *_- sem informações

Comparando-se as características da manipueira utilizada como substrato no experimento em estudo às amostras de manipueira caracterizadas por Maróstica (2006) e Nitschke (2003) observa-se que a amostra caracterizada apresenta semelhanças e discrepâncias notáveis. Infelizmente os dois autores deixam de apresentar o teor de cianeto livre nas medidas de análise em que se pudesse haver comparação.

As discrepâncias observadas são comuns para esse componente e já foram citados por outros autores. Podem ser atribuídas a diversos fatores, como diferentes variedades de mandioca, processos ou épocas do ano. Por exemplo, nos trabalhos desenvolvidos por Maróstica (2006) e Nitschke (2003) a manipueira foi obtida do processo

industrial de fabricação de farinha de mandioca e o resíduo passa por uma fermentação natural que o torna mais ácido que a manipueira em estudo, que foi obtida em laboratório.

Segundo Cereda (2001) a manipueira oriunda de fecularia apresenta 91,53% de umidade enquanto que a de farinha é mais pouco mais concentrada, em torno de 92,77 % de umidade. A porcentagem de umidade encontrada nesta pesquisa foi muito próxima aos valores citados por Cereda (2001) para o mesmo tipo de resíduo com 92,89 % de umidade (Tabela 4). Concordam também com os valores de umidade encontrados por Cabello e Leonel (2001) de 90,60%.

Os valores de AR e ART são semelhantes aos valores encontrados pelos autores, porém mais baixos, o que se justifica pelo fato de que a manipueira extraída em laboratório não teve seus açúcares consumidos no processo de fermentação natural que ocorre na indústria. Ainda assim a proporção entre ART e AR em torno de 2:1 foi semelhante a encontrada por Maróstica (2006), Nitschke (2003) e Damasceno (1998). Pode-se atribuir a diferença das quantidades de ART (43,38) para AR (21,78) à aproximada quantidade de sacarose presente na manipueira em estudo.

Além dos carboidratos, calculados como açúcares redutores, é importante para o crescimento microbiano considerar a concentração dos componentes como nitrogênio, fósforo, potássio. Determinado como nitrogênio bruto, a análise inclui também o nitrogênio do cianeto, que não foi apresentado pelos dois autores (MARÓSTICA (2006) e NITSCHKE (2003)). Os teores muito superiores encontrados pelos autores também podem ser devidos a biomassa que restou da fermentação natural que ocorre nas indústrias, responsável por baixar o pH e os açúcares redutores e aumentar a acidez.

O cianeto livre dosado na manipueira usada como matéria-prima foi em média de 0,00259 mg L⁻¹. Esse valor é muito inferior ao valor de cianeto livre encontrado por Pantaroto (2001) que foi de 44,34 mg L⁻¹. Contudo a comparação dos valores não é adequada por se tratar de cultivares muito diferentes.

Através de um estudo sobre as necessidades nutricionais das bactérias acéticas (SANTOS JR, 2004) foi constatado que para as acéticas selvagens do gênero *Acetobacter* sp, o máximo crescimento celular aconteceu na presença dos elementos ferro (12,00 mg L⁻¹) manganês (12,00 mg L⁻¹) e zinco (1,10 mg L⁻¹). A Tabela 4 mostra que a manipueira estudada apresenta quantidades satisfatórias destes elementos, suficiente para

sustentar o crescimento celular. Entretanto zinco, ferro e manganês encontram-se abaixo do mínimo estabelecido pelo autor.

O teor de fósforo pode ser considerado da mesma grandeza dos apresentados pelos dois autores, enquanto que o potássio apresentou concentração expressivamente menor que nos estudos de Maróstica (2006) e Nitschke (2003).

Apesar variação encontrada nos nutrientes quando comparados a literatura pode-se afirmar que os teores encontrados poderiam ser considerados como em quantidade satisfatória para a manutenção das bactérias acéticas isoladas. Como exemplo cita-se que no estudo de Hoyer (1898 apud SANTOS JR., 2004) foi descrito que a adição de 100mg de fosfato de potássio ao meio modificado de *Frateur* para bactérias acéticas, otimizava o crescimento das mesmas, quantidade essa bem menor do que a encontrada neste estudo.

4.3 Preparo do inóculo e caracterização do suco de laranja

De acordo com Spinosa e Santos Jr. (2002, 2004) entre os fatores que restringem o crescimento das bactérias acéticas cita-se nutrientes essenciais para o seu metabolismo como vitaminas e minerais. Caso não estejam disponíveis no substrato utilizado para a fermentação acética, a complementação do substrato se torna necessária.

Quanto aos minerais já foi discutido que não se constituiriam um problema que exigisse complementação, mas as vitaminas são mais limitantes.

As frutas são consideradas excelentes substratos para a produção de vinagre, por conterem nutrientes essenciais para as bactérias acéticas em sua composição, como as vitaminas riboflavina e tiamina.

O suco de laranja apresenta em sua composição vitaminas como ácido ascórbico, tiamina, riboflavina e ácido pantotênico, entre outros, como descreve a literatura e demonstra a Tabela 2 (UNIFESP, 2007). Devido a este fato foi selecionado o suco de laranja como substrato para obtenção do inóculo utilizado na fermentação acética da manipueira.

Os resultados das análises do suco de laranja encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores médios de análise do suco de laranja

Análises	Valores
Brix (%)	8,00
pH	4,26
Umidade (%)	91,16
AR g glicose L ⁻¹	29,68
ART g glicose L ⁻¹	61,89
Nitrogênio (mg L ⁻¹)	1400,00
Fósforo (mg L ⁻¹)	420,00
Potássio (mg L ⁻¹)	1500,00
Cálcio (mg L ⁻¹)	200,00
Magnésio (mg L ⁻¹)	110,00
Enxofre (mg L ⁻¹)	90,00
Sódio (mg L ⁻¹)	10,00
Cobre (mg L ⁻¹)	3,00
Ferro (mg L ⁻¹)	1,00
Manganês (mg L ⁻¹)	3,00
Zinco (mg L ⁻¹)	2,00

O valor do °Brix para o suco de laranja descrito por Benassi Jr., (2005) foi de 7 a 13,2%, em média para as variedades de laranja estudada pelo autor. O Brix do suco de laranja encontrado neste estudo foi de 8%. Este valor é dado ao período de maturação da fruta, já que o teor de açúcares aumenta à medida que o fruto amadurece.

Segundo Benasse Jr. (2005) sucos de laranja podem ter uma baixa ou alta acidez, e apresentar o mesmo pH, devido às quantidades de sais tampão presentes no suco. O pH médio das variedades de laranja estudada pelo autor ficou entre 3,4 a 4,0, dependendo do período de maturação da fruta. O pH da laranja obtido neste experimento foi de 4,26, valor próximo ao encontrado por Benassi Jr. (2005).

O teor de água presente na laranja segundo a Tabela 2 (UNIFESP, 2007) é de 88,3 g 100g, que pode ser considerada como próxima da umidade (91,16%) encontrada no suco de laranja *in natura* estudado.

Assim como na manipueira utilizada neste estudo, o suco de laranja também apresentou a proporção de ART para AR em torno de 2:1. Este fato deve-se à proporção de sacarose em relação aos monossacarídeos presentes no suco de laranja, que também se encontram na proporção de 2:1. O mesmo autor relata que o valor de nitrogênio encontrado em suco de laranja foi de 600 a 1800 mg L⁻¹, o de potássio de 1200 a 2800 mg L⁻¹, de sódio de 10 mg L⁻¹ e de cálcio de 110 mg L⁻¹ (BENASSI JR., 2005).

Pode-se observar na Tabela 5 que os valores encontrados para o suco de laranja no presente estudo presente em nitrogênio, potássio, sódio e cálcio foram muito próximos aos valores encontrados pelo autor. Esses componentes são importantes para qualificar o suco de laranja como um bom substrato para a fermentação alcoólica e acética.

Os minerais citados por Santos Jr. (2004) assim como presentes na manipueira, podem ser encontrados também no suco de laranja (Tabela 5). Alguns valores são bastante próximos mas pode-se afirmar que o suco de laranja, assim como a manipueira não apresentaram todos os minerais nas quantidades citadas, a não ser o zinco (2,00 mg L⁻¹). As vitaminas não foram determinadas mas pode-se valer da literatura para afirmar que estariam presentes pelo menos no suco de laranja.

4.4 Fermentação alcoólica da manipueira

Como o Brix inicial da manipueira foi de 6,0 adicionou-se à mesma sacarose comercial aumentando-se o valor do Brix para 8,00, equiparando-o ao do suco de laranja. Os dois substratos foram então inoculados com a levedura alcoólica.

Com a fermentação alcoólica da manipueira o pH diminuiu de 6,56 para 4,81. Essa diminuição é explicada pela produção de H⁺ oriundos dos ácidos orgânicos formados no processo de fermentação alcoólica pelas leveduras (WOOD, 1998). Foi estabelecido o fim da fermentação alcoólica após 48 horas, quando o valor do °Brix (0,5) do fermentado estabilizou em duas leituras feitas com 24 horas de diferença. O fim da fermentação alcoólica foi confirmado pelas análises de AR e ART que obtiveram valores

próximos a zero. O grau alcoólico do fermentado de manipueira foi de 4,8°GL, resultado este maior do que o esperado, já que na conversão de açúcar para álcool, a proporção esperada é geralmente de 2:1 (AQUARONE, 2001). Uma explicação que teria de ser confirmada seria a ação de enzimas autóctones sobre dextrinas e oligossacarídeos remanescentes na manipueira. A percentagem média de umidade (ou substâncias voláteis a 105°C) do fermentado alcoólico de manipueira foi de 98,60%.

A análise de cianeto livre realizada no fermentado alcoólico de manipueira obtida da cultivar Fécula Branca, em 3 repetições com triplicata, apresentou média de 0,00202 mg L⁻¹ que corresponde a 78% do teor inicial da manipueira, mostrando que muito pouco se perdeu de cianeto livre nesta etapa, o que se explica pelo pH. O valor encontrado é muito baixo, mas de qualquer forma não seria esperada a inibição da fermentação alcoólica pelo cianeto, uma vez que o processo é anaeróbico e a ação tóxica do CN⁻ ocorre sobre as formas aeróbicas do metabolismo.

Pantaroto (2001) descreveu o teor de cianeto livre em manipueira de farinha como sendo de 44,34 mg L⁻¹. Os teores de cianeto livre do tucupi citados por CHISTÉ, COHEN e OLIVEIRA (2005) foram de 12,91 a 46,87 mg L⁻¹. Os autores encontraram valores superiores aos encontrados neste estudo. Isso poderia ser explicado por se tratar de mandioca variedades de mandioca diferentes e selecionadas com diferentes finalidades. Os autores estudaram o tucupi e esse molho é tradicionalmente preparado no Pará a partir de variedades de mandioca obrigatoriamente amarelas, de baixo teor de amido, mas de alta umidade (para obter maior rendimento) e, de variedades de cianeto elevado.

A manipueira em estudo foi extraída em laboratório da cultivar Fécula Branca que além de ser a cultivar atual de maior uso industrial também tem uso culinário e é reconhecidamente de baixo teor de cianeto. A manipueira citada por Pantaroto (2001) foi obtida em indústrias de fabricação de farinha de mandioca, oriunda de mistura de variedades de mandioca, com mais de 100 mg de HCN por Kg⁻¹ de raízes frescas.

O substrato alcoólico de manipueira foi armazenado a 4°C para ser utilizado em alíquotas de 100 mL como substrato para a fermentação acética.

Tabela 6 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado alcoólico de manipueira, expressos em mg L⁻¹ e percentagem.

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
Manipueira	700,00	206,00	1500,00	110,00	260,00	40,00	95,00	3,00	3,00	5,00	2,00
Fermentado alcoólico de manipueira	30,00	300,00	1300,00	100,00	200,00	30,00	96,00	3,00	1,00	2,00	1,00
Variação em % (*)	(-) 95,71	(+) 45,63	(-) 13,33	(-) 9,09	(-) 23,07	(-) 25,00	(+) 1,05	0,00	(-) 66,00	(-) 60,00	(-) 50,00

(*): Considerando o teor de redução dos nutrientes da manipueira para o fermentado alcoólico de manipueira. Quando o teor no fermentado alcoólico foi maior, considerou-se a diferença para 100 como negativo.

Pode-se observar a diminuição dos valores de nitrogênio em 95,71%, de potássio em 13,33%, de magnésio em 23,07%, de cálcio em 9,09%, de ferro em 66%, de manganês em 60,0% e de zinco em 50,0%, provavelmente utilizados no metabolismo das leveduras durante o processo de fermentação alcoólica. Apenas o fósforo determinado (P₂O₅) aumentou em quase 50% enquanto sódio e cobre praticamente não variaram.

4.5 Fermentado alcoólico de laranja

A fermentação alcoólica do suco de laranja ocorreu em 48 horas, com estabilização do Brix em 1,0 como consequência do consumo de AR (0,40 mg100mL⁻¹) e ART (0,91 mg 100mL⁻¹). O pH baixou de 4,26 para 4,11, o que é considerado normal na fermentação alcoólica. O teor alcoólico foi determinado em 3,7°GL, valor próximo ao esperado em relação ao Brix inicial, como já comentado para o fermentado alcoólico da manipueira. A umidade (ou substâncias voláteis a 105°C) foi de 97,21 %.

Assim como o fermentado alcoólico de manipueira, o substrato alcoólico de laranja foi armazenado a 4°C para ser utilizado em alíquotas de 100 mL como substrato para a fermentação acética.

Tabela 7 -. Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado alcoólico de laranja, expressos em mg L⁻¹ e percentagem

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
Suco de laranja	1400,00	420,00	1500,00	200,00	110,00	90,00	10,00	3,00	1,00	3,00	2,00
Fermentado alcoólico de laranja	1300,00	440,00	1600,00	60,00	80,00	60,00	27,00	2,00	1,00	7,00	3,00
Variação em % (*)	(-) 7,14	(+) 4,76	(+) 6,66	(-) 70,00	(-) 27,27	(-) 33,33	(+) 170	(-) 33,33	0,00	(+) 133,33	(+) 50,00

(*): Considerando o teor de redução dos nutrientes da laranja para o fermentado alcoólico de laranja. Quando o teor no fermentado alcoólico foi maior, considerou-se a diferença para 100 como negativo.

Como para a manipueira, após a fermentação alcoólica do suco de laranja, a concentração da maioria dos minerais diminuiu.

Apesar do maior teor inicial de nitrogênio no suco de laranja (1400,00 mg L⁻¹) quando comparado ao valor de nitrogênio da manipueira (70,00 mg L⁻¹) o consumo foi também muito menor, apenas 100mg enquanto que na manipueira o consumo foi de 670mg. Em percentagem houve uma redução de 7,14%.

Diferentemente da fermentação alcoólica da manipueira na qual ao fim da fermentação aumentou apenas o valor de fósforo (45,63%) no suco de laranja, além do fósforo (4,76) aumentou também o valor de potássio (6,66%), sódio (170%), manganês (133,33%) e zinco (50%). É difícil interpretar esses aumentos.

Quando se analisa a composição dos substratos de uma forma geral verifica-se que havia duas vezes mais fósforo no suco de laranja que na manipueira, assim como o cálcio e enxofre. A não ser para magnésio, sódio e manganês, o suco de laranja apresentou-se mais rico em todos os minerais. Ainda assim o grau alcoólico da manipueira foi 1,2 maior (4,8°GL) que o do suco de laranja (3,74°GL). As leveduras utilizadas para ambos os substratos foram as mesmas, de mesmo lote, na mesma quantidade e para ambas as fermentações houve carboidratos residuais, porém foram mais eficientes para a fermentação de manipueira que para o suco de laranja.

4.6 Ensaios de Acetificação

Os fermentados alcoólicos obtidos, do suco de laranja e da manipueira, foram utilizados como substrato para a fermentação acética. O primeiro conjunto de ensaio foi denominado (A) com as repetições (A1) e (A2). Posteriormente, foi realizado o segundo ensaio denominado B (B1 e B2, repetição), C (C1 e C2, repetição) e D, todos descritos no item 3.3.

A acidez medida no fermentado alcoólico de manipueira e no de suco de laranja foi considerada como acidez inicial, sendo após considerada como decorrente da fermentação acética.

4.6.1 Primeiro conjunto de ensaio (A)

No primeiro conjunto de ensaio, ensaio A (A1 e A2) a fermentação acética se iniciou com a inoculação de 100 mL de fermentado alcoólico de laranja. Após 3 dias em que o frasco ficou em temperatura ambiente iniciou-se a alimentação, com 100 mL de fermentado alcoólico de manipueira diariamente até o final do experimento. Essa metodologia foi realizada em repetição (A1 e A2).

Os resultados das análises de acompanhamento desta fase da fermentação acética encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Evolução do pH e da acetificação expressa em g ácido acético/100 mL no ensaio A (A1 e A2, repetição).

		Dias após a inoculação			
	Análises	Inicial	3ºDia	6º Dia	9ºDia
A1	pH	4,43	4,19	4,25	4,26
	Acido acético g/100mL	0,40	2,10	1,80	1,20
A2	pH	4,43	4,16	4,27	4,27
	Acido acético g/100mL	0,40	3,00	2,20	1,50

A Tabela 8 mostra a evolução da acidez expressa em gramas de ácido acético e o pH inicial da fermentação acética do caldo de laranja e da mistura de caldo de laranja e manipueira (do 3º dia até o 9º dia). Observa-se que os valores de acidificação do ensaio A aumentaram até o 3º dia de fermentação acética da laranja, correspondendo à queda do pH. Contudo, após a adição do fermentado alcoólico de manipueira ainda no 3º dia, o desempenho da fermentação não foi o mesmo. No 6º dia constatou-se que ao adicionar 100 mL de fermentado alcoólico de manipueira aos 100 mL de fermentados acético de laranja, a acidez diminuiu devido à diluição da solução, e o pH aumentou. Seguiu-se então, por mais 3 dias de fermentação acética com adição diária de fermentado alcoólico de manipueira, com a finalidade de se verificar se as bactérias acéticas necessitavam de mais tempo para a conversão do álcool de manipueira para ácido acético. Porém, ao fim do 9º dia de fermentação acética, foi possível constatar que a acidez continuou diminuindo devido à diluição dos fermentados e o pH aumentando.

Esses resultados poderiam mostrar que a alimentação diária com 100 mL de fermentado alcoólico de manipueira ao fermentado acético de laranja era exagerada e proporcionou um choque no sistema. Considerou-se a possibilidade de espaçar a alimentação para obter melhor adaptação das bactérias acéticas ao novo substrato. Para avaliar essa hipótese foi realizado o segundo conjunto de ensaios, denominados B, seguidos dos números relativos a repetições (B1 e B2) C (C1 e C2) e D.

4.6.2 Segundo conjunto de ensaios

Foram realizados três ensaios de fermentação acética. O ensaios B (B1 e B2, repetição) o ensaio C (C1 e C2, repetição) e o ensaio D (comparação). Todos os ensaios tiveram por base o inóculo de fermentado alcoólico de laranja e bactérias acéticas em placas seletivas (item 3.2.3 de Material e Métodos).

O ensaio B foi alimentado apenas com fermentado alcoólico de laranja. O ensaio C foi inicialmente alimentado com fermentado alcoólico de laranja e após o 3º dia com fermentado alcoólico de manipueira, e o ensaio D foi alimentado apenas com fermentado alcoólico de laranja até o pico de fermentação acética, e posteriormente com fermentado alcoólico de manipueira.

4.6.2.1 Ensaio B

O ensaio B foi alimentado apenas com fermentado alcoólico de laranja e acompanhado por 12 dias consecutivos, sendo realizadas análises de acidez e pH diariamente. Os resultados das análises de acompanhamento são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Evolução do pH e da acetificação do fermentado de laranja, ensaio B, com repetição e média, expressa em g ácido acético/100 mL.

		Dias de amostragem											
Análises		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
B1	Acidez	0,40	1,53	1,36	1,63	1,50	1,66	1,50	1,56	1,43	1,80	1,50	1,76
	pH	4,43	3,96	4,13	3,94	4,16	4,13	4,13	4,02	3,79	3,78	3,78	3,74
B2	Acidez	0,40	1,53	1,30	1,70	1,43	1,76	1,70	1,73	1,30	1,80	1,50	1,73
	pH	4,43	3,98	4,11	3,98	4,16	4,14	4,14	3,98	3,78	3,78	3,78	3,47

A Tabela 9 apresenta os valores de acidez e pH em amostras dos ensaios de fermentação acética. Os valores foram decrescentes para pH e crescentes para acidez como esperado, contudo, considerando que o grau alcoólico do fermentado de laranja foi de 3,74, e que o rendimento esperado é de praticamente 1:1 (AQUARONE et al., 2001) as percentagens de acidez do ensaio B não alcançaram o percentual esperado. O valor máximo encontrado foi o de 1,8 % (g. ácido acético/100 mL). Os valores máximos ocorreram no 10º dia para as duas repetições, com valores crescentes até o sexto dia, e quedas pouco acentuadas entre os dias de amostragem.

Em ambas as repetições houve oscilação de valores de acidez e pH, o valor da acidez diminuiu e o pH aumentou nos dias em que o ensaio de fermentação acética foi alimentado com novo substrato (fermentado alcoólico de laranja) e a acidez aumentou, assim como o pH diminuiu nos dias em que não recebeu o novo substrato.

De acordo com Aquarone et al. (2001) o rendimento do processo de fermentação acética se dá de acordo com a equação estequiométrica representativa da

transformação de etanol em ácido acético, onde 1g etanol pode fornecer 1,304g de ácido acético, tendo-se assim o rendimento de 100%. O rendimento da transformação de álcool para ácido acético é influenciado pelas bactérias acidificantes que dominam o processo, bem como pelos fatores que as influenciam. A evaporação do álcool e a presença de bactérias oxidantes indesejáveis são algumas interferências que podem diminuir o rendimento (AQUARONE et al., 2001).

O teor de umidade do fermentado acético de laranja no ensaio B (ou substâncias voláteis a 105°C) foi de 97,73% para B1 e 97,74% para B2, em média de triplicata. A análise foi realizada do produto final, após os 12 dias de fermentação acética.

Tabela 10 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado acético de laranja (12 dias) expressos em mg L⁻¹.

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
Fermentado alcoólico de laranja	1300,00	440,00	1600,00	60,00	80,00	60,00	27,00	2,00	1,00	7,00	3,00
Fermentado acético de laranja B1	80,00	400,00	1500,00	120,00	80,00	30,00	27,00	2,00	1,00	2,00	0,00
Fermentado acético de laranja B2	100,00	300,00	1500,00	120,00	80,00	30,00	27,00	2,00	1,00	3,00	0,00

Ocorreu redução para quase todos os minerais e em valores próximos, exceto para fósforo (9 e 32%, repetição) e para manganês (72 e 57%, repetição). Aumento ocorreu apenas para cálcio, em valores iguais para as repetições (100%).

Em ambas as repetições, notou-se a diminuição de nitrogênio após a fermentação acética do suco de laranja, comprovando a importância do mesmo para a fermentação acética. Na fermentação alcoólica do suco de laranja a redução de nitrogênio foi baixa (7,14%) ao contrário da fermentação acética que reduziu em 93,84% para a repetição B1 e em 92,30% para a repetição B2.

Apesar de ser uma prática comum adicionar-se fosfato de potássio ao meio de cultura para o isolamento das bactérias acéticas, o estudo presente demonstrou que as bactérias acéticas não utilizaram o fósforo e o potássio, a redução dos mesmos foram em

9,09/31,81%(B1/B2) e 6,25%(B1 e B2) respectivamente (HOLT et al., 1994). A repetição dos valores de fosfato foi desigual, sendo que para a repetição B2, a redução do mineral foi consideravelmente maior.

Santos Jr.(2004) descreveu que ferro, manganês e o zinco são minerais essenciais para o metabolismo das bactérias acéticas. Dentre os minerais citados por Santos Jr. (2004) o zinco e o manganês foram reduzidos no processo de fermentação acética do fermentado alcoólico de laranja. Já o teor de ferro não se alterou com a fermentação acética. Este resultado pode ser explicado pela insuficiência deste mineral no início do processo de fermentação acética do fermentado alcoólico de laranja, já que no trabalho de Santos Jr. (2004) a quantidade apresentada deste mineral (12 mg L^{-1}) para o início da fermentação acética é superior à encontrada no fermentado alcoólico de laranja, substrato deste experimento.

Tabela 11 - Resultados do perfil de ácidos orgânicos obtidos no final da fermentação acética do suco de laranja (12 dias) ensaio B (B1 e B2, repetição) expressos em % (peso/peso).

Amostra	Etanol	Ácido acético	Ácido cítrico	Ácido ascórbico	Ácido propanóico	Ácido láctico
B1	2,36	1,56	1,62	0,22	0,00	0,25
B2	2,38	1,53	1,60	0,21	0,00	0,26

A análise de perfil dos ácidos orgânicos apresentada na Tabela 11 como resultado da fermentação acética das duas repetições mostra que houve etanol não convertido para ácido acético, nas repetições B1 e B2 (2,36% e 2,38%) o que explica o baixo rendimento encontrado. O fato mostra que em escala de laboratório mesmo o suco de laranja apresentou baixa conversão.

O suco de laranja possui em sua composição ácido ascórbico e ácido cítrico, e é devido a este fato que essas duas substâncias se encontram presentes na análise de perfil dos ácidos orgânicos do fermentado acético do ensaio B em 0,21% e 1,61% em média, respectivamente. A presença do ácido láctico em 0,25% ocorreu provavelmente pela presença de bactérias lácticas contaminantes.

4.6.2.2 Ensaio C

O ensaio de fermentação acética C (C1 e C2, repetição) foi inicialmente alimentado com fermentado alcoólico de laranja e após o 3º dia com fermentado alcoólico de manipueira, sendo comparável ao B no preparo do inóculo. Portanto espera-se que as diferenças se devam ao efeito do substrato.

O fermentado alcoólico de frutas é comumente utilizado como substrato para a fermentação acética, porém o fermentado alcoólico de manipueira nunca foi utilizado para tal propósito. Então, com o objetivo de se obter um inóculo, iniciador da fermentação acética, utilizou-se o fermentado alcoólico de laranja até o 3º dia de fermentação acética, após o que se substituiu a alimentação com 100 mL de fermentado alcoólico de manipueira, obtendo-se os resultados listados na Tabela 12.

Tabela 12 – Evolução do pH e da acetificação da manipueira, ensaio C, com repetição e a média, expressa em g ácido acético/100 mL.

		Dias de amostragem											
		1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º	10º	11º	12º
C1	Acidez	0,40	1,70	1,70	1,00	0,80	0,70	0,60	0,50	0,40	0,50	0,40	0,40
	pH	4,43	3,94	3,93	4,19	4,39	4,42	4,45	4,55	4,44	4,45	4,45	4,56
C2	Acidez	0,40	1,43	1,42	0,86	0,70	0,60	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
	pH	4,43	3,97	3,97	4,22	4,42	4,48	4,48	4,59	4,41	4,45	4,44	4,44

Como se pode observar na Tabela 12, nas repetições do ensaio C (C1 e C2) os valores de acidez aumentaram e os de pH diminuíram até o terceiro dia de fermentação acética em ambas as repetições do ensaio, enquanto as bactérias acéticas tinham fermentado alcoólico de laranja como substrato. Ao 3º dia iniciou-se a substituição gradual do fermentado alcoólico de laranja pelo fermentado alcoólico de manipueira, adicionando-se 100 mL de fermentado alcoólico de manipueira a cada 48 horas. Com isso, a acidez começou a diminuir com conseqüente aumento do pH durante os dias restantes.

O valor de cianeto livre do fermentado acético de manipueira foi, em média, de 0,00243 mg L⁻¹, limite de sensibilidade do método empregado. A análise de cianeto

livre do fermentado alcoólico de manipueira apresenta valores semelhantes aos valores de cianeto livre do fermentado acético de manipueira, ensaio C. Em ambas as análises de cianeto livre, os valores estiveram muito abaixo dos descritos por Pantaroto em 2001 (44,34 mg L⁻¹) devido ao fato de que a manipueira utilizada nos processos de fermentação alcoólica e acética poder ser classificada como mansa (abaixo de 100 mg de HCN por Kg⁻¹ de raízes frescas).

O pH do fermentado acético de manipueira ficou entre 3,95 e 4,57, e nesta faixa de pH não ocorre a liberação do cianeto fixo. Segundo Pantaroto e Cereda (2001) a formação do ácido cianídrico na manipueira só ocorre em pH acima de 5,5. Por isso os valores de cianeto livre obtidos no ensaio C foram muito próximos aos valores de cianeto livre obtidos após a fermentação alcoólica da manipueira e o pouco cianeto total deve ter ficado fixado como linamarina e nessa forma não poderia ser tóxico às bactérias acéticas.

Restam, portanto, problemas nutricionais a serem usados para justificar o comportamento das bactérias acéticas.

O teor de umidade (ou substâncias voláteis a 105°C) em média de três repetições, foi de 98,33% para C1 e de 98,32 % para C2. A análise foi realizada do produto final, após os 12 dias de fermentação acética.

Tabela 13 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado acético de manipueira (12 dias) expressos em mg L⁻¹.

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
Fermentado alcoólico de manipueira	30,00	300,00	1300,00	100,00	200,00	30,00	96,00	3,00	1,00	2,00	1,00
Fermentado acético de manipueira C1	30,00	400,00	1400,00	120,00	200,00	20,00	92,00	3,00	1,00	2,00	1,00
Fermentado acético de manipueira C2	30,00	300,00	1300,00	120,00	170,00	20,00	86,00	3,00	1,00	2,00	1,00

Como demonstra a Tabela 13, os minerais presentes no fermentado alcoólico de manipueira não sofreram alterações significativas após o processo de fermentação

acética, em ambas as repetições. O maior destaque de redução ocorreu para o enxofre em 33,33%.

As maiores discrepâncias entre as repetições do ensaio de fermentação acética de manipueira ocorreram no fósforo com o aumento de 33,33% em C1 e para C2 o valor não foi alterado. O mesmo ocorreu para o potássio, aumento de 7,69% (C1) e C2 inalterado, assim como também o magnésio, porém com redução de 15% (C2) e C1 permaneceu inalterado. Para o sódio, o valor da repetição C1 foi de redução em 4,16% e na repetição C2 houve um aumento de 10,41%.

O ensaio de fermentação acética da manipueira, ensaio C, diferentemente do ensaio de fermentação acética do suco de laranja, não demonstrou a utilização do nitrogênio pelas bactérias acéticas. O valor de nitrogênio permaneceu o mesmo. O valor de nitrogênio do suco de laranja *in natura* foi de 1400 mg L⁻¹ e o valor do mesmo componente em manipueira foi a metade (700 mg L⁻¹).

Apesar do substrato manipueira ter apresentado o melhor rendimento na fermentação alcoólica em relação ao substrato suco de laranja, no processo de fermentação acética foi inverso. A baixa redução de minerais após a fermentação acética da manipueira encontra-se diretamente relacionada com os baixos valores de acidez.

Tabela 14 – Resultados do perfil de ácidos orgânicos obtidos no final da fermentação acética da manipueira (12 dias) ensaio C (C1 e C2, repetição) expressos em % (peso/peso).

Amostra	Etanol	Ácido acético	Ácido cítrico	Ácido ascórbico	Ácido propanóico	Ácido láctico
C1	4,40	0,41	0	0	0,28	0,31
C2	4,31	0,41	0	0	0,22	0,31

A análise de cromatografia que demonstrou o perfil dos ácidos orgânicos no ensaio C, foi realizada ao final do processo de fermentação acética, com isso, vale ressaltar que o produto final foi obtido da combinação do fermentado acético de laranja (inóculo) e fermentado acético da manipueira, já que neste ensaio, o iniciador da fermentação acética da manipueira foi o fermentado alcoólico de laranja.

Diferentemente do ensaio B, a análise de perfil de ácidos orgânicos do ensaio C, não apresentou ácido ascórbico e ácido cítrico, devido ao fato de que ao final dos 12 dias de ensaio, o fermentado alcoólico de laranja já havia sido totalmente substituído pelo fermentado acético de manipueira. Esse pode ter sido um efeito negativo no desenvolvimento das bactérias acéticas.

Assim como no ensaio B, as bactérias acéticas isoladas em meio de *Frateur* não apresentaram bom desempenho na conversão do etanol para ácido acético. O ensaio de fermentação acética do suco de laranja apresentou o valor de etanol de 2,36 e 2,38% (B1 e B2) enquanto o ensaio C apresentou praticamente o dobro do valor, 4,40/4,31 (C1/C2). Com esses resultados pode-se justificar os baixos valores de ácido acético ao final da fermentação acética de manipueira, de 0,41% para as repetições do ensaio.

Talvez pela ausência de vitaminas na composição do fermentado alcoólico de manipueira, nutriente importante para o metabolismo das bactérias acéticas.

Assim como no ensaio B, a presença do ácido láctico em 0,31% ocorreu provavelmente pela presença de bactérias lácticas contaminantes.

O ácido propanóico (0,28%) formado somente na fermentação acética da manipueira, provavelmente ocorreu pela presença de bactérias propanóicas presentes na manipueira e ausentes no suco de laranja.

4.6.2.3 Ensaio D

O ensaio D foi desenvolvido para avaliar o comportamento das bactérias acéticas em meio contendo o substrato manipueira, quando estivessem em seu pico de produção de ácido acético (inóculo obtido da fermentação acética do suco de laranja) e este foi realizado segundo a metodologia descrita no item 3.3.2. As análises de acidez e pH foram demonstradas na Tabela 15.

Tabela 15 – Evolução do pH e da acetificação do suco de laranja e da manipueira, ensaio D, expressa em g ácido acético/100 mL.

Apenas fermentado alcoólico de laranja						Introdução de ferm. alcoólico de manipueira						
Dia	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
Acidez	0,40	2,73	2,40	3,00	2,60	2,10	1,00	1,20	0,80	0,90	0,90	0,89
pH	4,43	3,20	3,35	3,21	3,95	4,05	4,15	4,18	4,20	4,19	4,22	4,24

Analisando-se a Tabela 15, pode-se notar que a acidez no ensaio D aumentou consideravelmente no 2° dia de fermentação, e se manteve na faixa de 2,5 % expresso em ácido acético até o 6° dia. Ao 7° dia de fermentação, a acidez diminuiu e o pH aumentou, resultado da adição dos 50 mL de fermentado alcoólico de manipueira no 6° dia do experimento. A partir deste ponto a alimentação do ensaio foi realizada com fermentado alcoólico de manipueira. A acidez seguiu diminuindo, e o pH aumentando até o fim dos 12 dias de ensaio.

Com esses resultados, pode-se notar que mesmo quando se adicionou fermentado alcoólico de manipueira ao meio acético de laranja contendo bactérias ativas, a fermentação acética do fermentado alcoólico de manipueira teve seu desempenho prejudicado. O problema pode ser devido à necessidade de adaptação das bactérias acéticas ao substrato de manipueira fermentada, com ausência de vitaminas, como o ácido nicotínico e o ácido pantotênico, ou a baixa eficiência de fermentação acética das bactérias selvagens isoladas das frutas.

Santos Jr. (2004) verificou em seu artigo que as bactérias acéticas necessitavam de diferentes quantidades de minerais e vitaminas, e inclusive, que a presença de alguns minerais afetava negativamente o desenvolvimento de certas bactérias. O autor encontrou resultados diferentes para *Acetobacter* sp (selvagem) e *Acetobacter aceti* CCT2565 de coleção de cultura. Por exemplo, o autor descobriu que para a linhagem *Acetobacter* sp, o zinco, o manganês e boro influenciavam negativamente o desenvolvimento da bactéria e a diminuição desses componentes aumenta a resposta de crescimento celular. Contudo, os mesmos componentes foram essenciais para o bom desenvolvimento da *Acetobacter aceti* CCT2565 de coleção de cultura. Com isso, as bactérias acéticas isoladas das frutas

fermentadas, podem ser mais exigentes de outros componentes para desempenho, não utilizados em nenhum dos ensaios de fermentação acética.

Neste caso seria importante o preparo de inóculo a partir de manipueira e não de frutas como feito na presente pesquisa.

Além de avaliar o comportamento das bactérias acéticas quando estivessem em seu pico de produção de ácido acético, o ensaio D diferiu dos ensaios B e C em dois aspectos: primeiramente a quantidade de substrato para a alimentação da fermentação acética, e em segundo o recipiente para a fermentação acética, sem os tubos para entrada e saída das amostras, o que contraria a literatura consultada, já que não houve preocupação com o rompimento do véu formado na superfície do fermentado acético pelas bactérias acéticas.

Tabela 16 - Minerais e suas variações no produto final do ensaio de fermentado acético de laranja e manipueira (12 dias) expressos em mg L⁻¹ e percentagem.

	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
Fermentado alcoólico de laranja	1300,00	440,00	1600,00	60,00	80,00	60,00	27,00	2,00	1,00	7,00	3,00
Fermentado alcoólico de manipueira	30,00	30,00	1300,00	100,00	200,00	30,00	96,00	3,00	1,00	2,00	1,00
Fermentado acético do ensaio D	900,00	230,00	1500,00	60,00	80,00	30,00	70,00	3,00	1,00	10,00	5,00
Variação em % (laranja) (*)	(-) 30,76	(-) 47,72	(-) 6,25	(+) 66,66	0,00	- 50,00	0,00	(+) 50,00	0,00	(+) 42,85	(-) 66,00
Variação em % (manipueira) (*)	(+) 2900,00	(+) 666	(+) 15,38	(-) 40,00	(-) 60,00	0,00	(-) 27,08	0,00	0,00	(+) 80,00	(-) 400,00

(*): Considerando o teor de variação dos nutrientes do fermentado alcoólico de laranja para o fermentado acético D e a variação dos nutrientes do fermentado alcoólico de manipueira para o fermentado acético D. Quando o teor no fermentado alcoólico foi maior, considerou-se a diferença para 100.

A Tabela 16 descreve os valores de minerais dos substratos, fermentado alcoólico de laranja e fermentado alcoólico de manipueira, assim como, os minerais do ensaio D.

Semelhante aos resultados obtidos nos ensaios C, as análises de minerais do ensaio D não demonstraram valores significativos quanto ao consumo dos mesmos pelas bactérias acéticas. O aumento dos minerais no ensaio D pode ter ocorrido pela soma dos minerais encontrados nos fermentados alcoólicos de laranja e manipueira.

Nota-se que no ensaio de fermentação acética D, assim como no ensaio de fermentação acética do suco de laranja, houve a diminuição do nitrogênio em relação ao fermentado alcoólico de laranja em 30,76%. Em ambos os ensaios de fermentação acética, ensaio B (de laranja) e ensaio D (laranja e manipueira) o nitrogênio inicial esteve presente em maior quantidade do que o mesmo presente no ensaio C (de manipueira). Talvez seja esse um dos motivos pelo qual a fermentação acética da laranja tenha sido melhor que a fermentação acética da manipueira.

Além do valor de nitrogênio, diminuíram também os valores de fósforo em 47,72%, potássio em 6,25%, cálcio em 40%, magnésio (60%) enxofre (50%) sódio (27,08% e zinco (400% e 66%) isso se for considerado o conjunto dos minerais encontrados nos fermentados alcoólico e acético.

A análise de umidade (ou substâncias voláteis a 105°C) foi em média de triplicata e apresentou o valor de 97,22% para o ensaio D.

A análise de cianeto livre do ensaio D foi 0,00228 mg L⁻¹ e mostrou-se semelhante à análise de cianeto livre no ensaio anterior (ensaio C), já que o fermentado alcoólico de manipueira foi o mesmo utilizado nos dois ensaios. Os baixos teores de cianeto livre confirmaram que o cianeto fixo também não foi liberado no ensaio D.

Tabela 17 - Resultados do perfil de ácidos orgânicos obtidos no final da fermentação acética da laranja e da manipueira, (12 dias), ensaio D, expressos em % (m/m).

Amostra	Etanol	Ácido acético	Ácido cítrico	Ácido ascórbico	Ácido propanóico	Ácido láctico
Fermentado acético do ensaio D	3,52	1,56	0,01	0,01	0,48	0,15

No ensaio D (em 3,52%) assim como nos ensaios B e C, o etanol continuou presente, confirmando a baixa conversão de etanol para ácido acético.

Os baixos valores de ácido cítrico e ácido ascórbico, ambos ácidos presentes na laranja, juntamente com os baixos valores de acidez, podem significar que durante os 12 dias de fermentação acética, o fermentado acético de laranja foi substituído praticamente por completo. O que restou foi o fermentado acético de manipueira que, por algum motivo, inibiu a atividade de conversão das bactérias acéticas de etanol para ácido acético.

O ácido acético produzido no ensaio D de 1,56% foi provavelmente originado da conversão do fermentado alcoólico de laranja e a presença do ácido láctico (0,15%) ocorreu provavelmente pela presença de bactérias contaminantes. O ácido láctico esteve presente em todos os ensaios de fermentação acética do segundo conjunto de ensaios.

O ácido propanóico foi de 0,48% e também esteve presente na análise de perfil dos ácidos orgânicos do ensaio C (fermentação acética da manipueira) e com isso pode-se observar que a formação desse ácido ocorreu por bactérias propanóicas presentes na manipueira.

5. CONCLUSÃO

O meio de *Frateur* acrescido de 1,0 mL de nistatina, por placa de *Petri*, na concentração de 10^5 UI, foi eficiente para o crescimento das bactérias acéticas e a inibição do crescimento de leveduras a 25°C.

A alimentação diária do fermentado acético de manipueira com fermentado alcoólico de manipueira não foi adequada para a elaboração de vinagre de manipueira. O uso de fermentado alcoólico de suco de laranja como iniciador do inóculo melhorou o processo mas não foi suficiente para manter a produção de vinagre, que estabilizou em teores muito baixos. Porém o mesmo aconteceu com a acetificação do caldo de laranja levando a hipótese de que as bactérias acéticas selecionadas não tiveram bom desempenho. Quando o volume de alimentação foi reduzido de 100 para 50mL a fermentação acética foi mais eficaz. Já o rompimento do véu de bactérias acéticas formado na superfície do ensaio não se apresentou como fator limitante para a produção de ácido acético. A produção de ácido acético mesmo que baixa comprovou a capacidade de conversão de álcool para ácido acético das bactérias isoladas neste estudo, permitindo alcançar o objetivo proposto para a pesquisa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, V.A.(coord). **Biotecologia Industrial: Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.4, 523p.

ARORA, H.L., CARIOCA, J.O.B. ARORA, H.L. **Biomassa: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1984. 643p.

BALTHA, A.D.T.de B.; CEREDA, M.P. **Cassava free cyanide analysis using KCN or acetone-cyanidrin as pattern**. In: INTERNATIONAL MEETING ON CASSAVA BREEDING, BIOTECHNOLOGY AND ECOLOGY,1., Brasília Anais ...p.132, Cassava Improvement to Enhance Livelihoods in Sub Saharan África and Northwest Brasil, Brasília, Federação Universidade de Brasília, Ministério do Meio Ambiente, 2006.

BENASSI JÚNIOR, M. **Avaliação da influência do grau de maturação do fruto cítrico na composição química e sensorial de refrigerantes, refrescos e energéticos à base de suco de laranja**. Campinas, 2005. 215 p. Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

BORTOLINE, F.; SANT ANNA, E.S.; TORRES, R.C. **Comportamento das Fermentações Alcoólicas e Acéticas de Sucos de Kiwi (Actinidia deliciosa)**; Composição dos Mostos e Métodos de Fermentação Acética. Ciência e tecnologia de Alimento, Campinas, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v21n2/7473.pdf>. Acesso em 15 jan.2005, 10:30.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químico para Análise de Alimentos** / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

CABELLO, C., LEONEL, M.; **Produção de Ácido Cítrico a Partir de Resíduo Líquido da Industrialização da mandioca (Manipueira)**. In: CEREDA, M. P. (Coord). Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da Industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v.4, cap.9, p.131-137. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). São Paulo: Fundação cargill, 2001.

CAMILI, E.A. **Tratamento da manipueira por processo de flotação sem o uso de agentes químicos**. 2007. 78p. Dissertação (Mestre em Agronomia/Energia na Agricultura)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, 2007.

CASSONI, V., CEREDA, M. P., VILPOUX, O., VENTURINI FILHO, W.G. **Meio seletivo para isolamento de *Acetobacter* sp.** In: Congresso Brasileiro de Ciência de Alimentos, 20, 2006, Curitiba. **Anais...** Curitiba, Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006. p.482.

CASSONI, V.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. **Meio para Manutenção de *Acetobacter* sp.** In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 32, 2005, Santos. **Anais...** Santos, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005.

CASTELO ALIMENTOS. Disponível em:
<<http://www.casteloalimentos.com.br/>> Acesso em: 18/jan/2007.

CEREDA, M.P.; **Caracterização dos subprodutos da Industrialização da Mandioca**. In: CEREDA, M.P. (coord) Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da Industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação cargill, 2001. v.4, cap.1, p.13-37. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). São Paulo: Fundação cargill, 2001.

CEREDA, M.P.e PANTAROTO, S., **Linamarina e sua Composição no ambiente**. In: CEREDA, M.P. (coord) Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da Industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação cargill, 2001. v.4, cap.2, p.38-47. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). São Paulo: Fundação cargill, 2001
DISPONÍVEL EM: <http://www.abam.com.br/livroscargil/volume4.htm> ACESSO 15/05/2007

CEREDA, M.P.e VILPOUX, O. **Produtos Regionais a Base de Mandioca ou Derivados**. In: CEREDA, M.P. Tecnologia, Uso e Potencialidade de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. v.4, cap.1, p. 13-37. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). São Paulo: Fundação cargill, 2003. Disponível em: <http://www.abam.com.br/livroscargil/volume3.htm>

CETESB. **Norma Técnica CETESB – P4.231** (versão Janeiro/2005) 11p.2005.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. **Quantificação de cianeto total e livre de amostras de tucupi comercializadas na cidade de Belém-PA**. 2005. DISPONÍVEL EM: http://www.artigocientifico.com.br/uploads/artc_1166153182_92.pdf ACESSO 15/05/2007.

CURY, A. E. **Atividade in vitro de alguns anti-sépticos sobre Cândida**. Rev. Microbiol., v. 17, n. 2, p. 137-142, 1986.

DAMASCENO, S. **Manipueira como substrato para desenvolvimento de *Geotrichum fragans***. 1999. 117f. Tese (Doutorado em Agronomia/ Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

DE LEY, J.; GILLIS, M.; SWINGS, J. Family VI. *Acetobacteriaceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. v. 1, p.267-277, 1984.

DEL BIANCHI, V. L. **Balço de massa e de energia do processamento de farinha de mandioca em uma empresa de médio porte**. 1998. 118f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

FERRAZZA, M. H. S.H. et al. **Caracterização de leveduras isoladas da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil**. Rev. Bras. Ginecol. Obstet., Maringá, v. 27, n. 2, p.58-63, 2005.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (Ed.). **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

INSTITUTO AGRONÔMICO: Toxicidade da mandioca, resíduos de fábrica de farinha, utilização, tratamento e eliminação de resíduos. Parecer técnico. Campinas, 10p, 1989.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. vol.1, p.267-277.

Laboratório Nacional de Referência Vegetal-LANARV-**Análise de Corretivos, Fertilizantes e Inoculantes**-Métodos Oficiais-Ministério da Agricultura-1988.

LANE, J.H.; EYNON. **Determinattion of reducing sugars by Fehling`s solution with methylene blue indicator,** Normam Rodge, London, 8p. 1934.

MAGALHÃES, C. P. **Estudos sobre as bases bioquímicas da toxicidade da manipueira a insetos, nematóides e fungos,** 121p. 1998. Dissertação (Mestrado no Centro de Ciências) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1998.

MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. **Biotransformação de terpenos para a produção de compostos de aroma e funcionais.** 2006. 182p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos/Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

MARTINELLI, FILHO, A. **Tecnologia de Vinhos e Vinagres de Frutas.** Piracicaba: Usp. 1982. 130p.

MENEGUZZO, J.; RIZZON, L. A. **Sistema de produção de vinagre.** Sistema de produção 13. Embrapa Uva e Vinagre. 2006. disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinagre/SistemaProducaoVinagre/autores.htm>>. Acesso em 10 jul. 2007.

MENEZES, E. A. et al. **Isolamento de Cândida spp. no mamilo de lactantes do Banco de Leite Humano da Universidade Federal do Ceará e teste de susceptibilidade a antifúngicos.** Bras. Patol. Med. Lab., Fortaleza, v. 40, n. 5, p. 299-305, 2004.

MENEZES, J.T.B.; **Produção de Biomassa Protéica a Partir de Manipueira.** In: CEREDA, M. P. (coord). Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da Industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação cargill, 2001. v.4, cap.8, p.118-130. (Série Culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). São Paulo: Fundação cargill, 2001.

NEVES, V. J. M. das. **Uso do resíduo da produção da farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino.** 2004. 55p. Dissertação (Mestre em Agronomia/energia na Agricultura)- Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2004.

NITSCHKE, M. M., e PASTORE, G.M. **Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactante production.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 106, 295-302, 2003.

NODYE, B. et al. **Termoresistant properties of acetic acids bacteria isolated from tropical products of Sub-Sahara África and destined to industrial vinegar.** Enzyme and Microbial Technology., África Sub-Sahara, v. 39, p. 916-923, 2006.

PANTAROTO, S. **Isolamento, seleção, identificação e avaliação de microrganismos anaeróbios “in situ”, com habilidade à biodegradação de linamarina.** 2001. 128P. Dissertação (Mestre em Agronomia/ Energia na Agricultura)- Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

PAWLOSKEY, U., RODA, L.S.A., TOSIN, M., HEISLER, I. **Curso de tratamento de efluentes industriais:** Industrialização de mandioca. Curitiba: SUREHMA, 126p., 1991.

PONTE, J.J., **Uso da Manipueira como Insumo Agrícola: Defensivo e Fertilizante.** In: CEREDA.M.P. (coord) Manejo, Uso e tratamento de subprodutos da Industrialização da mandioca. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v.4, cap.5, p.80-95. (série culturas de tuberosas amiláceas Latino Americanas). São Paulo: Fundação cargill, 2001.

RAO, M. R. R. e STOKES, J. L., **Utilization of ethanol by acetic bacteria.** Department of Bacteriology, Indiana University, Bloomington, Indiana, v. 66, p. 634-638, 1953. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/reprint/66/6/634.pdf>> Acesso em 15/jan/2005.

SANTOS JR., V. dos. **Estudo dos fatores nutricionais de bactérias acéticas.** Campinas, 2004. 69 p. Dissertação (Mestre em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SARAIVA, F. Z. et al., **Uso de manipueira no desenvolvimento do milho em ambiente protegido,** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, Campina Grande; v.11, n.1, p.30–36, 2007.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial**. 1.ed.. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001. v2. 541p.

SPINOSA, W.A. **Isolamento, seleção, identificação e parâmetros cinéticos de bactérias acéticas provenientes de indústrias de vinagre**. 2002.243 p. Tese (Doutor em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SUCO DE LARANJA. Disponível em:

<<http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.php?id=2152>> Acesso em 22/dez/2006.

TAN, S. T. **Vinegar Fermentation**. 2005. 89p. Master of Science in The Department of Food Science. Agricultural and Mechanical College, Louisiana State University.

VITAL, T. M. et al. **Estudo comparativo de duas técnicas farmacopéicas de avaliação da atividade antimicrobiana dos fármacos: nistatina, eritromicina, neomicina e gentamicina**. Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences., Goiânia, v. 40, n. 2, p. 19-227, 2004.

WOOD, B. J. B. **Microbiology of fermented foods**. Edited by Brian J.B. Wood. London:Blackie Academic & Professional, 1998. 2v.:il., graf., tabs.