



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

BRENDA DE NAZARÉ DO CARMO BRITO

**AMINAS BIOATIVAS, BACTÉRIAS LÁCTICAS E β -CAROTENO DURANTE O
PROCESSAMENTO DO TUCUPI**

BELÉM - PA

2019

BRENDA DE NAZARÉ DO CARMO BRITO

**AMINAS BIOATIVAS, BACTÉRIAS LÁCTICAS E β -CAROTENO DURANTE O
PROCESSAMENTO DO TUCUPI**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Alimentos da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena

Co-orientadora: Prof. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

BELÉM - PA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo (a) autor (a)

B862a Brito, Brenda de Nazaré do Carmo
AMINAS BIOATIVAS, BACTÉRIAS LÁCTICAS E BETA-CAROTENO
DURANTE O PROCESSAMENTO DO TUCUPI /

Brenda Brito. — 2019.
107 f.: il. Color.

Orientador (a): Prof. Dr. Rosinelson Pena

Coorientação: Prof^a. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. Manihot esculenta Crantz. 2. manipueira. 3. Aminas biogênicas. 4. qualidade. 5. biologia molecular. I. Título.

CDD 641.3

BRENDA DE NAZARÉ DO CARMO BRITO

**AMINAS BIOATIVAS, BACTÉRIAS LÁCTICAS E β -CAROTENO DURANTE O
PROCESSAMENTO DO TUCUPI**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Rosinelson da Silva Pena
(PPGCTEA/ITEC/UFPA) – Orientador

Prof. PhD. Maria Beatriz Abreu Glória
(PPGCA/UFMG) – Co-orientadora

Prof. Dra. Consuelo Lucia Sousa de Lima
(PPGCTEA/ITEC/UFPA) – Membro interno

Prof. Dra. Ana Vânia Carvalho
(EMBRAPA-CPATU) – Membro interno

Dra. Laura Figueiredo Abreu
(EMBRAPA-CPATU) – Membro Externo

Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo
(FEA/ITEC/UFPA) – Membro Externo

Dedico ao meu pai e avô, Jacinto Brito (in memoriam),

Minha mãe e avó, Maria de Nazaré Brito

Minha mãe, Elizabete Brito,

Dedico a vocês com todo meu amor, carinho, admiração e gratidão...

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta Tese, foi utilizar duas páginas para agradecer as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória de 12 anos de Universidade Federal do Pará. Nesta tive uma árdua jornada de desafios, construções e amadurecimento. Agradeço a todas as pessoas que me encorajaram e me ajudaram a produzir algo de valor em minha vida. Em primeiro lugar, a **DEUS** por estar sempre presente na minha vida e me fortalecer nos momentos mais difíceis. À minha mãe (**Elizabete**), que em todos os momentos da minha vida tem sido minha maior incentivadora, cujo amor é incondicional, torce por mim a cada batalha enfrentada e comemora cada vitória, meu alicerce. À minha mãe-avó (**Maria de Nazaré**), meu exemplo de mulher, admiro sua força e sua forma de encarar o mundo. Ao **Marcel**, por ser a luz em nossas vidas, sua alegria nos contagia, meu irmãozinho querido! Ao **Alessandro**, por ser um grande amigo e companheiro da nossa família. Ao meu pai-avô (**Jacinto**), que infelizmente não pode estar comigo fisicamente, mas sei que sua presença em minha vida se faz constante! Aos meus **primos, tios e tias**, pelo carinho, apoio e convivência!

À minha madrinha **Clarice**, a qual considero uma mãe, obrigada por todo carinho que me tem dedicado, todo apoio na minha vida e jornada acadêmica!

Agradeço a prof. **Dra. Alessandra Santos Lopes**, por ter sido a minha primeira grande incentivadora nesta vida acadêmica, obrigada pela confiança, pela amizade e convivência. Levo seus ensinamentos, conselhos e exemplos para minha vida profissional e pessoal.

Agradeço ao **Dr. Renan Campos Chisté**, meu eterno “Chefinho”, que foi outro grande incentivador, meu exemplo de profissional, a quem admiro e respeito. Agradeço seu apoio, pelos momentos de descontração, seus conselhos e sua amizade. Sua participação no meu crescimento profissional foi fundamental.

Agradeço em especial a **Dra. Maria Beatriz Abreu Glória** pela co-orientação, tanto no mestrado quanto no doutorado, pelas análises realizadas na Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Alimentos. Obrigada por toda a disponibilidade manifestada, pela ajuda e interesse demonstrados, pela revisão crítica do texto, pelos proveitosos comentários, esclarecimentos, opiniões e sugestões, pela acessibilidade, cordialidade, apesar da distância e de sua intensa vida profissional. Seu profissionalismo é digno de minha grande admiração.

Por fim, agradeço ao meu orientador **Dr. Rosinelson da Silva Pena**, o qual sempre tive imensa admiração e respeito, que ao me tornar sua orientada, estes sentimentos se

concretizaram ainda mais. Lhe agradeço, por sempre me induzir a pensar criticamente e pela confiança em mim depositada. Muito obrigada pelo seus ensinamentos, conselho e amizade. Vocês foram e são referências profissionais e pessoais para meu crescimento. Obrigada por estarem ao meu lado e acreditarem em mim!

Dirijo um agradecimento especial à Prof. ***Dra. Consuelo Lucia Sousa de Lima, Dra. Ana Vânia Carvalho, Dra. Laura Figueiredo Abreu e Dr. Hamilton Mendes de Figueiredo***, que compuseram a minha Banca de avaliação, pela leitura atenta do trabalho e pelas valiosas contribuições.

A meus amigos de LAFAMI, laboratório no qual vivi os melhores momentos da minha vida, foi minha segunda casa, por pelo menos 10 anos, nele fiz amizades das quais tenho muito carinho e respeito. Agradeço a ***Gleeice Machado, Leilane Andrade, Flávia Pires, Diego Aires, Wanessa Araújo, Elivaldo Modesto, Luan Mescouto, Mayara Galvão, Jaqueline Moraes, Adriano Lucena, Adriano Rondinelli, Paulo Chada***, pelos momentos, pelo carinho, e por dividirem comigo as angústias e alegrias. Foi muito bom poder contar com vocês! Vocês foram meus companheiros de trabalho e irmãos na amizade que fizeram parte da minha formação e que vão continuar presentes em minha vida com toda certeza.

Tenho um agradecimento especial a ***Mayara e Jaqueline***, não tenho palavras para agradecer, pois me estenderam a mão num momento delicado, abdicaram suas férias para me ajudar na realização de uma parte do meu trabalho. Vocês terão minha eterna gratidão.

Agradeço ao meus Amigos do LABIOTEC, ***Francilia Siqueira, Deusa Costa, Daniela Gaspar***, e aos outros integrantes deste laboratório, por me receberem de braços abertos, em especial ao ***Gilson Chagas***, obrigada pela paciência, por todo ensinamento na microbiologia, pelos momentos vividos, e principalmente pela amizade, não tenho palavras para agradecer.

E finalmente à ***Universidade Federal do Pará (UFPA)*** que, juntamente com o ***Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)***, do Instituto de Tecnologia (ITEC), ofereceram suporte ao desenvolvimento das atividades acadêmicas importantes para a minha formação através dos bons professores do curso. A ***Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA)***, pela bolsa concedida.

RESUMO

As raízes de mandioca podem gerar os mais diversos produtos, porém um molho de cor amarela com sabor e aroma exótico, com inúmeras potencialidades de uso na indústria de alimentos, ganhou destaque no mercado nacional e internacional. Entretanto, sua produção ainda ocorre de maneira artesanal, visto que as informações tecnológicas sobre as principais etapas da produção, desde a fermentação da manipueira até o produto final, ainda são insuficientes para que seja produzido um produto padronizado com segurança e qualidade. Este caldo, é o tucupi, obtido da fermentação da manipueira, resíduo líquido proveniente da produção de farinha, seguido de cocção. Diante do exposto, devido a escassez de dados na literatura científica sobre este produto, foi realizado um levantamento dos tucupis comercializados em Belém (PA), e os resultados obtidos demonstraram que este produto ainda continua sendo comercializado fora dos padrões oferecendo risco ao consumidor, mesmo após a criação de um padrão de identidade e qualidade para o Tucupi. Com relação as propriedades físico-químicas, as amostras evidenciaram que o processamento do produto, ainda é variável, principalmente nas etapas de fermentação e de cocção, com variações no pH, acidez e teores de açúcar total e redutor. As amostras apresentaram elevados teores de cianeto total (8,87- 114,66 mg HCN/L) e livre (0,80 - 38,38 mg HCN/L) e a presença de amins biogênicas (tiramina, putrescina, histamina e triptamina) as quais podem causar intoxicações alimentares. Foi verificado a influência da fermentação da manipueira no perfil de carotenoides e amins bioativas, durante a produção de tucupi. Os carotenoides não sofreram influência deste processo, e as amins bioativas identificadas (espermidina, putrescina, tiramina e histamina) permitiram afirmar que durante o processo fermentativo deve haver um controle mais efetivo das condições higiênico-sanitárias. Com base nesses resultados, foi feita a identificação molecular dos micro-organismos responsáveis pela fermentação espontânea da manipueira, para obter o tucupi. Tal conhecimento, permitirá o desenvolvimento de uma cultura starter adequada para a produção deste produto com qualidade e segurança. Foi dado destaque para as bactérias lácticas, por serem estes micro-organismos predominantes durante à fermentação da mandioca, além de possuírem genes que sintetizam amins biogênicas. Foram identificadas apenas duas espécies de bactéria lácticas, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, com predominância do *L. fermentum* durante todo o processo, sendo que as amins bioativas identificadas (putrescina, histamina, espermidina) não interferiram na sobrevivência destas bactérias. A literatura evidencia uma correlação entre as bactérias lácticas identificadas e a produção das amins biogênicas, porém é fundamental que sejam realizadas outras pesquisas genéticas para ratificar a capacidade do *L. plantarum* e *L. fermentum* de codificarem a enzima descarboxilase, afim de produzir as amins biogênicas. Sugere-se que seja realizado a pesquisa de leveduras atuantes nesse processo de fermentação, pois outras vertentes sobre o tucupi ainda precisam ser analisadas para que se tenha um ajuste efetivo na produção, a fim de garantir um alimento seguro.

Palavras-chave: *Manihot esculenta* Crantz, manipueira, amins biogênicas, qualidade, biologia molecular

ABSTRACT

The cassava roots can generate the most diverse products, but a sauce of yellow color with flavor and exotic aroma, with countless potential use in the food industry, has gained prominence in the domestic and international market. However, its production follow a popular way, since the technological information on the main stages of production, from the fermentation of the Manipueira to the final product, are still insufficient to produce a product standardized with safety and quality. This broth is the Tucupi, obtained from the fermentation of the Manipueira, is a liquid residue from the production of flour, followed by cooking. In view of the lack of data in the scientific literature about this product, a reserach of tucupis marketed in Belém (PA) was carried out and the results showed that this product is still marketed outside the pattern of identity and quality for the Tucupi. With respect to physicochemical properties, the samples showed that the processing of the product is still variable, especially in the stages of fermentation and cooking, with variations in pH, acidity and contents of total sugar and reducer. The samples showed high levels of total cyanide (8.87-114.66 mg HCN/L) and free (0.80-38.38 mg HCN/L) and the presence of biogenic amines (tyramine, putrescine, histamine and tryptamine) which may cause food poisoning. The influence of Manipueira fermentation on the profile of carotenoids and bioactive amines were verified during the production of Tucupi. The carotenoids were not influenced by this process, and the bioactive amines identified (Spermidine, putrescine, tyramine and histamine) allowed to affirm that during the fermentative process there should be more effective control of the sanitary hygiene conditions. Based on these results, the molecular identification of the microorganisms responsible for the spontaneous fermentation of Manipueira to obtain the Tucupi. Such knowledge will enable the development of a starter culture suitable for the production of this product with quality and safety. It was highlighted for the lactic bacteria, because these microorganisms predominate during the fermentation of cassava, besides possessing genes to synthesis of biogenic amines. Were identify only two species of lactic bacteria, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*, with predominance of *L. fermentum* during the whole process was identified, and the bioactive amines identified (putrescine, histamine, spermidine) did not interfere in the activity of these bacteria. The literature evidences a correlation between the identified lactic bacteria and the production of biogenic amines, but it is essential that other genetic researches performed to ratify the capacity of *L. Plantarum* and *L. Fermentum* to encode the decarboxylase enzyme in order to produce biogenic amines. Suggested that the research of active yeast in this fermentation process be carried out, because other ways on the tucupi still need to be analyzed in order to have an effective adjust in the production, to produce a safe food.

Keywords: *Manihot esculenta* Crantz, manipueira, biogenic amines, quality, molecular biology.

LISTAS DE TABELAS

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Efeitos farmacológicos de algumas aminas.35

Tabela 2. Principais alimentos sujeitos a contaminação por aminas biogênicas e os micro-organismos produtores.....37

CAPÍTULO II - AMINAS BIOGÊNICAS E CIANETO COMO INDICADORES DE QUALIDADE EM TUCUPIS COMERCIAIS

Tabela 1. Caracterização físico-química das amostras de tucupi obtidas no mercado consumidor de Belém-PA.57

Tabela 2. Dosagem de cianeto total e livre nas amostras de tucupi.60

Tabela 3. Composição de aminas bioativas nas amostras de tucupi.....63

CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA NO PERFIL DE AMINA BIOATIVAS E CAROTENOIDES DURANTE A PRODUÇÃO DE TUCUPI

Tabela 1. Caracterização físico-química e parâmetros de cor durante a produção de tucupi..79

Tabela 2. Aminas Bioativas (mg/L) durante a produção de tucupi.83

CAPÍTULO IV- IDENTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA PARA PRODUÇÃO DO TUCUPI

Tabela 1. Identificação molecular das bactérias lácticas isoladas da fermentação da manipueira98

LISTAS DE FIGURAS

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 1.** Descascamento manual (a) e mecânico (b) das raízes de mandioca..... 20
- Figura 2.** Trituração das raízes de mandioca. 21
- Figura 3.** Prensagem da massa de mandioca com liberação da manipueira. (a) Prensa manual de parafuso; (b, c) Tipiti. 21
- Figura 4.** Manipueira. 22
- Figura 5.** Manipueira fermentada (24 horas) com o precipitado. 23
- Figura 6.** Embalagem do tucupi. 24
- Figura 7.** Cianogênese – Processo de liberação do cianeto da mandioca..... 26
- Figura 8.** Formação de aminas pela descarboxilação de aminoácidos (1) e pela aminação de aldeídos (2). 29
- Figura 9.** Biossíntese de aminas bioativas em vegetais..... 31

CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA NO PERFIL DE AMINA BIOATIVAS E CAROTENOIDES DURANTE A PRODUÇÃO DE TUCUPI

- Figura 1.** Cromatograma obtido do HPLC-DAD à 450 nm dos carotenoides extraídos das raízes de mandioca utilizadas para a produção de tucupi. 80
- Figura 2.** Alterações dos carotenoides durante a produção de tucupi. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os teores de 9-cis- β -caroteno, all-trans- β -caroteno e 13-cis- β -caroteno durante o processo de produção. 81
- Figura 3.** Classificação dos diferentes estágios de produção de tucupi afetados pelas características físico-químicas, teores de carotenoides e aminas bioativas. (a) Projeção das variáveis por Análise de Componentes Principais (ACP); e (b) Dispersão das amostras dos diferentes estágios de produção de tucupi pelo PCA (c) Dendrograma pela análise. 86

CAPÍTULO IV- IDENTIFICAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS E BACTÉRIAS LÁCTICAS NA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA PARA PRODUÇÃO DO TUCUPI

- Figura 1.** Perfil e teor das aminas bioativas identificadas durante a fermentação da manipueira. 100

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA	18
1 A MANDIOCA	18
2 PRODUÇÃO DO TUCUPI.....	19
<i>Lavagem e descascamento das raízes</i>	<i>20</i>
<i>Trituração das raízes</i>	<i>20</i>
<i>Prensagem da massa</i>	<i>21</i>
<i>Manipueira.....</i>	<i>22</i>
<i>Fermentação</i>	<i>22</i>
<i>Cocção, adição de condimentos e embalagem.....</i>	<i>24</i>
3 CAROTENOIDES NA MANDIOCA	25
4 COMPOSTOS CIANOGENICOS	26
5 AMINAS BIOATIVAS	28
5.1 ASPECTOS GERAIS.....	28
5.2 BIOSÍNTESE.....	29
5.2.1 Aminas biogênicas	29
5.2.2 Poliaminas	30
5.3 IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA	32
5.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS.....	33
5.5 AMINAS BIOATIVAS EM ALIMENTOS.....	36
6 FLORA MICROBIANA DA FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA.....	38
7 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE AMINAS BIOGÊNICAS.....	40
8 REFERÊNCIAS	42
CAPITULO II - AMINAS BIOGÊNICAS E CIANETO COMO INDICADORES DE QUALIDADE EM TUCUPIS COMERCIAIS	52
RESUMO.....	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAL E MÉTODOS	54
2.1 MATÉRIA-PRIMA	54

2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	54
2.2.1 Caracterização físico-química	54
2.2.2 Determinação do cianeto total e livre	54
2.2.3 Identificação e quantificação das aminas bioativas.....	55
2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	56
3.2 AVALIAÇÃO DO CIANETO TOTAL E LIVRE.....	59
3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS.....	62
4 CONCLUSÃO.....	66
5 REFERÊNCIAS	67
CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS E CAROTENOIDES DURANTE A PRODUÇÃO DE TUCUPI	70
RESUMO.....	70
1 INTRODUÇÃO	71
2 MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 REAGENTES E SOLVENTES.....	73
2.2 MATÉRIA-PRIMA	73
2.3 OBTENÇÃO DO TUCUPI	74
2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	74
2.4.1 Caracterização físico-química durante a produção de tucupi	74
2.4.2 Análise de carotenoides	75
2.4.3 Determinação de aminas bioativas.....	76
2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1. MUDANÇAS NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	77
3.2. ALTERAÇÕES NO TEOR DE CAROTENOIDES	80
3.3. ALTERAÇÕES NAS AMINAS BIOATIVAS	82
3.4. CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DURANTE A PRODUÇÃO DE TUCUPI POR ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA.....	85
4 CONCLUSÃO.....	87
5 REFERÊNCIAS	88

CAPITULO IV - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E AMINAS BIOATIVAS DURANTE A FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA PARA A OBTENÇÃO DO TUCUPI.....	92
1 INTRODUÇÃO	93
2 MATERIAL E MÉTODOS	94
2.1 MATÉRIA-PRIMA	94
2.2 FERMENTAÇÃO DA MANIPUEIRA	94
2.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS (BAL).....	94
2.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR	95
2.4.1 Extração do DNA genômico das bactérias	95
2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	95
2.5 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS	96
2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	97
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
3.1 MICROBIOTA DA PRODUÇÃO DO TUCUPI.....	97
3.2 AMINAS NA PRODUÇÃO DO TUCUPI	99
4 CONCLUSÃO.....	102
5 REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO GERAL

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) possui uma produção mundial de aproximadamente 285 milhões de toneladas de raízes por ano (FAOSTAT, 2017). No Brasil, a estimativa para a produção de mandioca em 2019 será de 20 milhões toneladas, com destaque para a região Norte, onde a principal utilização é na produção de farinha de mandioca (IBGE, 2019). Na região amazônica, existe um produto alimentício, amplamente utilizado como ingrediente na elaboração de diversos pratos, devido as suas características sensoriais exóticas: o *tucupi*.

Durante a fabricação da farinha, após trituração e prensagem, obtêm-se a manipueira, que consiste em um líquido de cor amarela, extraído da mandioca brava. Esse líquido é submetido a um processo de fermentação espontânea, seguido de cocção, obtendo-se assim o *tucupi*. A coloração amarela do produto é atribuída aos carotenoides, que desempenham funções e ações fisiológicas importantes, sendo a atividade provitamina A, a mais conhecida (LA FRANO et al., 2014). Essa classe de pigmentos atua positivamente no organismo humano, uma vez que pesquisas demonstram uma relação benéfica entre o consumo de alimentos contendo carotenoides e a prevenção de várias doenças crônico-degenerativas, como o câncer, inflamações, doenças cardiovasculares, cataratas, degeneração macular, entre outras (LINNEWIEL-HERMONI et al., 2015; WOODSIDE et al., 2015; NWACHUKWU; UDENIGWE; ALUKO, 2016; ROOHBAKHSH; KARIMI; IRANSHAHI, 2017).

Um outro aspecto importante da composição da mandioca é a toxicidade das raízes, devido à presença do ácido cianídrico (HCN). Mandiocas com alto teor de HCN podem resultar em um *tucupi* com elevada concentração desse composto, caso não seja realizado uma detoxificação nas etapas de obtenção do produto (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; CHISTÉ; COHEN, 2011). O consumo de produtos com elevados teores de cianeto, podem levar a intoxicações e causar doenças como o hipertireoidismo, a neuropatia atáxica tropical e o kongo, e em alguns casos, até a morte (NHASSICO et al., 2008; KASHALA-ABOTNES et al., 2019).

Outros compostos importantes para saúde humana são as amins bioativas, substâncias que participam de reações fisiológicas e metabólicas importantes que ocorrem nos organismos vivos e exercem diversas funções biológicas (GLÓRIA, 2005; KALÁČ ; KRAUSOVÁ, 2005). Dentre as classificações feitas para as amins bioativas, a que possui relevância para a saúde humana são as poliaminas e amins biogênicas, as quais serão abordadas neste estudo. Algumas

podem apresentar efeitos adversos à saúde; são as denominadas aminas biogênicas, que quando ingeridas em elevadas concentrações, podem agir no sistema nervoso e vascular, devido as ações psicoativas ou vasoativas, respectivamente (GLÓRIA, 2005; RODRIGUEZ et al., 2014; GUO et al., 2015).

Em função da composição, das propriedades físico-químicas e das condições de manipulação, o tucupi apresenta-se como um meio propício para produção de aminas biogênicas. De acordo com EFSA (2011), os alimentos fermentados estão mais associados com intoxicações alimentares, devido à intensa atividade microbiana e conseqüentemente a potencial formação de aminas biogênicas. Essas aminas podem estar naturalmente presentes em alimentos, ou serem formadas por micro-organismos inerentes ou adicionados (culturas iniciadoras), ou ainda serem provenientes de contaminação, devido as condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, as aminas podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a qualidade das matérias-primas, bem como as condições higiênico-sanitárias nas etapas de fabricação de um produto (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ et al., 2002; GLÓRIA, 2005). Pesquisas sobre a identificação molecular de micro-organismos responsáveis pela fermentação espontânea da mandioca, poderão permitir o desenvolvimento de uma cultura *starter* adequada para a produção do tucupi, com qualidade e segurança.

Diversos estudos investigaram os micro-organismos envolvidos na produção de alimentos fermentados a base de mandioca. Porém, na literatura científica, com relação ao tucupi, ainda não há informações quanto aos tipos de micro-organismos envolvidos (família, gênero, espécies, subespécies) e por se tratar de uma fermentação espontânea, as reações envolvidas são mais complexas. Diversas pesquisas apontam as bactérias ácido lácticas como os micro-organismos dominantes no processo de fermentação da mandioca (OYEWOLE, 2001; MIAMBI; GUYOT; AMPE, 2003; LACERDA et al., 2005; OGUNTOYINBO; DODD, 2010), logo supõe-se que a fermentação da manipueira, para obtenção do tucupi seja realizada por bactérias lácticas.

No intuito de levantar informações sobre o processo de fermentação e as alterações decorrentes deste processo na produção do tucupi, esta tese está organizada da seguinte maneira:

Capítulo I – Referencial Teórico, para contextualização de conceitos importantes para o desenvolvimento da tese, assim como reporta os trabalhos já publicados sobre o tema.

Capítulo II – Manuscrito “Aminas biogênicas e cianeto como indicadores de qualidade em tucupis comerciais”, o qual apresenta um levantamento sobre a qualidade do tucupi comercializado na cidade de Belém, PA, com base no perfil de aminas bioativas, concentração de cianeto total e livre, e nas características físico-químicas do produto.

Capítulo III – Manuscrito “Influência da fermentação espontânea da manipueira no perfil de aminas bioativas e carotenoides durante a produção do tucupi” publicado na revista *Food Research International* (<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.02.040>). Esse trabalho apresenta uma investigação sobre a ocorrência e o perfil de carotenoides e aminas bioativas nas etapas de beneficiamento do tucupi, utilizando duas técnicas exploratórias multivariadas.

Capítulo IV – Manuscrito “Identificação de bactérias lácticas e aminas bioativas na fermentação da manipueira para produção do tucupi”. Neste trabalho foram isoladas e identificadas bactérias lácticas, durante a fermentação da manipueira para a obtenção do tucupi, e determinação das aminas bioativas presentes e/ou formadas durante o processo.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

A pesquisa teve por objetivo avaliar a qualidade do tucupi comercial, em função da presença de aminos bioativas e da concentração do cianeto, bem como o perfil e a concentração de aminos bioativas e de carotenoides nas etapas de beneficiamento do produto. Adicionalmente, foram identificadas as bactérias lácticas presentes nas etapas de beneficiamento do tucupi, bem como avaliada a correlação das mesmas com a produção de aminos bioativas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil e os teores de aminos bioativas e a concentração de cianeto total e livre em amostras de tucupis comerciais;
- Avaliar o perfil e o teores de aminos bioativas e de carotenoides durante a fermentação da manipueira, para produção de tucupi;
- Isolar e identificar as bactérias lácticas na manipueira, antes e durante a fermentação, bem como correlacionar as mesmas com a formação de aminos bioativas nas etapas da produção do tucupi.

CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1 A MANDIOCA

De grande versatilidade, a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é totalmente aproveitada, desde a parte aérea (folhas e hastes) até as raízes. As folhas são usadas na alimentação humana e animal; as hastes são utilizadas na alimentação animal, sob a forma de silagens e fenos; e as raízes são empregadas para a alimentação humana, principalmente na forma de farinhas, bem como para a produção de fécula (CONAB, 2014).

De acordo com o último levantamento sistemático da produção agrícola (LSPA), realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em janeiro de 2019 a produção de mandioca foi de ≈20 milhões de toneladas no Brasil. Houve aumento de 4,2% em relação ao ano de 2018, sendo a região Norte responsável por 36,1% da produção nacional. O estado do Pará é considerado o maior produtor desta raiz, responsável por uma produção de ≈4 milhões de toneladas (IBGE, 2019).

As raízes de mandioca contêm, em média, 68,2% de umidade, 30% de amido, 2% de cinzas (potássio, cálcio e magnésio são os principais minerais), 1,3% de proteínas e 0,2% de lipídeos (CENI et al., 2009). O elevado teor de amido da mandioca a torna um produto de boa fonte energética, uma vez que fornece aproximadamente 610 kJ/100 g da raiz (NGUDI; KUO; LAMBEIN, 2002; CONAB, 2014). A raiz da mandioca contém uma quantidade significativa de micronutrientes, que podem variar em função do genótipo e de condições ambientais (BURNS et al., 2012).

O cianeto proveniente dos compostos cianogênicos é um fator limitante para a utilização da mandioca na alimentação humana. Em função do teor de cianeto a mandioca pode ser classificada: como mansa (<50 mg HCN/kg), moderadamente venenosa (50 – 100 mg HCN/kg) e brava (>100 mg HCN/kg). Desta forma, se torna indispensável o processamento da raiz de modo a assegurar a eliminação dos compostos cianogênicos (VALLE et al., 2004; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007).

Na região Norte, o maior uso da mandioca é na fabricação da farinha de mesa e na produção do tucupi, que é considerado um ingrediente tradicional da cultura amazônica. O tucupi tem grande potencialidade para a indústria de alimentos e é capaz de gerar trabalho e renda em economias locais e regionais. Estas atividades, em geral, necessitam de investimento

relativamente baixo e são realizadas com tecnologias de baixo nível de modernização (CHISTÉ; COHEN, 2006; ABREU; MATTIETTO, 2014).

2 PRODUÇÃO DO TUCUPI

O tucupi pode ser descrito como um molho ácido condimentado, proveniente da fermentação da maniveira. É um líquido amarelo, rico em ácido cianídrico, que necessita, após a etapa de fermentação, ser submetido à cocção, para a eliminação das substâncias tóxicas. O produto é comercializado, geralmente, em garrafas PET, sendo muito apreciado na elaboração de pratos culinários típicos da região amazônica, como o tacacá, o pato no tucupi e o molho de pimenta (BALAGOPALAN, 2002; CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002).

Não existe padrão de identidade e qualidade para o tucupi, a nível nacional, mas no estado do Pará, a Agência de Defesa Agropecuária do Pará (Adepará) definiu um padrão para o produto (ADEPARÁ, 2008). Nesta legislação são contempladas ações de inspeção, fiscalização e controle dos aspectos higiênicos sanitários para a produção do tucupi. O regulamento define o tucupi como sendo o produto e/ou subproduto obtido da raiz de mandioca e suas variedades, por processo tecnológico adequado, com uso predominante na culinária paraense. Deve ser um produto heterogêneo, com duas fases distintas (sólida e líquida), a cor deve variar do amarelo claro ao amarelo intenso e deve apresentar sabor levemente ácido e aroma típico do produto. Ao produto, podem ser adicionados sal, açúcar, alho e especiarias utilizadas na culinária regional. O uso de corantes, realçadores de sabor, emulsificantes, espessantes e outras substâncias que diminuam a tensão interfacial entre as duas fases do produto é proibido.

O processo de produção do tucupi é artesanal e faz parte do quadro de tradições passadas de geração em geração, em famílias da região amazônica. O reaproveitamento da maniveira para fabricação do tucupi é uma forma simples e barata de agregar valor a esse subproduto, anteriormente não aproveitado. A utilização da maniveira para a produção do tucupi reduz o impacto ambiental proveniente das casas de farinha existentes na Amazônia; além de aumentar a renda dos produtores e melhorar a qualidade de vida dos mesmos.

As principais etapas da obtenção do tucupi são: a lavagem e o descascamento das raízes, a trituração das raízes, a prensagem da massa, a obtenção da maniveira, a fermentação da maniveira, a cocção da maniveira fermentada com a adição de condimentos, e a embalagem.

Lavagem e descascamento das raízes

As raízes, geralmente provenientes de roças de comunidades familiares, são transportadas até o local do beneficiamento, onde é realizado o descascamento, o mais rápido possível após a colheita, devido a alta perecibilidade das raízes, que podem entrar em processo deteriorativo em até 24 horas (BEZERRA, 2002; EMATER, 2004).

Chegando ao local do processamento, as raízes são lavadas com água corrente e conduzidas para o descascamento, que pode ser manual (Figura 1a), com auxílio de facas de aço inoxidável e seguido de lavagem com água corrente; ou mecânico, pelo uso de descascador cilíndrico ou em forma de parafuso. Neste caso, o descascamento e a lavagem ocorrem simultaneamente (Figura 1b) (EMATER, 2004).



Figura 1. Descascamento manual (a) e mecânico (b) das raízes de mandioca.

Fonte: (b) <http://www.vovodafloresta.com.br/produtos.html>

Trituração das raízes

O principal objetivo da trituração das raízes da mandioca (Figura 2) é provocar o rompimento das células, o que facilitará a liberação da manipueira na etapa de prensagem. A moagem pode ser feita em raladores manuais ou mecanizados, que normalmente possuem cilindro provido de um eixo central, com lâminas de aço serrilhada, fixadas paralelamente entre si e no sentido longitudinal do eixo (CEREDA, 2002). Os raladores mais comuns são os constituídos por um cilindro de madeira, os quais podem ser facilmente visualizados na feira do Ver-o-Peso, em Belém (PA). Após esta etapa é obtida a massa triturada, a qual deve ser imediatamente prensada.



Figura 2. Trituração das raízes de mandioca.

Prensagem da massa

Nesta etapa são utilizadas prensas manuais do tipo parafuso (Figura 3a) ou prensas hidráulicas; porém ainda existem produtores que utilizam o tipiti, um tipo de prensador artesanal confeccionado com palha trançada (Figura 3b,c). A massa da mandioca proveniente da etapa de trituração das raízes libera grande quantidade de resíduo líquido, denominado manipueira (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). Após a etapa de prensagem, a manipueira segue para a produção do tucupi.



Figura 3. Prensagem da massa de mandioca com liberação da manipueira. (a) Prensa manual de parafuso; (b, c) Tipiti.

Fonte: (a) Chisté e Cohen (2006)

Devido a ausência de padronização para o processo de produção do tucupi, verifica-se que as técnicas utilizadas pelos produtores do produto, em feiras livres de cidades amazônicas, são as mais rudimentares possíveis, com emprego de pouca mecanização (ABREU; MATTIETTO, 2014).

Manipueira

A manipueira (Figura 4) consiste em um líquido de cor amarela, extraído da mandioca brava, após trituração e prensagem, durante a fabricação da farinha. Este líquido geralmente é descartado no meio ambiente e, por apresentar uma elevada carga de materiais orgânicos dispersos em solução, provoca a redução da concentração de oxigênio na água, causando danos às formas aeróbias de vida (CAMPOS et al., 2006; AVANCINI, 2007).



Figura 4. Manipueira.

A composição química da manipueira é variável e depende de fatores como: a variedade da mandioca e as condições edafo-climáticas do local de cultivo (FIORETTO, 2001). A manipueira pode ser utilizada como adubo, pois apresenta na composição: potássio, nitrogênio, magnésio, fósforo, cálcio e enxofre, além de ferro e micronutrientes. Por outro lado, as ações nematicidas e inseticidas, inerentes a manipueira são atribuídos a presença dos cianetos (PANTAROTO; CEREDA, 2001). No estado do Pará, a manipueira tem um destino mais nobre, a produção do tucupi.

Fermentação

A fermentação proporciona uma segurança alimentar ao alimento, pois promove a redução de compostos tóxicos, como os compostos cianogênicos; produz agentes antimicrobianos, como o ácido láctico; bacteriocinas; peróxido de hidrogênio e etanol, o que facilita a inibição ou eliminação de micro-organismos patogênicos (GIRAFFA, 2004). Para que o tucupi seja obtido, a manipueira é submetida a um processo de fermentação, onde ocorre a ação mais prolongada da linamarase, enzima que hidrolisa a linamarina (responsável pela liberação de HCN), que aos poucos é inibida pela acidificação do meio em função da redução do pH (CHISTÉ; COHEN, 2011).

O tempo de fermentação é variável (24 - 48 horas), entretanto estudos apontam que o tempo de fermentação da manipueira afeta as características físico-químicas do tucupi. Uma fermentação com duração de 24 horas resulta em um produto final com pH inferior a 4,0 e aliado à uma cocção, por 10 minutos, é suficiente para obter um produto com sabor característico (ácido) e com níveis de cianeto total e livre seguros para o consumo humano (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; CHISTÉ; COHEN, 2011, CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016).

Durante a fermentação da manipueira, ocorre o aparecimento de uma suspensão de cor amarela, que se forma na superfície do líquido. Isto ocorre devido a mandioca possuir carotenoides que se ligam às proteínas, formando um complexo, o qual dá origem ao precipitado amarelo (Figura 5), que contém 16% de proteína e 84% de carotenoides. Isto geralmente ocorre em pH de aproximadamente 4,0 e é atribuído ao equilíbrio de cargas nas proteínas (ponto isoeletrico) (MARINHO; ARCKOLL, 1981).



Figura 5. Manipueira fermentada (24 horas) com o precipitado.

Devido à escassez de estudos sobre a flora microbiana atuante na fermentação da manipueira, muitas questões sobre este processo ainda precisam ser exploradas. Porém, supõe-se que seja conduzido por bactérias lácticas e leveduras, pois estas são capazes de tolerar os baixos valores de pH atingidos no mosto, durante a fermentação da manipueira, o qual chega a atingir valores de 3,5 ao final do processo. Alguns estudos reportam a presença destes microorganismos durante o processo de fermentação da mandioca (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; OGUNTOYINBO; DODD, 2010; OGUNTOYINBO, 2011).

Cocção, adição de condimentos e embalagem

A cocção é uma etapa fundamental na obtenção do tucupi, por ser responsável pela eliminação do ácido cianídrico (HCN), comumente presente no produto após a fermentação. Durante esta etapa o ácido é volatilizado, de modo que um processo incipiente pode representar um perigo químico ao consumidor (CHISTÉ; COHEN, 2011; CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016).

Campos, Carvalho e Mattietto (2016) realizaram um estudo sobre o efeito da fermentação e da cocção sobre o teor de cianeto, durante a produção do tucupi, e observaram que a fermentação da manipueira por 24 h e a cocção do fermentado por 10 min são suficientes para gerar um produto com teor de cianeto total inferior a 10 mg HCN/L, o que garante um alimento seguro ao consumidor.

Durante a cocção costuma-se acrescentar condimentos que conferem sabor ao tucupi. Usualmente acrescenta-se alho, pimenta (denominada *de cheiro*, uma variedade pouco ardente de *Capsicum chinense*) e duas ervas: a chicória (*Eryngium foetidum*) e a alfavaca (*Ocimum basilicum*), um tipo de manjeriço regional (ROBERT; VAN VELTHEM, 2009). Após a cocção, o tucupi está pronto para ser embalado e utilizado na culinária regional. O produto é geralmente comercializado em garrafas do tipo PET, em feiras livres (Figura 6).



Figura 6. Embalagem do tucupi.

3 CAROTENOIDES NA MANDIOCA

Os carotenoides são uma classe de pigmentos naturais amplamente distribuídos em frutas e vegetais, e são responsáveis pela cor amarelo-avermelhada de muitos alimentos. Por serem compostos que possuem propriedades colorantes, podem ser adicionados aos alimentos, contribuindo para o aspecto visual dos mesmos. A estes compostos são também relacionadas funções importantes e ações fisiológicas, sendo a atividade provitamina A, a mais conhecida (LA FRANO et al., 2014; ARAGÓN et al., 2018).

Apesar da mandioca ser considerada primariamente uma fonte energética, as variedades que apresentam cor contêm carotenoides, que atuam benéficamente no organismo humano, contribuindo para a redução do risco de doenças degenerativas, cardíacas, catarata, degeneração macular, entre outras, além de apresentar compostos que possuem atividade pró-vitáminica (WOODSIDE et al., 2015; NWACHUKWU; UDENIGWE; ALUKO, 2016; ROOHBAKHSH; KARIMI; IRANSHAHI, 2017).

Os carotenoides mais investigados em termos de saúde humana são o β -caroteno, o α -caroteno, a β -criptoxantina, o licopeno, a luteína e a zeaxantina. O β -caroteno é a mais abundante provitamina A em alimentos (RAO; RAO, 2007; MAIANI et al., 2009). Os principais carotenoides encontrados nas raízes da mandioca são o *all-trans*- β -caroteno e seus isômeros *13-cis* e *9-cis* (KIMURA et al., 2007; FAILLA et al., 2012). Para Rodriguez-Amaya et al. (2008) a principal causa de perdas ou destruição de carotenoides durante o processamento ou a estocagem de alimentos é a oxidação, por via enzimática ou não.

Chávez et al. (2005) observaram teores de carotenoides entre 0,10 e 1,04 mg/100 g de tecido fresco, em raízes de mandioca de mais de dois mil genótipos avaliados. Outras pesquisas reportam um aumento no teor de carotenoides nas raízes de mandioca ao longo dos anos (SÁNCHEZ et al., 2010; CEBALLOS et al., 2012). A composição de carotenoides nos vegetais é afetada por fatores como: cultivar ou variedade, parte da planta consumida, estágio de maturação, clima ou local geográfico de produção, colheita e manuseio pós-colheita; além de condições de processamento e armazenamento (BOVELL-BENJAMIN, 2007).

4 COMPOSTOS CIANOGENICOS

A mandioca está entre duas mil espécies de plantas que apresentam glicosídeos cianogênicos (MOLLER, 2010). A presença desses compostos limita o consumo da mandioca (CARDOSO et al., 2005; SÁNCHEZ et al., 2009). Em função do teor de ácido cianídrico (HCN), a mandioca pode ser classificada quanto à toxicidade, em: mandioca mansa, quando apresentam menos de 50 mg HCN/kg de raiz fresca sem casca; mandioca moderadamente venenosa, quando apresentam de 50 a 100 mg HCN/kg de raiz fresca sem casca; e mandioca venenosa ou brava, quando o teor é superior a 100 mg HCN/kg de raiz fresca sem casca (VALLE et al., 2004; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007).

A linamarina e a lotaustralina são os principais glicosídeos cianogênicos presentes nas raízes de mandioca, na proporção de 93:7. Estes glicosídeos são susceptíveis à hidrólise, por ação de enzimas, em função do pH e da temperatura, a qual libera acetona, glicose e ácido cianídrico (HCN). Com a ruptura da estrutura celular das raízes, a linamarina é hidrolisada por uma β -glicosidase (a linamarase), que atua como um catalisador, para produzir glicose e acetona cianidrina, em uma primeira reação. Em uma segunda reação, a acetona cianidrina decompõe-se pela ação da hidroxinitrilase, em pH superior a 4, produzindo o ácido cianídrico e a acetona. O ácido cianídrico formado, pode ser volatilizado para o ambiente, em temperatura e pH específicos. Esse processo é chamado de cianogênese (Figura 7) (CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002; BRADBURY; CLIFF; DENTON, 2011).

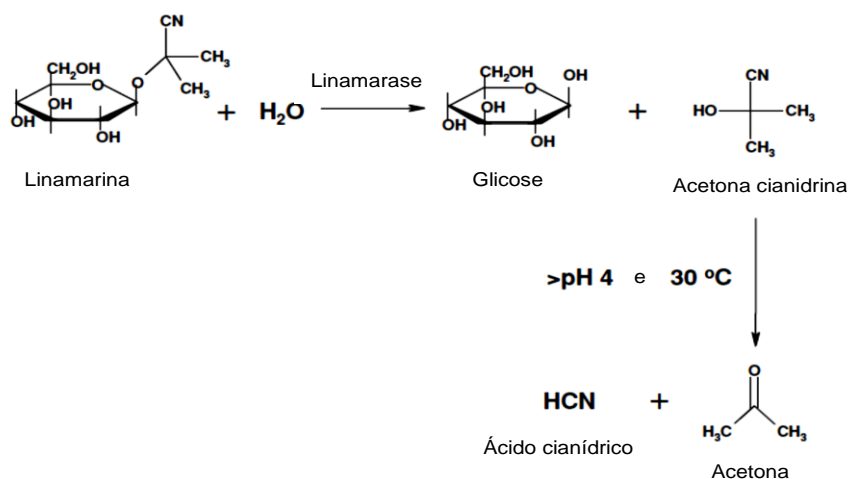


Figura 7. Cianogênese – Processo de liberação do cianeto da mandioca.

Fonte: MONTAGNAC; DAVIS; TANUMIHARDJO (2009).

As principais técnicas de processamento industrial utilizadas na diminuição do princípio tóxico da mandioca se baseiam na dissolução em água ou na volatilização e envolvem processos como a maceração, a cocção, a secagem, a torração e a fermentação das raízes; ou a combinação destes processos. Aparentemente, a maioria destes métodos são eficazes na redução do teor de HCN, porém é comum encontrar teores residuais deste composto, capazes de produzir sintomas de intoxicação (BRADBURY, 2006; NAMBISAN, 2011; BRADBURY; DENTON, 2014; MODESTO JUNIOR; CHISTÉ; PENA, 2019).

O processo de fabricação do tucupi varia de produtor para produtor, bem como em função da variedade de mandioca utilizada no processo de extração da manipueira. Mandiocas com alto teor de HCN podem resultar em um tucupi com elevado concentração deste composto, caso a detoxificação não seja eficaz nas etapas de obtenção do produto (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; CHISTÉ; COHEN, 2011).

Para que a detoxificação do tucupi seja eficaz é necessário que a manipueira, após o processo de fermentação, seja submetida à cocção, pois nesta etapa a enzima linamarase será inativada, limitando o processo de hidrólise da linamarina, o qual é responsável pela liberação do princípio tóxico na mandioca. Contudo, é importante ressaltar que durante a fermentação da manipueira ocorre a perda da atividade da linamarase, devido a acidificação do meio, com a redução do pH (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007).

O comportamento mencionado foi relatado por Campos, Carvallho e Mattietto (2016), os quais observaram que os teores de cianeto total e livre reduziram com o aumento do tempo de fermentação da manipueira. Porém, os autores constataram que a etapa de cocção é crucial para que os teores de cianeto atinjam níveis seguros para o consumidor.

Os principais problemas de saúde associados à dietas ricas em compostos cianogênicos incluem: o hipertireoidismo, resultante do metabolismo do tiocianato no metabolismo do iodo; a neuropatia atáxica tropical, uma desordem neurológica; e o kongo, uma paralisia instantânea e permanente (OKAFOR; OKOROWKWO; MADUAGWU, 2002; ADAMOLEKUN, 2010; BANEJA et al., 2013).

O controle do HCN é importante para evitar efeitos adversos à saúde, pois o consumo de produtos que não foram processados adequadamente, e apresentam elevados teores de cianeto, podem levar a intoxicações e até ao envenenamento, ocasionando sintomas como: dor de cabeça, náusea, tontura, diarreia, vômito e até a morte, em alguns casos (NHASSICO et al., 2008).

5 AMINAS BIOATIVAS

5.1 ASPECTOS GERAIS

Aminas bioativas podem ser definidas como compostos orgânicos nitrogenados, nos quais um, dois ou três átomos de hidrogênio da amônia são substituídos por grupos alquila ou arila. A estrutura química das aminas bioativas pode ser alifática, alicíclica ou heterocíclica, com baixo peso molecular. A síntese dessas aminas é realizada pela descarboxilação dos aminoácidos ou por aminação e transaminação de aldeídos e cetonas (GLÓRIA, 2005).

Os aminoácidos, em geral, definem a denominação das aminas bioativas, ou seja, os aminoácidos como a histidina, a tirosina e o triptofano dão origem às aminas histamina, tiramina, triptamina, respectivamente. Porém, nomes de aminas, como a cadaverina e a putrescina, estão associados aos processos de decomposição ou putrefação, enquanto a espermina e a espermidina recebem estas denominações por terem sido isoladas pela primeira vez no fluido seminal (GLÓRIA, 2005; GLÓRIA; VIEIRA, 2007).

As aminas bioativas podem ser classificadas de acordo com o número de grupamentos amino, com a estrutura química e com as funções fisiológicas e biossintéticas, como:

- Quanto ao *número de grupamentos amino* na molécula, as aminas classificam-se em monoaminas (tiramina e feniletilamina), diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e cadaverina) e poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (GLÓRIA, 2005).

- Quanto a *estrutura química*, as aminas podem ser alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina, triptamina e serotonina) (SILLA-SANTOS, 1996).

- Quanto a *função do grupo químico*, as aminas podem ser catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e imidazolaminas (histamina) (BARDÓCZ, 1995).

- Quanto as *funções fisiológicas* que exercem, as aminas são classificadas em poliaminas e aminas biogênicas. As poliaminas estão envolvidas em diversas funções metabólicas e fisiológicas em animais, vegetais e micro-organismos. São representantes desta categoria, a espermidina (EPD), a espermina (EPM) e a agmatina (AGM) (HOET; NEMERY, 2000; MOINARD; CYNOBER; BANDT, 2005; HUSSAIN et al., 2017). As aminas biogênicas, por sua vez, são vasoativas e neuroativas, devido aos efeitos nos sistemas vascular e neural. São

representantes desta categoria, a tiramina (TIM), a histamina (HIM) e a serotonina (SRT) (BARDÓCZ, 1995).

- Quanto a *via biossintética* são denominadas de aminas naturais e aminas biogênicas. As aminas naturais são formadas durante a biossíntese *in situ*, ou seja, a partir de uma molécula simples, na proporção em que são requeridas (espermina e espermidina), ou podem estar armazenadas em células de defesa como os mastócitos e os basófilos (histamina). As aminas biogênicas (histamina, serotonina, tiramina, feniletilamina, triptamina, putrescina, cadaverina e agmatina) são formadas por micro-organismos que possuem enzimas com capacidade de descarboxilar aminoácidos (BOVER-CID et al., 2006).

5.2 BIOSSÍNTESE

5.2.1 Aminas biogênicas

As aminas biogênicas (AB) possuem essa denominação devido a origem biológica, uma vez que elas ocorrem naturalmente em micro-organismos, plantas e animais, onde atuam nos processos metabólicos com diferentes funções fisiológicas (LADERO et al., 2010). Elas são formadas por aminação de aldeídos e transaminação de aldeídos ou cetonas, hidrólise de compostos nitrogenados, decomposição térmica e principalmente pela descarboxilação de aminoácidos, como resultado do metabolismo normal em animais, vegetais e micro-organismos (GLÓRIA, 2005). As reações gerais para a descarboxilação de aminoácidos e aminação de aldeídos, para a síntese de aminas, é apresentada na Figura 8.

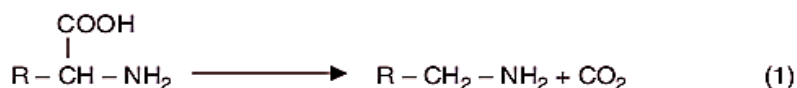


Figura 8. Formação de aminas pela descarboxilação de aminoácidos (1) e pela aminação de aldeídos (2).

Fonte: Glória (2005)

As sínteses das aminas biogênicas histamina, tiramina, triptamina, feniletilamina e cadaverina ocorrem pela descarboxilação dos aminoácidos precursores: histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente (GLÓRIA, 2005). Na síntese da serotonina, o triptofano é convertido pela triptofano-hidrolase em 5-hidroxitriptofano, o qual é

descarboxilado pela enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC), em serotonina (5-hidroxitriptamina). A tirosina é precursora de aminas fenólicas como a octopamina e a dopamina (GLÓRIA; VIEIRA, 2007).

Os pré-requisitos para formação de aminas nos alimentos são: a disponibilidade de aminoácidos livres, que pode ocorrer naturalmente em alimentos ou serem liberados de proteínas, devido a atividade proteolítica ou por degradação térmica; as elevadas temperaturas de processamento; ou a presença de micro-organismos descarboxilases-positivos, que podem constituir parte da população microbiana normal ou serem provenientes da contaminação, antes, durante ou após o processamento (HALÁSZ, 1994; GLÓRIA, 2005; GLÓRIA; VIEIRA, 2007).

As aminas biogênicas podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade de alimentos, pois podem refletir a má qualidade das matérias primas utilizadas, bem como as condições higiênico-sanitárias durante o processamento (KALÁČ; ŠVECOVÁ; PELIKÁNOVÁ, 2002; GLÓRIA, 2005).

A produção de aminas biogênicas está ligada à estratégia de sobrevivência do micro-organismo em ambientes ácidos, ou como um suplemento alternativo de energia metabólica, quando as células estão expostas a condições desfavoráveis de substrato (COTTER; HILL, 2003). Fatores como a temperatura, o pH do meio, a concentração de oxigênio, a presença de vitaminas e de coenzimas, a concentração de aminoácidos livres e de carboidratos fermentescíveis podem afetar a produção de aminas pelos micro-organismos (GLÓRIA, 2005).

5.2.2 Poliaminas

A categoria de poliaminas biologicamente ativas ou fisiológicas é constituída por putrescina, sendo a putrescina um precursor obrigatório da espermidina e espermina. As poliaminas eram tradicionalmente classificadas como aminas biogênicas, no entanto, desde os anos 90, elas se tornaram um grupo peculiar, por apresentarem uma formação diferente e desenvolver papéis específicos em células eucarióticas (KALÁČ, 2014).

São diversas as vias biossintéticas de produção de poliaminas, sendo os aminoácidos ornitina e arginina os precursores. A putrescina tem sido relatada por alguns autores como sendo uma poliamina, porém não atua no crescimento e nem possui atividade antioxidante. Na realidade, a putrescina, estruturalmente é uma diamina e pode ser classificada em ambos os grupos, pois é formada pela descarboxilação do aminoácido ornitina, mas também é

intermediário obrigatório na biossíntese da espermidina e da espermina (KALAČ; KRAUSOVÁ, 2005; KALAČ, 2014).

Em animais e fungos, a principal via de síntese da putrescina (PUT) é pela enzima ornitina descarboxilase (ODC), que promove a descarboxilação da ornitina e, conseqüentemente, a formação da putrescina. Já em plantas e micro-organismos, a arginina descarboxilase (ADC) é a principal enzima responsável por promover a descarboxilação da arginina e a conseqüente formação da agmatina, a qual é convertida em N-carbamoilputrescina e, posteriormente, em PUT, pela enzima agmatina urea-hidrolase (agmatinase) (BARDÓCZ, 1995; HILLARY; PEGG, 2003).

Para que ocorra a conversão da putrescina em espermidina, e desta em espermina, uma série de reações envolvendo transferases, descarboxilases e sintetases ocorrem paralelamente. A metionina é convertida em S-adenosilmetionina (SAM), a qual, por ação da S-adenosilmetionina descarboxilase (SAMDC) forma a S-adenosilmetionina descarboxilada. A SAM atua como doadora de aminopropila para a formação de espermidina, catalisada pela espermidina sintase. De modo semelhante ocorre a formação da espermina, pela ação da espermina sintase, a partir da espermidina e do SAM, como doador de grupo aminopropila (GLÓRIA, 2005). Na Figura 9, de forma resumida, estão as vias biosintéticas para aminas bioativas.

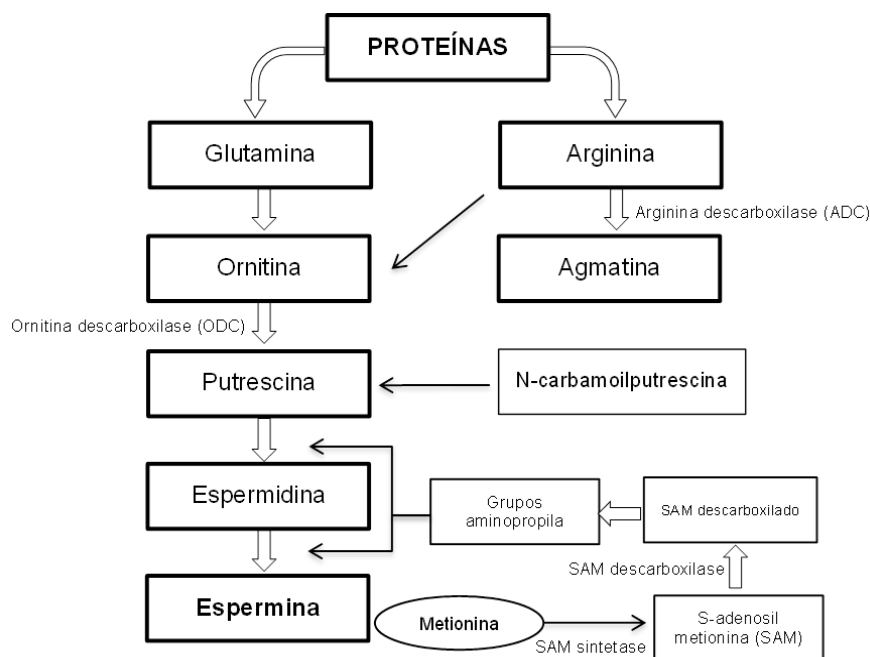


Figura 9. Biossíntese de aminas bioativas em vegetais.

Fonte: Chitarra e Chitarra (2005).

5.3 IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA

As aminas biogênicas geralmente são psicoativas, neuroativas ou vasoativas (vasodilatadoras e vasoconstritoras). Aminas psicoativas, como a histamina e a serotonina, afetam o sistema nervoso central. A histamina possui uma função biológica importante, pois atua como um mediador primário dos sintomas imediatos percebidos em respostas alérgicas (SILLA-SANTOS, 1996). As aminas vasoativas agem diretamente ou indiretamente no sistema vascular, sendo que as aminas vasoconstritoras, como a tiramina, a triptamina e a feniletilamina causam um aumento na pressão sanguínea devido à constrição do sistema cardiovascular, o que provoca o aumento do ritmo cardíaco (GLÓRIA, 2005). Além do papel biológico, como fonte de nitrogênio e por serem precursoras na síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucleicos e proteínas, as aminas bioativas são importantes componentes do aroma de alimentos (SILLA-SANTOS, 1996; ÖNAL; EKKELI; ÖNAL, 2013).

A putrescina, a cadaverina, a espermidina e a espermina, não exercem efeitos tóxicos diretos, mas podem competir com enzimas desintoxicantes (HALÁSZ et al., 1994) e ainda reagir com o nitrito presente em alimentos, produzindo nitrosaminas voláteis. Como esses compostos são potencialmente cancerígenos é importante prevenir o acúmulo destas aminas em alimentos (DE MEY et al., 2014).

As poliaminas são essenciais ao crescimento e ao metabolismo celular, sendo rapidamente requeridas em tecidos de crescimento. Estas aminas interagem eletrostaticamente com várias macromoléculas, especialmente o DNA, o RNA e as proteínas, e estão envolvidas no estímulo e regulação das sínteses destas moléculas, e na proliferação e crescimento celular. A interação das poliaminas com componentes da membrana celular carregados negativamente, como os fosfolípidios, são importantes na permeabilidade e estabilidade da membrana. Pesquisas apontam as poliaminas como promotoras de crescimento, caso as concentrações estejam em níveis considerados não tóxicos (JEEVANANDAM et al., 1997; LÖSER, 2000, KALACĚ, 2014).

Segundo SILLA-SANTOS (1996), as poliaminas espermina e espermidina inibem a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados. Este efeito antioxidante está relacionado ao grupamento NH_3^+ presente na estrutura química das poliaminas. A propriedade antioxidante de algumas poliaminas também tem sido comprovada (BELLÉ et al., 2004; KALACĚ, 2014).

5.4 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

As aminas são metabolizadas no organismo por enzimas aminoxidases, como as monoaminoxidases (MAO), as diaminoxidases (DAO) e as poliaminoxidases (PAO) e, geralmente não representam qualquer perigo para a saúde. Entretanto, quando ingeridas em elevadas concentrações ou quando o sistema de catabolismo das aminas é inibido, elas podem causar efeitos tóxicos, como: dores de cabeça, disfunções respiratórias, palpitação, hiper ou hipotensão e uma série de desordens alérgicas (HALÁSZ et al., 1994; LOUNVAUD-FUNEL, 2001; GLÓRIA, 2005). Intoxicações podem ocorrer quando há inibição das aminoxidases, quando ocorrem efeitos sinérgicos ou potencializadores ou se houver deficiência genética (HALÁSZ et al., 1994).

A putrescina e a cadaverina podem potencializar a toxicidade da histamina, por inibir as enzimas monoamina oxidase (MAO) e histaminametil-transferase (HMT), aumentando assim o transporte da histamina através da parede gastrointestinal (EFSA, 2011). Em geral, as poliaminas não são tóxicas, entretanto elas podem acelerar o crescimento de tumores, caso estejam em elevadas concentrações no alimento (LADERO et al., 2010).

Apesar de possuir um papel importante no metabolismo humano, o consumo de alimentos com alta concentração de histamina está associado a diversos efeitos toxicológicos, o que a torna a principal amina envolvida em intoxicações alimentares. O efeito tóxico da histamina também pode ser potencializado pela presença de etanol (RADLER; FATH, 1991). A segunda amina vinculada a efeitos tóxicos é a tiramina, que em concentrações elevadas pode causar dor de cabeça, enxaqueca, hemorragia intracraniana, febre, vômito, transpiração e aumento da pressão sanguínea (GLÓRIA, 2005). De acordo com Costa e Glória (2003) os sintomas são evidentes, 1 a 12 horas após a ingestão de alimentos com a tiramina.

A triptamina possui ação farmacológica similar à tiramina. Em altas concentrações pode exercer efeitos diretos na musculatura lisa; devido ao efeito de vasoconstrição, pode causar dor de cabeça, enxaqueca e aumentar a pressão sanguínea (GLÓRIA, 2005). Os sinais clínicos aparecem entre 30 minutos e algumas horas após o consumo da amina, e desaparecem em até 24 horas, após a ingestão (EFSA, 2011).

O elevado teor de serotonina nos alimentos pode causar o aparecimento de transtornos intestinais, fibrose do miocárdio e enxaqueca (GLÓRIA, 2005). A espermina, de forma isolada, apresenta toxicidade renal, promove desequilíbrios no processo de coagulação, degeneração do

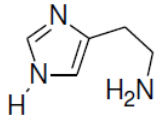
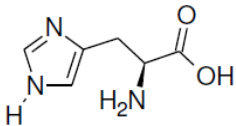
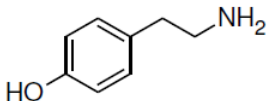
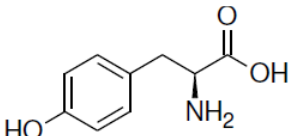
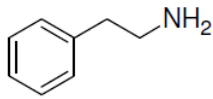
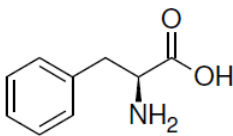
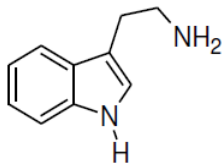
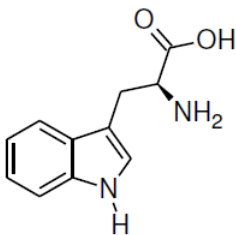
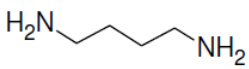
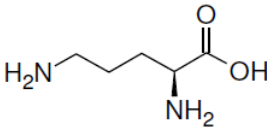
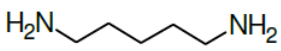
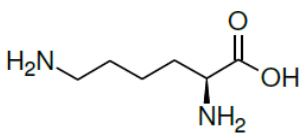
miocárdio, além de alterações na pulsação e na respiração, se ingerida em doses superiores a 180 mg/kg (FUZIKAWA et al., 1999).

A feniletilamina, assim como a tiramina, causam um aumento na pressão sanguínea, pela liberação de noradrenalina no tecido, podendo causar enxaqueca (GLÓRIA, 2005). De acordo com Costa e Glória (2003), dores de cabeça induzidas por alimentos, são mediadas por componentes químicos comuns aos alimentos, incluindo a tiramina, a triptamina e a feniletilamina. As dores de cabeça podem ocorrer após 12 h da ingestão de 3 mg de feniletilamina por indivíduos suscetíveis. Na Tabela 1, é apresentado um resumo dos efeitos adversos das aminas ao homem.

É importante entender os efeitos das aminas biogênicas e saber os níveis delas que podem existir na quantidade ingerida do alimento, de forma segura para a saúde do consumidor. A *European Food Safety Authority* (EFSA) definiu a concentração de aminas tolerável nos alimentos, sem causar efeitos adversos. Essa definição foi baseada na avaliação da exposição e do consumo de alimentos, porém foi observado que o consumo pode variar entre indivíduos, regiões e países (EFSA, 2011).

De acordo com a EFSA (2011), os níveis de histamina necessários para causar efeitos adversos à saúde são de 50 mg de histamina para indivíduos saudáveis, limite esse que pode ser reduzido em casos de intolerância à histamina. Para tiramina os limites são de 600 mg para indivíduos saudáveis que não tomam medicamentos inibidores da monoamino oxidase (MAOI), 50 mg para indivíduos que tomam medicamentos da terceira geração MAOI e 6 mg para indivíduos que tomam medicamentos MAOI clássicos.

Tabela 1. Efeitos farmacológicos de algumas aminas.

Aminas Biogênicas	Aminoácidos precursores	Efeitos
 Histamina	 Histidina	Vasodilatação, liberação de adrenalina e noradrenalina, excitação da musculatura lisa do útero, intestino e do trato respiratório, estimulação dos neurônios sensoriais e motores, controle da secreção ácido-gástrica, mediação primária da resposta alérgica imediata.
 Tiramina	 Tirosina	
 Feniletilamina	 Fenilalanina	Liberação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial, vasoconstrição e derrames.
 Triptamina	 Triptofano	
 Putrescina	 Ornitina	Diminuição da pressão arterial e da frequência cardíaca, paralisia nas extremidades, potencialização da toxidez das outras aminas.
 Cadaverina	 Lisina	

Fonte: Cardozo et al. (2013).

5.5 AMINAS BIOATIVAS EM ALIMENTOS

Aminas bioativas estão presentes em frutas, hortaliças, carne, produtos cárneos, leite, produtos lácteos, peixes e bebidas fermentadas. Na maioria dos alimentos que contêm proteínas ou aminoácidos livres pode ser esperada a formação de aminas biogênicas. A quantidade e o tipo de amina formada dependem da natureza e origem do alimento, bem como dos micro-organismos presentes no produto (LANGE; WITTMANN, 2002; INNOCENTE et al., 2007).

As aminas biogênicas podem estar presentes em uma gama de alimentos, tais como: chocolate, queijo curado, vinho tinto, cerveja, peixes e produtos à base de peixe (VIDAL-CAROU et al., 2009; KALAČ; DADÁKOVÁ; PELIKÁNOVÁ, 2009). As possíveis mudanças que ocorrem nas aminas são provenientes do processo de produção, processamento, fermentação, e condições de higiene e armazenamento (GLÓRIA, 2005).

Segundo EFSA (2011), os alimentos fermentados são os que apresentam maior relação com intoxicações alimentares, devido à intensa atividade microbiana e consequente potencial de formação de aminas biogênicas. As aminas podem estar naturalmente nos alimentos, ou serem formadas por micro-organismos de origem ou adicionados (culturas iniciadoras), ou ainda serem provenientes de contaminação, devido condições higiênico-sanitárias inadequadas. Assim sendo, as aminas podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade, refletindo a qualidade das matérias-primas, bem como as condições higiênico-sanitárias nas etapas de fabricação de um produto (HALÁSZ et al., 1994; KALAČ; ŠVECOVÁ; PELIKÁNOVÁ, 2002; GLÓRIA, 2005). Uma vantagem do uso de aminas como critério de qualidade de alimentos reside no fato de serem termo-resistentes, o que possibilita a permanência no produto, mesmo após tratamento térmico (LEHANE; OLLEY, 2000; ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014).

Todos os alimentos que se originam de plantas ou animais contêm espermina, espermidina e putrescina. Além destas, outras aminas também podem ocorrer naturalmente. Durante a fermentação ou deterioração, o teor de espermina pode diminuir, pois esta amina pode ser usada como fonte de nitrogênio para alguns micro-organismos (GLÓRIA, 2005). Eliassen et al. (2002), Kalač e Krausová (2005), Ali et al. (2011) e Kalač (2014) publicaram artigos de revisão sobre a ocorrência de poliaminas em alimentos. Kalač (2014) tabulou os teores das poliaminas espermina e espermidina, e da diamina putrescina, em produtos alimentícios, separados por categorias, como: cereais, legumes, batatas, vegetais frescos, frutas

frescas, bebidas e produtos de origem animal. A ocorrência de espermidina em tecidos vegetais tem sido descrita na literatura (ALI et al., 2011; KALACĚ, 2014).

Na Tabela 2, é apresentada uma síntese de alguns alimentos sujeitos a contaminação por aminas biogênicas, com as respectivas bactérias que estão relacionadas com a produção dessas aminas; de acordo com Shalaby (1996).

Tabela 2. Principais alimentos sujeitos a presença de aminas biogênicas e os micro-organismos produtores.

Alimento	Bactérias isoladas	Aminas encontradas
Peixes	<i>Morganella morganii</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Hafnia alvei</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Clostridium perfringenes</i> , <i>Enterobactera erogenes</i> , <i>Vibro alginolytiens</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	Tiramina, histamina, putrescina, cadaverina, espermidina, espermina, agmatina
Queijos	<i>Lactobacillus buchneri</i> , <i>Lactobacillus 30a</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>S. mitis</i> , <i>Bacillus macerans</i> , <i>propionibacterium</i> <i>Pediococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> ,	Tiramina, feniletilamina, histamina, triptamina, putrescina, cadaverina
Carnes e derivados	<i>Lactobacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Micrococcus</i>	
Vegetais fermentados	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococci sp.</i> , <i>Leuconostocmes enteroides</i>	Tiramina, histamina, triptamina, putrescina, cadaverina
Produtos fermentados de Soja	<i>Rhizopus oligosporus</i> , <i>Trichosporon beiglli</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	

Fonte: Cardozo et al. (2013)

6 MICROBIOTA DA FERMENTAÇÃO DA MANDIOCA

Diversos micro-organismos estão associados aos produtos da fermentação da mandioca. Alterações nas características bioquímicas ocorrem durante este processo, tais como a diminuição da toxidez, redução do pH do meio e conseqüentemente um aumento da acidez. O aumento da acidez é atribuído à produção de ácidos orgânicos, entre os quais o ácido láctico é o mais comumente encontrado (FESSARD; REMIZE, 2017).

Diversos estudos investigaram os micro-organismos envolvidos na produção de alimentos fermentados a base de mandioca e observaram a predominância de bactérias lácticas, bem como de leveduras. De acordo com esses estudos, as principais bactérias envolvidas na fermentação da mandioca são: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium* e *Bacillus* sp., com predominância das espécies: *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. manihotvorans*) (OYEWOLE, 2001; MIAMBI; GUYOT; AMPE, 2003; LACERDA et al., 2005; OGUNTOYINBO; DODD, 2010).

Na África, a mandioca é fermentada para produzir *gari*, *lafun*, *fufu* (ABASS et al., 2019). Por sua vez, *Cauim*, *puba*, *yakupa*, *chicha* são alguns exemplos de alimentos indígenas produzidos pela fermentação da mandioca (ALMEIDA; RACHID; SCHWAN, 2007; CRISPIM et al., 2013; FREIRE et al., 2014; COLEHOUR et al., 2014). Ameríndios brasileiros também produzem uma bebida alcoólica fermentada chamada *caxiri* (SANTOS et al., 2012). Como já mencionado, as bactérias lácticas são os micro-organismos predominantes nos diferentes tipos de alimentos e bebidas, obtidos pela fermentação da mandioca, tanto na África quanto na América do Sul (COULIN et al., 2006; ALMEIDA; RACHID; SCHWAN, 2007; OGUNTOYINBO, 2011; FREIRE et al., 2014).

Ramos et al. (2015) identificaram e caracterizaram a microbiota presente durante a fermentação do *tarubá*, bebida fermentada a partir da massa da mandioca, e observaram uma associação de bactérias e leveduras, sendo as espécies dominantes de bactérias lácticas foram *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Bacillus* e de leveduras a *Torulaspota delbrueckii*.

Freire et al. (2014) reportaram que na produção da bebida indígena *yakupa* há a predominância de bactérias lácticas, principalmente a *L. fermentum*, que pode ser a responsável pela produção de acidez e redução do pH. Djeni et al. (2015) realizaram caracterizações bioquímicas e microbianas no *attieké* e identificaram que as cepas de bactérias lácticas podem

ser potenciais culturas *starters* para a fermentação da mandioca. Kostinek et al. (2007) verificaram que o *Lactobacillus plantarum* possui a maior capacidade de produzir ácido em tubérculos de mandioca.

As bactérias lácticas intensificam a fermentação e são responsáveis pela acidificação do meio, o que contribui para a obtenção de características desejáveis ao produto. Essa acidificação atua também como limitante para o crescimento e sobrevivência de micro-organismos patógenos (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). De acordo com Oyewole (2001), as leveduras têm um papel importante na sobrevivência e na atividade das bactérias lácticas durante o processo de fermentação da mandioca, pois elas estão envolvidas na hidrólise do amido em açúcares simples, os quais são convertidos em ácidos orgânicos pelas bactérias lácticas.

Trabalhos relativos à microbiota envolvida na produção do tucupi são escassos na literatura científica. Segundo Campos, Carvalho e Mattietto (2016), a limitação de informações quanto aos tipos de micro-organismos envolvidos (família, gênero, espécie, subespécie), se deve ao fato de ser uma fermentação espontânea, onde a complexidade das reações é maior.

Como diversas pesquisas apontam as bactérias ácido lácticas, como os micro-organismos dominantes no processo de fermentação da mandioca, uma hipótese seria a de que a fermentação da manipueira seja realizada por bactérias lácticas e leveduras, que são capazes de suportar o baixo pH obtido pelo tucupi durante a fermentação; o qual pode variar de 6,0 a 3,0 no final do processo (CHISTÉ; COHEN, OLIVEIRA, 2007; OGUNTOYINBO; DODD, 2010). Elijah et al. (2014) verificaram que na manipueira há uma diversidade bacteriana, sendo os *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus plantarum* as espécies bacterianas dominantes. Por sua vez, Linares et al. (2011) afirmam que as bactérias ácido lácticas possuem genes produtores de aminas biogênicas e a detecção precoce de bactérias produtoras destes compostos nos alimentos é essencial para evitar os riscos iminentes da presença de aminas.

7 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE AMINAS BIOGÊNICAS

Altos níveis de aminas biogênicas têm sido encontrados em alimentos que são submetidos a processos fermentativos, como embutidos, queijos e bebidas alcoólicas. A produção de aminas biogênicas em alimentos é característica de uma série de micro-organismos capazes de descarboxilar aminoácidos, como *Enterobacterias*, *Pseudomonas spp*, *Micrococcus*, *Enterococcus* e bactérias lácticas (LORET et al., 2005).

As decarboxilases são enzimas que estão presentes em muitos micro-organismos. Estas foram encontradas em espécies dos gêneros *Bacillus* (RODRIGUEZ-JEREZ et al., 1994a), *Pseudomonas* (TIECCO et al., 1986), *Photobacterium* (JØRGENSEN et al., 2000); bem como nos gêneros da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella* e *Shigella* (MARINO et al., 2000) e da família *Micrococcaceae*, como *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* (RODRIGUEZ-JEREZ et al., 1994b; MARTUSCELLI et al., 2000).

Muitos gêneros bacterianos, incluindo os produtores de ácido láctico, são capazes de descarboxilar aminoácidos. Entre as bactérias ácido-lácticas (BAL), cepas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* podem ser aptas para a produção de aminas, em vários alimentos, como: vegetais, queijos, carne fermentada e bebidas (KALAČ, ŠVECOVÁ, PELIKÁNOVÁ, 2002; FLASAROVÁ et al., 2016; HENRÍQUEZ-AEDO et al., 2016; POVEDA et al., 2017; TODOROV et al., 2017).

Em produtos em que ocorre o crescimento de bactérias lácticas, pode haver a formação de putrescina, cadaverina, histamina e tiramina (BRINK et al., 1990). Alguns pesquisadores sugerem que os genes que codificam as enzimas da via de produção das aminas biogênicas podem ser transferidos a outros micro-organismos, por elementos genéticos móveis (MARCOBAL et al., 2006; COTON; COTON, 2009). A capacidade de descarboxilar tirosina e formar a tiramina é uma característica geral das cepas pertencentes às espécies de *Enterococcus faecalis* (MARCOBAL et al., 2004). Além disso, vários isolados de *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus curvatus*, ambos considerados bactérias ácido lácticas, foram identificados como produtores desta amina em produtos fermentados (ROIG-SAGUÉS; MOLINA; HERNÁNDEZ-HERRERO, 2002; KOMPRDA et al., 2008).

O conhecimento da possibilidade de formação de aminas bioativas durante a produção do tucupi é importante, pois apesar de serem necessárias em diferentes funções fisiológicas dos seres humanos e animais, as aminas podem apresentar diversos efeitos tóxicos, se ingeridas em concentrações elevadas.

Uma forma de impedir a formação de aminas é a inibição do crescimento microbiano e/ou a redução da atividade da enzima descarboxilase. Para tanto, são necessários o controle da temperatura, a utilização de matérias-primas de boa qualidade, a aplicação de boas práticas de manipulação, o uso de culturas não formadoras de aminas em produtos fermentados (DAPKEVICIUS et al., 2000) e o uso de conservantes (EMBORG; DALGAARD, 2008). Uma vez formadas, a redução de aminas biogênicas em alimentos, pela ação do calor, é bastante difícil uma vez que elas são termicamente estáveis, mesmo quando expostas a temperaturas de tratamento térmico, por tempo prolongado (CARDOZO et al., 2013). Isto faz com que o alvo da ação do tratamento térmico sejam os micro-organismos e não as aminas.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, L. F.; MATTIETTO, R. A. Procedimentos de fabricação dos derivados de mandioca: recomendações para obtenção de produtos seguros e de qualidade. IN: MODESTO JÚNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. **Cultura da mandioca: apostila**. Belém – PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014, p. 165 – 182.

ADAMOLEKUN, B. Etiology of Konzo, epidemic spastic paraparesis associated with cyanogenic glycosides in cassava: role of thiamine deficiency? **Journal of the Neurological Sciences**, v. 296, n. 1-2, p. 30-33, 2010.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ. Instrução Normativa n.º 001/2008 de 24 de junho de 2008. Padrão de identidade e qualidade do tucupi para comercialização no Estado do Pará. **Diário Oficial do Estado do Pará**, p. 7, 26 jun. 2008. Seção 3. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/6633377/pg-7-executivo-3-diario-oficial-do-estado-do-para-doepa-de-26-06-2008>>. Acesso em: 13 fev. 2019.

ALI, M. A.; POORTVLIET, E.; STROMBERG, R.; YNGVE, A. Polyamines: total daily intake in adolescents compared to the intake estimated from the Swedish Nutrition Recommendations Objectified (SNO). **Food and Nutrition Research**, v. 55, p. 5455-5463, 2011.

ALMEIDA, E. G.; RACHID, C. C. T. C ; SCHWAN, R. F. Microbial population present in fermented beverage ‘cauim’ produced by Brazilian Amerindians. **International Journal of Food Microbiology**, v. 120, p. 146–151, 2007.

ALVAREZ, M. A.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p. 146-155, 2014.

ARAGÓN, I. J.; CEBALLOS, H.; DUFOURC, D.; FERRUZZI, M. G. Pro-vitamin A carotenoids stability and bioaccessibility from elite selection of biofortified cassava roots (*Manihot esculenta* Crantz) processed to traditional flours and porridges. **Food Function**, v. 9, p. 4822–4835, 2018.

AVANCINI, S. R. P.; FACCIN, G. L.; VIEIRA, M. A.; ROVARIS, A. A.; PODESTÁ, R.; TRAMONTE, R.; SOUZA, N. M. A.; AMANTE, E. R. Cassava starch fermentation wastewater: characterization and preliminary toxicological studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2273–2278, 2007.

BALAGOPALAN, C. **Cassava utilization in food, feed and industry**. In: HILLOCKS, R.J.; THRESH, J.M.; BELOTTI, A.C. Cassava: Biology, Production and utilization. CABI International, 2002.

BANEA, J. P.; BRADBURY, J. H.; MANDOMBI, C.; NAHIMANA, D.; DENTON, I. C.; KUWA, N.; TSHALA KATUMBAY, D. Control of konzo by detoxification of cassava flour in three villages in the Democratic Republic of Congo. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 506–513, 2013.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BELLÉ, N. A.; DALMOLIN, G. D.; FONINI, G.; RUBIN, M. A.; ROCHA, J. B. Polyamines reduce lipid peroxidation induced by different pro-oxidant agents. **Brain Research**, v. 1008, p. 245–251, 2004.

BEZERRA, V. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; CARVALHO, V. D.; VILELA, E. R. **Raízes de mandioca minimamente processadas: efeito do branqueamento na qualidade e na conservação**. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 3, p. 564-575, 2002.

BOVELL-BENJAMIN, A. C. Sweet Potato: A review of its past, present, and future role in human nutrition. **Advances in Food Nutrition Research**, v. 52, p. 1-59, 2007.

BOVER-CID, S.; MIGUELEZ-ARIZADO, M. J.; MORATALLA, L. L. L.; VIDAL-CAROU, M. C. Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausage. **Meat Science**, Amsterdam, v. 72, p. 62-68, 2006.

BRADBURY, J. H. Simple wetting method to reduce cyanogen content of cassava. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 388–393, 2006.

BRADBURY, J. H.; CLIFF, J.; DENTON, I. C. Uptake of wetting method in Africa to reduce cyanide poisoning and konzo from cassava. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 539–542, 2011.

BRADBURY, J. H.; DENTON, I. C. Mild method for removal of cyanogens from cassava leaves with retention of vitamins and protein. **Food Chemistry**. v. 158, p. 417-420, 2014.

BRINK, B.; DAMINK, C.; JOOSTEN, H. M. L. J.; VELD, J. H. J. H. Occurrence and formation of biologically active amines in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 73-84, 1990.

BURNS, A. E.; GLEADOW, R. M.; ZACARIAS, A. M.; CUAMBE, C. E.; MILLER, R. E.; CAVAGNARO, T. R. Variations in the chemical composition of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves and roots as affected by genotypic and environmental variation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4946–495, 2012.

CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, ago/2002. v. 2 (Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas) 1 CD-ROM.

CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 23 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 107). Versão eletrônica.

CAMPOS, A. T.; DAGA J.; RODRIGUES, E. E.; FRANZENER G.; SUGUIY, M. M. T.; SYPPERCK, V. L. G. Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. **Engenharia Agrícola**. v. 26, p. 235-242, 2006.

CARDOSO, A. P.; MIRIONE, E.; ERNESTO, M.; MASSAZA, F.; CLIFF, J.; HAQUE, M. R.; BRADBURY, J. H. Processing of cassava roots to remove cyanogens. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 18, p.451–460, 2005.

CARDOZO, M.; LIMA, K. S. C.; FRANÇA, T. C. C.; LIMA, A. L. S. Aminas biogênicas: um problema de saúde pública. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 5, p. 149-168, 2013.

CEBALLOS, H.; LUNA, J.; ESCOBAR, A. F.; ORTIZ, D.; PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, T.; PACHÓN, H.; DUFOUR, D. Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**. v. 45, p. 52–59, 2012.

CENI, G. C.; COLET, R.; PERUZZOLO, M.; WITSCHINSKI, F.; TOMICKI, L.; BARRIQUELLO, A. L.; VALDUGA, E. Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 107-111, 2009.

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, v. 4, cap. 1, p. 13-37, 2002.

CHÁVEZ, A. L.; SÁNCHEZ, T.; JARAMILLO, G.; BEDOYA, J. M.; ECHEVERRY, J.; BOLANOS, E. A.; CEBALLOS, H.; IGLESIAS, C. A. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces and improved clones. **Euphytica**. v. 143, p. 125-133, 2005.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. **Estudo do processo de fabricação da farinha de mandioca**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 75 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 267). Versão eletrônica.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, p. 41-46, 2011.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 27, p. 437-440, 2007.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005.

COLEHOUR, A. M.; MEADOW, J. F.; LIEBERT, M. A.; CEPON-ROBINS, T. J.; GILDNER, T. E.; URLACHER, S. S.; BOHANNAN, B. J. M.; SNODGRASS, J. J.; SUGIYAMA, L. S. Local domestication of lactic acid bacteria via cassava beer fermentation. **PeerJ**, v. 2, p. 479, 2014.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Perspectivas para a agropecuária**, Brasília, v. 2, p. 1-155, 2014. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_09_10_18_03_00_perspectivas_2014-15.pdf. Acesso em 30 mai. 2015.

COSTA, M. R; GLÓRIA, M. B. A. Migraine and Diet. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 3940-3947, 2003.

COTON, E.; COTON, M. Evidence of horizontal transfer as origin of strain to strain variation of the tyramine production trait in *Lactobacillus brevis*. **Food Microbiology**, v. 26, p. 52–57, 2009.

COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 429–453, 2003.

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Characterization of the microflora of attieke, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 131–136, 2006.

CRISPIM, S. M.; NASCIMENTO, A. M. A.; COSTA, P. S.; MOREIRA, J. L. S.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; LIMA, F. L.; MOTA, V. T.; NARDI, R. M. D. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with *puba*, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 15–21, 2013.

DAPKEVICIUS, M. L. N. E.; NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M.; HOUBEN, J. H.; WYMENGA, W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 57, p. 107–114, 2000.

DE MEY, E.; DE KLERCK, K.; DE MAERE, H.; DEWULF, L.; DERDELINCKX, G.; PEETERS, M. C.; FRAEYE, I.; HEYDEN, Y. V.; PAELINCK, H. The occurrence of N-nitrosamines, residual nitrite and biogenic amines in commercial dry fermented sausages and evaluation of their occasional relation. **Meat Science**, v. 96, p. 821–828, 2014.

DJENI, N. T.; BOUATENIN, K. M. J. P.; ASSOHOUN, N. M. C.; TOKA, D. M.; MENAN, E. H.; DOUSSET, X.; DJE, K. M. Biochemical and microbial characterization of cassava inocula from the three main *attieke* production zones in Côte d'Ivoire. **Food Control**, v. 50, p. 133–140, 2015.

EFSA (European Food Safety Authority). **Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods**. EFSA Journal, v. 9, n. 10, p. 2392, 2011.

ELIASSEN, K. A.; REISTAD, R.; RISØEN, U.; RØNNING, H. F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v.78, p.273-280, 2002.

ELIJAH, A. I.; ATANDA, O. O.; POPOOLA, A. R.; UZOCHUKWU, S. V. A. Molecular characterization and potential of bacterial species associated with cassava waste. **Nigerian Food Journal**, v. 32, n. 2, p. 56 – 65, 2014.

EMATER. **Tecnologia de produção de farinha de mandioca**. 2004 - On line. Disponível em: http://www.engentecno.com.br/como_fabricar.htm. Acesso em: 14 abr. 2015.

EMBORG, J.; DALGAARD, P. Modelling the effect of temperature, carbon dioxide, water activity and pH on growth and histamine formation by *Morganella psychrotolerans*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 128, n. 2, p. 226–33, 2008.

FAILLA, M. L., CHITCHUMROONCHOKCHAI, C., SIRITUNGA, D., DE MOURA, F., FREGENE, M., SAYRE, R. T. Retention during processing and bioaccessibility of β -carotene in high β -carotene transgenic cassava root. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3861–3866, 2012.

FESSARD, A.; REMIZE, F. Why Are *Weissella* spp. Not Used as Commercial Starter Cultures for Food Fermentation? **Fermentation**, v. 3, p. 38, 2017.

FIORETTO, R. A. **Uso direto da manipueira em fertirrigação. Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca.** (Série: Culturas de tuberosas amiláceas latino americanas). São Paulo: Cargill, v. 4, p. 13-37, 2001.

FLASAROVÁ, R.; PACHLOVÁ, V.; BUNKOVÁ, L.; MENŠÍKOVÁ, A.; GEORGOVÁ, N.; DRÁB, V.; BUNKA, F. Biogenic amine production by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains in the model system of Dutch-type cheese. **Food Chemistry**, v. 194, p. 68-75, 2016.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; ALMEIDA, E. G.; DUARTE, W. F.; SCHWAN, R. F. Study of the physicochemical parameters and spontaneous fermentation during the traditional production of yakupa, an indigenous beverage produced by Brazilian Amerindians. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 567-577, 2014.

FUJIKAWA C. S.; HARA C.; GLÓRIA M. B. A.; ROCHA F. L. Monoamine oxidase inhibitors and diet – Update and practical recommendations for clinical use. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 48, n.10, p. 453-460, 1999.

GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p. 251-260, 2004.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v. 4, p. 1-38, 2005.

GLÓRIA, M. B. A.; VIEIRA, S. M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v. 1, n. 2, p. 258-270, 2007.

HALÁSZ, A.; BARÁTH, A.; SIMON-SARKADI, L.; HOLZAPFEL, W. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. **Trends in Food Science and Technology**, v. 5, p. 42-49, 1994.

HENRÍQUEZ-AEDO, K.; DURÁN, D.; GARCIA, A.; HENGST, M. B.; ARANDA, M. Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of chilean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 183- 189, 2016.

HILLARY, A. R.; PEGG, A. E. Decarboxylases involved in polyamines biosynthesis and their inactivation by nitric oxide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1647, p. 161-166, 2003.

HOET, P. H.; NEMERY, B. Polyamines in the lung: polyamine uptake and polyaminelike pathological or toxicological conditions. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 278, p. 417-433, 2000.

HOLZAPFEL, W. H.; WOO, B. J. B. (Eds.) (2014). **Introduction to the LAB**. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. pp. 1-12.

HUSSAIN, T.; TAN, B.; REN, W.; RAHU, N.; KALHORO, D. H.; YIN, Y. Exploring polyamines: Functions in embryo/fetal development. **Animal Nutrition**, v. 3, n.1, p. 7-10, 2017.

INNOCENTE, N.; BIASUTTI, M.; PADOVESE, M.; MORET, S. “Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract”, **Food Chemistry**, v. 101, p. 1285–1289, 2007.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro. Jan. 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2415/epag_2019_jan.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2019.

JEEVANANDAM, M.; HOLADAY, B.S.; BEGAY, C.K.; PETERSEN, S.R. Nutrition efficacy of a spermidine supplemented diet. **Nutrition**, v. 13, n. 9, p. 788-794, 1997.

JØRGENSEN, L. V.; HUSS, H. H.; DALGAARD, P. The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 920– 934, 2000.

KALÁČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

KALÁČ, P.; DADÁKOVÁ, E.; PELIKÁNOVÁ, T. Content of biogenic amines and polyamines in some species of European wild-growing edible mushrooms. **European Food Research and Technology**, v. 230, p. 163-17, 2009.

KALÁČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 219-230, 2005.

KALÁČ, P.; ŠVECOVÁ, S.; PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v. 77, p. 349–351, 2002.

KIMURA, M.; KOBORI, C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweet potato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1734-1746, 2007.

KOMPRDA, T.; BURDYCHOVÁ, R.; DOHNAL, V.; CWIKOVÁ, O.; SLÁDKOVÁ, P.; DVORÁCKOVÁ, H. Tyramine production in Dutch-type semi-hard cheese from two different producers. **Food Microbiology**, v. 25, p. 219- 227, 2008.

KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V. A.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 342–351, 2007.

LA FRANO, M. R.; DE MOURA, F. F.; BOY, E.; LÖNNERDAL, B.; BURRI, B. J. Bioavailability of iron, zinc, and provitamin A carotenoids in biofortified staple crops. **Nutrition Reviews**, v. 72, n. 5, p. 289–307, 2014.

LACERDA, I. C. A.; MIRANDA, R. L.; BORELLI, B. M.; NUNES, A. C.; NARDI, R. M. D.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentation during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 213-219, 2005.

LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, p. 145-156, 2010.

LANGE, J.; WITTMANN, C. Enzyme sensor array for the determination of biogenic amines in food samples. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 372, n. 2, p.276-83, 2002.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**. v. 58, n. 1–2, p. 1-37, 2000.

LINARES, D. M.; MARTÍN, C. M.; LADERO V.; ALVARES M. A.; FERNÁNDEZ, M. Biogenics amines in dairy products. **Critical Reviews Food Science Nutrition**, v. 51, n.7, p. 691-703, 2011.

LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples. **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2005.

LÖSER, C. Polyamines in human and animal milk. **British Journal of Nutrition**, v. 84, n. 1, p. 55-58, 2000.

LOUNVAUD-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, p. 9 –13, 2001.

MAIANI, G.; CASTÓN, M. J. P.; CATASTA, G.; TOTI, E.; CAMBRODÓN, I. G.; BYSTED, A.; GRANADO-LORENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; KNUTHSEN, P.; VALOTI, M.; BÖHM, V.; MAYER-MIEBACH, E.; BEHSNILIAN, D.; SCHLEMMER, U. Carotenoids: Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. **Molecular Nutrition Food Research**. v. 53, n. Supplement S2, p. S194 – S218, 2009.

MARCOBAL, A.; DE LAS RIVAS, B.; MORENO-ARRIBAS, M. V.; MUÑOZ, R. Identification of the ornithine decarboxylase gene in the putrescine-producer *Oenococcus oeni* BIFI-83. **FEMS Microbiology Letters**, v. 239, p. 213–220, 2004.

MARCOBAL, A.; MARTÍN-ALVAREZ, P. J.; POLO, M. C.; MUÑOZ, R.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Formation of biogenic amines throughout the industrial manufacture of red wine. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 397– 404, 2006.

MARINHO, H. A.; ARCKOLL, D. B. Estudo sobre o caroteno em algumas variedades amazônicas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). **Acta Amazônica**, v. 1, p. 71-75, 1981.

MARINO, M.; MAIFRENI, M.; MORET, S.; RONDININI, G. The capacity of *enterobacteriaceae* species to produce biogenic amines in cheese. **Letters of Applied Microbiology**, v. 31, p. 169-173, 2000.

MARTUSCELLI, M., CRUDELE, M. A., GARDINI, F., SUZZI, G. Biogenic amine formation and oxidation by *Staphylococcus xylosus* strains from artisanal fermented sausages. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 228– 232, 2000.

- MIAMBI, E.; GUYOT, J.P.; AMPE, F. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 111–120, 2003.
- MODESTO JUNIOR, E. N.; CHIST, R. C.; PENA, R. S. Oven drying and hot water cooking processes decrease HCN contents of cassava leaves. **Food Research International**, v. 119, p. 517-523, 2019.
- MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184 –197, 2005.
- MOLLER, B. L. Functional diversifications of cyanogenic glucosides. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, p. 338-347, 2010.
- MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Processing Techniques to Reduce Toxicity and Antinutrients of Cassava for Use as a Staple Food. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 17-27, 2009.
- NAMBISAN, B. Strategies for elimination of cyanogens from cassava for reducing toxicity and improving food safety. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 690–693, 2011.
- NGUDI, D. D.; KUO, Y. H.; LAMBEIN, F. Food safety and amino acid balance in processed cassava “cossettes”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3042-3049, 2002.
- NHASSICO, D.; MUQUINGUE, H.; CLIFF, J.; CUMBANA, A.; BRADBURY, J. H. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2043–2049, 2008.
- NWACHUKWU, I. D.; UDENIGWE, C. C.; ALUKO, E. R. Lutein and zeaxanthin: Production technology, bioavailability, mechanisms of action, visual function, and health claim status. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 74-84, 2016.
- OGUNTOYINBO, F. A. Culture-independent analysis for determination of yeast diversity during solid substrate fermentation of grated cassava for gari production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2461- 2465, 2011.
- OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. **Food Control**, v. 21, n.3, p. 306–312, 2010.
- OKAFOR, P. N.; OKOROWKWO, C. O.; MADUAGWU, E. N. Occupational and dietary exposures of humans to cyanide poisoning from large scale cassava processing and ingestion of cassava foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 7, p. 1001-1005, 2002.
- ÖNAL, A.; TEKKELI, S. E. K.; ÖNAL, C. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods, **Food Chemistry**, v. 138, p. 509–515, 2013.
- OYEWOLE. O.B. Characteristics and significance of yeasts’ involvement in cassava fermentation for ‘fufu’ production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 213–218, 2001.

PANTAROTO, S.; CEREDA, M.P. **Linamarina e sua decomposição no ambiente**. In: CEREDA, M. P. Manejo Uso e Tratamento de Subprodutos da Industrialização da Mandioca. Fundação Cargill – São Paulo, 2001. Cap. 5, p. 80-95: Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante.

POVEDA, J. M.; RUIZ, P.; SESEÑA, S.; PALOP, M. L. Occurrence of biogenic amine-forming lactic acid bacteria during a craft brewing process. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 129-136, 2017.

RADLER F.; FATH, K.P. Histamine and other biogenic amines in wines. In JM Rantz. Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grape and Wine. **American Society for Enology and Viticulture**. Davies, California, p. 185–195, 1991.

RAMOS, C. L.; SOUSA, E. S. O.; RIBEIRO, J.; ALMEIDA, T. M. M.; SANTOS, C. C. A. A.; ABEGG, M. A.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical characteristics of *tarubá*, an indigenous beverage produced from solid cassava fermentation. **Food Microbiology**, v. 49, p. 182-188, 2015.

RAO, A.V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207-216, 2007.

ROBERT, P.; VAN VELTHEM, L. **A hora do tacacá**. Anthropology of food, 2009 – Online. Disponível em: <<http://aof.revues.org/index6466.html>>. Acesso em: 15 maio 2015.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M.; GODOY, H. T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 445– 463, 2008.

RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; COLAVITA, G.; GIACCONE, V.; PARISI, E. *Bacillus macerans*, a new potential histamine producing bacteria isolated from Italian cheese. **Food Microbiology**, v. 11, p. 409– 415, 1994a.

RODRIGUEZ-JEREZ, J. J.; MORA-VENTURA, M.T.; LOPEZ-SABATER, E. I.; HERNANDEZ-HERRERO, M. M. Histidine, lysine and ornithine decarboxylase bacteria in salted semi-preserved anchovies. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 784– 787. 1994b.

ROIG-SAGUÉS, A. X., MOLINA, A. P., HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. Histamine and tyramine-forming microorganisms in Spanish traditional cheeses. **European Food Research and Technology**, v. 215, p. 96 -100, 2002.

ROOHBAKHSH, A.; KARIMI, G.; IRANSHAHI, M. Carotenoids in the treatment of diabetes mellitus and its complications: A mechanistic review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 31-42, 2017.

SÁNCHEZ, T.; ORTIZ, D.; MORANTE, N.; CEBALLOS, H.; PACHON, H.; CALLE, F.; PEREZ, J. C. (2010). **New approaches for quantifying carotenoids content in cassava roots**. 11th triennial symposium. African Branch. Kinshasa, D.R. Congo: International Society for Tropical Root crops October 4–8, 2010.

SÁNCHEZ, T.; SALCEDO, E.; CEBALLOS, H.; DUFOUR, D.; MAFLA, G.; MORANTE, N.; CALLE, F.; PÉREZ, J. C.; DEBOUCK, D.; JARAMILLO, G.; MORENO, I. X. Screening of starch quality traits in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Starch/Stärke**, v. 61, p. 310, 2009.

SANTOS, C. C. A. A.; ALMEIDA, E. G.; MELO, G. V. P.; SCHWAN, R. F. Microbiological and physicochemical characterisation of *caxiri*, an alcoholic beverage produced by the indigenous *Juruna* people of Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 112-121, 2012.

SHALABY, A. R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Research International**, v. 29, p. 675-690, 1996.

SILLA-SANTOS, M. H. Biogenic amines: their importance in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 29, n. 2-3, p. 213 -221, 1996.

TIECCO, G.; TANTILLO, G.; FRANCIOSO, E.; PAPARELLA, A.; DE NATALE, G. Ricerca quali-quantitativa di alcune amine biogene in insaccati nel torso delli stagionatura. **Industrie Alimentaire**, v. 5, p. 209-213, 1986.

TODOROV, S. D.; STOJANOVSKI, S.; ILIEV, I.; MONCHEVA, P.; NERO, L. A.; IVANOVA, I. V. Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka”. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 576-586, 2017.

VALLE, T. L.; CARVALHO, C. R. L.; RAMOS, M. T. B.; MÜHLEN, G. S.; VILLELA, O.V. Conteúdo cianogênico em progênies de mandioca originadas do cruzamento de variedades mansas e bravas. **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 221-226, 2004.

VIDAL-CAROU, M. C.; LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID S., VECIANA-NOGUÉS, T. Thin-layer chromatography for the identification and semi-quantification of biogenic amines produced by bacteria. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 4128-4132, 2009.

WOODSIDE, J. V.; MCGRATH, A. J.; LYNER, N.; MCKINLEY, M.C. Carotenoids and health in older people. **Maturitas**, v. 80, n. 1, p. 63-68, 2015.

CAPITULO II - AMINAS BIOGÊNICAS E CIANETO COMO INDICADORES DE QUALIDADE EM TUCUPIS COMERCIAIS

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química, bem como identificar e quantificar aminas bioativas e determinar o teor de cianeto, em tucupis comercializados em supermercados e feiras livres da cidade de Belém (PA). Amostras do produto foram submetidas às análises de pH, acidez total, açúcares redutores e totais, cianeto total e livre, bem como foi investigada a presença de nove aminas bioativas. Em geral, as propriedades físico-químicas dos tucupis analisados foram estatisticamente diferentes, o que é atribuído à falta de padronização do processo de produção do produto. Os teores de cianeto total (8,87- 114,66 mg HCN/L) e livre (0,80 - 38,38 mg HCN/L) encontrados nos tucupis seguiram o mesmo comportamento observado há dez anos, para amostras de tucupi comerciais, o que indica que, mesmo com o estabelecimento de um padrão de identidade e qualidade para o tucupi, não houve uma evolução na qualidade do produto. Foram identificadas quatro aminas biogênicas (tiramina, putrescina, histamina e triptamina) e uma poliamina (espermidina) nas amostras de tucupi analisadas. Mesmo nos tucupis comercializados em supermercados, os quais são provenientes de agroindústrias e apresentam selo de qualidade do órgão fiscalizador, foram observados elevados teores de aminas biogênicas, como pode ser observado na amostra 4 (78,22 mg/L), bem como elevadas dosagens de cianeto total (114,66 mg HCN/L) e livre (38,38 mg HCN/L). Este fato aponta para a necessidade de um maior controle do processo de produção do produto, uma vez que aminas biogênicas estão relacionadas com intoxicações alimentares. Assim, a falta de padronização nas propriedades físico-químicas do tucupi, os elevados teores de cianeto e o perfil de aminas biogênicas apontam para a necessidade de um melhor conhecimento do processo de fabricação do produto, afim de estabelecer condições ótimas para o processamento do tucupi.

Palavras-chave: manipueira; glicosídeos cianogênicos, aminas biogênicas, poliaminas.

1 INTRODUÇÃO

A manipueira é um líquido resultante da prensagem da mandioca triturada, que após fermentação espontânea, seguida de cocção, dá origem ao tucupi (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). A produção do tucupi ainda ocorre de maneira artesanal, com pouco controle tecnológico, o que possibilita que alguns fatores como: boas práticas de fabricação insatisfatórias das unidades processadoras e quantidades de HCN residual no produto acima dos níveis toleráveis, e assim comprometer a qualidade e segurança do produto (ABREU; MATTIETTO, 2014).

Devido a composição, as propriedades físico-químicas e as condições de manipulação, o tucupi pode ser considerado um meio favorável para produção de amins biogênicas. Em alimentos fermentados, estes compostos podem ser formados devido a descarboxilação dos aminoácidos através da ação de micro-organismos que apresentam atividade de descaboxilase, os quais podem ser inerentes, contaminantes ou inseridos intencionalmente no alimento como cultura starter. Um aspecto importante relacionado as amins biogênicas, é que elas podem ser utilizadas como parâmetro de qualidade nos alimentos, de modo que podem refletir a má qualidade das matérias primas utilizadas, bem como condições higiênico-sanitárias deficientes durante o processamento (KALAIČ; ŠVECOVÁ; PELIKÁNOVÁ, 2002; GLÓRIA, 2005).

As amins biogênicas em altas concentrações são indesejáveis em alimentos, pois podem causar efeitos adversos à saúde, tais como dores de cabeça, disfunções respiratórias, palpitação, hiper ou hipotensão e uma série de desordens alérgicas (LADERO et al., 2010). Segundo EFSA (2011), os alimentos fermentados são os que apresentam maior relação com intoxicações alimentares, em virtude da intensa atividade microbiana, logo tornam-se um potencial produto para a formação de amins biogênicas. Assim, a presença destes compostos no tucupi pode ser um indicativo de como o produto está sendo produzido.

A mandioca utilizada na produção do tucupi, conhecida como “brava”, apresenta uma concentração de ácido cianídrico (HCN) acima de 100 mg/kg (CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002). Assim, se o produto não for processado de maneira adequada, a ingestão do mesmo poderá causar intoxicações, com sintomas como: dor de cabeça, náusea, tontura, diarreia e vômito; bem como à morte, quando dosagens elevadas forem administradas (NHASSICO et al., 2008). Existem dados na literatura que indicam a presença de cianeto residual, em níveis expressivos, em tucupis comerciais (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA 2007, CAMPOS et al., 2016). Desta forma, se faz necessária a avaliação dos tucupis que estão sendo

atualmente comercializados, após a aprovação do Regulamento Técnico de Padrão de Identidade e Qualidade do Tucupi (ADEPARÁ, 2008), para verificar se as unidades produtoras de tucupi se adequaram à legislação.

Diante do exposto, com o objetivo de avaliar a qualidade do tucupi produzido atualmente, amostras de tucupis comercializados em feiras livres e supermercados da cidade de Belém (PA) foram caracterizadas físico-quimicamente e avaliadas quanto ao perfil e aos teores de aminas bioativas, e quanto as concentrações de cianeto total e livre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram coletadas 22 amostras de tucupis comerciais, divididos em 2 diferentes lotes (maio/2017 e agosto/2018) sendo: 11 amostras adquiridas em estabelecimentos comerciais, provenientes de unidades agroindustriais (codificadas de 1 a 11) e 11 amostras adquiridas em feiras livres, provenientes de unidades artesanais (codificadas de 12 a 22), da cidade de Belém (PA). As amostras foram acondicionadas em garrafas PET de 300 mL e armazenadas a -18°C até a realização das análises. Todas as análises foram realizadas em triplicata (n = 3)

2.2 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.2.1 Caracterização físico-química

Foram realizadas as seguintes análises nas amostras de tucupi: acidez, por titulação com NaOH 0,1 N (resultados expressos em g/100 mL de ácido láctico); pH, por leitura direta em potenciômetro (W12D, BEL, Itália) e açúcares redutores e totais (g/100 g), pelo método Lane-Eynon (AOAC, 1997).

2.2.2 Determinação do cianeto total e livre

Os teores de cianeto total e livre foram determinados segundo a metodologia proposta por Essers et al. (1993), com algumas adaptações. A extração dos compostos cianogênicos foi baseada em Chisté e Cohen (2011), na qual 5 mL da amostra foram adicionados a 40 mL de solução alcoólica de ácido fosfórico 0,1 M (solução extratora), homogeneizados e centrifugados a 3000 rpm por 10 min. Após a centrifugação, o sobrenadante, contendo os glicosídeos cianogênicos, foi aferido para balão volumétrico de 50 mL.

Para a determinação do cianeto total, uma alíquota de 0,4 mL de tampão pH 7,0 foi adicionado em tubo de ensaio, seguido de 0,1 mL do extrato ácido obtido na etapa anterior e de 0,1 mL da enzima linamarase β -glucosidase (Sigma Aldrich, USA). O tubo foi então submetido a aquecimento a 30°C, em banho-maria, por 15 min, para promover a hidrólise dos glicosídeos cianogênicos. Após esta etapa, foi adicionado 0,6 mL da solução NaOH 0,2 M, para evitar a volatilização e fixar o HCN na solução, e o conjunto permaneceu em repouso por 5 min, a 25±1°C, para a decomposição da cianidrina à cianeto. Em seguida, 2,8 mL de tampão pH 6,0 e 0,1 mL de cloroamina T foram adicionados à mistura, a qual foi agitada e submetido a resfriamento, em banho de gelo por 5 min. Finalmente, foi adicionado 0,6 mL do reagente de cor (solução de isonicotinato/1,3-dimetilbarbiturato), seguido de agitação e posterior repouso, por 10 min à temperatura ambiente (\approx 25°C). O complexo colorido de cor azul foi submetido a leitura em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific, Evolution 60, Massachusetts, USA) a 605 nm.

Para a quantificação do cianeto livre, 0,6 mL do extrato ácido obtido na primeira etapa foi adicionado em tubo de ensaio contendo 3,4 mL de tampão pH 6,0, aos quais foi adicionado 0,1 mL de cloroamina T. O conjunto foi homogeneizado e resfriado em banho de gelo por 5 min. Em seguida foi adicionado 0,6 mL do reagente de cor, o conjunto foi agitado e mantido em repouso por 10 min à temperatura ambiente (\approx 25°C), para posterior leitura da solução em espectrofotômetro a 605 nm. Os teores de HCN total e livre foram quantificados por curva analítica de oito pontos (0,5-10 μ g HCN / mL), em duplicata ($r^2 \geq 0,99$) e os resultados ($n = 3$) foram expressos em mg HCN/mL.

2.2.3 Identificação e quantificação das aminas bioativas

Para a extração das aminas, o tucupi (5 mL) foi homogeneizado em agitador (5 min) com 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, seguido de centrifugação (Jouan Thermo MR23i, França) a 11180 x g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo e em membranas de 0,45 μ m (BRITO et al., 2017).

Nove aminas bioativas foram pesquisadas, sendo: espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina. As aminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por pareamento de íons, em coluna de fase reversa. Um cromatógrafo modelo LC-10CE, com câmara de mistura à alta pressão, conjunto de lavagem automática de pistão e injetor

automático modelo SIL-10AD VP (Shimadzu, Kioto, Japão) foi utilizado e as aminas foram separadas utilizando coluna Novapak C18 (3,9×300 mm, 4 µm, 60 Å, Waters, MA, USA) e um gradiente de eluição de acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 15 mM, com pH ajustado para 4,9, com ácido acético glacial (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B) (BRITO et al., 2017).

A identificação das aminas foi feita por comparação entre os tempos de retenção e a co-eluição com padrões. A quantificação foi feita por fluorimetria (340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente), após derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído, utilizando curvas analíticas (duplicata) para cada amina ($r^2 \geq 0,99$). O teor de aminas bioativas (n = 3, base úmida) foi expresso em mg/L de amostra.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados analíticos foram submetidos à análise estatística, empregando análise de variância (ANOVA) a 5% de significância e teste complementar de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software Statistica Kernel Release 7.1.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

Na Tabela 1, são apresentados os resultados da caracterização físico-química das 22 amostras de tucupi analisadas. Segundo a Instrução Normativa nº 001/2008, da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ, 2008), o tucupi deve apresentar pH entre 3,5 a 4,3. Das 22 amostras de tucupi analisadas, 82% apresentaram pH < 3,5; sendo 55% provenientes de unidades agroindustriais e 27% provenientes de unidades artesanais. Por outro lado, apenas as amostras 15, 17 e 18, provenientes de unidades artesanais, apresentaram pH > 4,3.

Tabela 1. Caracterização físico-química de amostras de tucupi obtidas no mercado consumidor de Belém-PA.

Amostras	Codificação	pH	Acidez (g de ácido lático/100 mL)	Açúcares Totais (g/100 mL)	Açúcares Redutores (g/100 mL)
Unidades agroindustriais	1	3,39 ± 0,01 ^{mn}	0,16 ± <0,01 ^{mn}	nd	nd
	2	3,40 ± 0,01 ^m	0,19 ± <0,01 ^{lm}	0,44 ± 0,01 ^{gh}	nd
	3	3,27 ± 0,02 ^o	0,40 ± <0,01 ^g	nd	nd
	4	3,66 ± 0,01 ⁱ	0,56 ± 0,01 ^e	0,50 ± 0,02 ^{gh}	0,50 ± 0,01 ^{def}
	5	4,30 ± 0,01 ^d	0,18 ± <0,01 ^{lmn}	0,66 ± 0,02 ^{fg}	0,64 ± 0,01 ^{bcd}
	6	3,26 ± 0,01 ^o	0,24 ± <0,01 ^{hi}	0,32 ± 0,01 ^h	0,22 ± 0,01 ^f
	7	3,06 ± 0,02 ^p	0,67 ± 0,01 ^c	0,79 ± 0,01 ^{ef}	nd
	8	3,52 ± 0,01 ^j	1,07 ± 0,02 ^b	0,28 ± 0,01 ^h	0,23 ± 0,01 ^f
	9	2,82 ± 0,04 ^q	0,37 ± 0,01 ^g	nd	nd
	10	4,04 ± 0,01 ^f	0,59 ± 0,01 ^{de}	nd	nd
	11	4,22 ± 0,02 ^e	0,38 ± 0,02 ^g	2,71 ± 0,14 ^b	2,33 ± 0,47 ^a
Unidades artesanais	12	3,93 ± 0,01 ^g	0,17 ± 0,01 ^{mn}	0,92 ± 0,03 ^{de}	0,69 ± 0,22 ^{bcd}
	13	3,47 ± 0,01 ^l	0,14 ± <0,01 ⁿ	1,04 ± 0,04 ^d	1,02 ± 0,05 ^b
	14	3,85 ± 0,01 ^h	0,22 ± <0,01 ^{ijl}	0,60 ± 0,02 ^{fg}	0,57 ± 0,02 ^{cdef}
	15	4,67 ± 0,01 ^a	0,24 ± <0,01 ^{hi}	0,73 ± 0,02 ^{ef}	0,60 ± 0,06 ^{cdef}
	16	3,45 ± 0,01 ^l	0,48 ± 0,01 ^f	nd	nd
	17	4,51 ± 0,01 ^c	0,23 ± <0,01 ^{ij}	4,35 ± 0,29 ^a	0,27 ± 0,01 ^{ef}
	18	4,59 ± 0,02 ^b	0,27 ± <0,01 ^h	0,94 ± 0,07 ^{de}	0,91 ± 0,06 ^{bc}
	19	3,47 ± 0,01 ^l	0,15 ± 0,01 ⁿ	1,14 ± 0,06 ^d	1,04 ± 0,10 ^b
	20	3,02 ± 0,02 ^p	1,36 ± 0,03 ^a	nd	nd
	21	3,39 ± 0,02 ^m	0,60 ± 0,03 ^d	2,07 ± 0,06 ^c	0,56 ± 0,02 ^{cdef}
	22	3,35 ± 0,02 ⁿ	0,40 ± 0,03 ^g	nd	nd

Os valores com letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância); nd = não detectado pelo método. n=22, sendo 2 lotes distintos de cada.

As amostras de tucupi apresentaram valores de pH (2,82 a 4,67) semelhantes aos valores reportados por Chisté, Cohen e Oliveira (2007) (3,0 - 4,35) e Campos et al. (2016) (2,80-4,26). Apenas as amostras 15 e 18 apresentaram pH > 4,5, o que permite classificar o tucupi como um alimento ácido (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). Os baixos valores de pH observados no tucupi, atribuídos à acidificação promovida pelas bactérias lácticas, podem ser suficientes para controlar o crescimento e/ou a sobrevivência de patógenos (MANTE; SAKYI-DAWSON; AMOA-AWUA, 2003; ANYOGU et al., 2014), aliado a uma cocção eficiente, torna o tucupi um alimento seguro, livre de contaminantes de natureza biológica.

Por outro lado, os valores de pH observados nas amostras podem favorecer a atividade da β -glicosidase (linamarase) (CEREDA, 2002). Esta enzima é responsável pela cianogênese da linamarina, o glicosídeo cianogênico que dá origem ao ácido cianídrico (HCN), na mandioca e em produtos derivados da mandioca, como o tucupi (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). De modo geral, as amostras de tucupi apresentaram diferenças significativas entre valores de pH ($p \leq 0,05$), sendo que as amostras 1, 2 (unidades agroindustriais), 21 e 22 (unidades artesanais) foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Embora tenha sido observado esse perfil para o pH, nenhuma das amostras analisadas apresentou acidez inferior a 0,1 g de ácido láctico/100 mL, teor mínimo proposto pela Instrução Normativa nº 001/2008, da Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ, 2008), cuja faixa de acidez total deve estar entre 0,1 a 0,8 g de ácido láctico/100 mL. Apenas a amostra 8, proveniente de uma unidade agroindustrial, e a amostra 20, proveniente de uma unidade artesanal, apresentaram acidez superior a 0,8 g de ácido láctico/100 mL. Apenas as amostras 7, 8 e 20 apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre valores de acidez em relação as demais amostras. A acidez observada nas amostras de tucupi (0,1 - 1,4 g de ácido láctico/100 mL), também foram semelhantes aos valores reportados por Chisté, Cohen e Oliveira (2007) (0,3 - 1,0 g de ácido láctico/100 mL) e Campos et al. (2016) (0,3 g - 1,6 g de ácido láctico/100 mL).

Com relação aos teores de açúcares, mais de 85% das amostras de tucupi analisadas apresentaram um teor de açúcares totais dentro do limite máximo recomendado pela legislação (ADEPARÁ, 2008), que é de até 1,5 g/100 mL. Porém, a amostra 11, proveniente de uma unidade agroindustrial, e as amostras 17 e 21, provenientes de unidades artesanais, apresentaram teores de açúcares totais superiores a este limite, sendo que apenas estas foram estatisticamente diferentes das demais ($p \leq 0,05$). Deste modo, os resultados sugerem que houve

a adição de açúcar (sacarose) nestes produtos, o que é considerado uma adulteração. Embora não exista um padrão na legislação referente aos açúcares redutores, eles foram determinados como uma contribuição para a pesquisa, uma vez que dados sobre esta fração de açúcares em tucupis são incipientes na literatura. Os resultados indicam que a fração redutora representa a maior parte dos açúcares presentes no tucupi, porém nas amostras 11, 17 e 21, que não atenderam a legislação, o teor de açúcares redutores foi bem menor que o teor de açúcares totais, logo supõem-se que houve a adição de sacarose nestes produtos.

Essas diferenças observadas nas propriedades físico-químicas dos tucupis analisados podem ser atribuídas às diferentes variedades de mandioca utilizadas no beneficiamento do produto, aos fatores agrônômicos e climáticos, e a microbiota atuante na fermentação. Porém estudos anteriores já demonstravam uma deficiência na padronização do tucupi (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007), o que pode ser atribuído as condições de processamento do produto, que são muito variáveis, principalmente no que se refere às etapas de fermentação e de cocção (CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016). Assim, os resultados obtidos continuam apontando para uma deficiência no controle do processo de produção do tucupi, bem como para a falta de uma fiscalização mais eficiente, por parte dos órgãos competentes.

3.2 AVALIAÇÃO DO CIANETO TOTAL E LIVRE

Foi observada uma variação significativa ($p \leq 0,05$) nos teores de cianeto total e livre entre as amostras de tucupi analisadas (Tabela 2), no qual o valor mínimo de cianeto total obtido (8,87 mg HCN/L) foi inferior ao valor mínimo da faixa reportada por Chisté, Cohen e Oliveira (2007) (55,58-157,17 mg HCN/kg) e por Campos et al. (2016) (37,67-126,21 mg HCN/L), porém o valor máximo encontrado no estudo (114,66 HCN/L) foi semelhante aos mencionados pelos mesmos autores.

Pefil semelhante foi observado nos teores de cianeto livre, cujo valor mínimo determinado nas amostras (0,80 HCN/L) foi 92% menor que o teor observado por Chisté, Cohen e Oliveira (2007) (9,47 HCN/L) e 80% menor que o de Campos et al. (2016) (4,18 HCN/L), sendo que o teor máximo encontrado no estudo (38,38 mg HCN/L) foi similar a dosagem detectada por Chisté, Cohen e Oliveira (2007) (46,86 mg HCN/L) e aproximadamente 50% mais elevado que o reportado por Campos et al. (2016) (18,94 mg HCN/L).

Tabela 2. Dosagem de cianeto total e livre nas amostras de tucupi.

Amostras	Codificação	Cianeto (mg HCN/L)	
		Total	Livre
Unidades agroindustriais	1	60,06 ± 0,31 ^d	20,52 ± 0,06 ^d
	2	49,51 ± 0,38 ^e	1,16 ± 0,01 ^o
	3	79,22 ± 2,45 ^c	30,92 ± 0,05 ^c
	4	114,66 ± 3,29 ^a	38,38 ± 0,61 ^a
	5	107,09 ± 4,06 ^{ab}	34,27 ± 1,22 ^b
	6	32,03 ± 0,61 ^{hij}	8,27 ± 0,14 ^{jl}
	7	43,13 ± 1,61 ^{efg}	18,54 ± 0,20 ^e
	8	67,05 ± 1,15 ^d	16,77 ± 0,20 ^f
	9	8,87 ± 0,77 ^l	3,33 ± 0,01 ⁿ
	10	40,85 ± 2,83 ^{efgh}	3,91 ± 0,09 ⁿ
	11	81,55 ± 0,69 ^c	14,65 ± 0,20 ^g
Unidades artesanais	12	103,19 ± 6,66 ^b	17,97 ± 0,61 ^{ef}
	13	37,18 ± 2,53 ^{fghi}	8,17 ± 0,33 ^l
	14	59,79 ± 3,29 ^d	12,01 ± 0,51 ^h
	15	23,81 ± 1,34 ^j	0,80 ± 0,06 ^o
	16	47,40 ± 1,22 ^e	8,00 ± 0,04 ^{lm}
	17	64,45 ± 1,45 ^d	10,04 ± 0,32 ⁱ
	18	12,72 ± 0,23 ^l	0,84 ± 0,09 ^o
	19	27,87 ± 0,23 ^{ij}	6,59 ± 0,11 ^m
	20	42,05 ± 1,45 ^{efg}	9,75 ± 0,11 ^{ij}
	21	35,44 ± 2,83 ^{ghi}	8,32 ± 0,14 ^{jl}
	22	46,21 ± 2,60 ^{ef}	17,32 ± 0,20 ^{ef}

Os valores com letra iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância).

Pelo fato da manipueira apresentar elevados teores de cianeto, é indispensável verificar o teor deste composto no tucupi, para ratificar se o processamento realizado foi efetivo na sua detoxificação. Visto que a forma tóxica do cianeto é a livre (CN⁻) ou do seu ácido (HCN), sendo que a linamarina ligada é quantificada como cianeto total (ligado ou potencial), e para investigar o cianeto livre (fração tóxica) é necessário hidrolisar a linamarina. Deste modo, a presença de cianeto total no tucupi, pode causar intoxicações devido à sua capacidade de gerar cianeto livre (CN⁻) ou o ácido cianídrico (HCN) (CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007).

As divergências observadas nos teores de cianeto livre e total entre amostras, assim como entre os dados apresentados na literatura, podem estar relacionadas com a quantidade de compostos cianogênicos da matéria-prima (mandioca) utilizada, e com as condições de

processamento do tucupi (CHARLES; SRIROTH; HUANG, 2005; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). O tempo de cocção, por exemplo, pode afetar significativamente o teor de cianeto total no produto, devido a elevada volatilização do cianeto, em condições de aquecimento (CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016). É importante ressaltar que as raízes utilizadas para produção de farinhas de mandioca são raízes com elevado teor de compostos cianogênicos e ácido cianídrico, logo a manipueira utilizada para produção de tucupi também apresenta elevados teores destes compostos (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). Assim sendo, caso não ocorra um processo de desintoxicação natural eficiente (fermentação) e não seja realizada uma cocção eficiente, o tucupi apresentará um teor elevado de HCN.

Por sua vez, Campos, Carvalho e Mattietto (2016) observaram que quanto maior for o tempo de fermentação, menores são os teores de cianeto total e livre, provavelmente em virtude da ação mais prolongada da linamarase: enzima que hidrolisa a linamarina, promovendo à liberação do HCN. O processo fermentativo permite a ação mais prolongada da linamarase, que é aos poucos inibida pela acidificação e queda do pH (CHISTÉ; COHEN, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a dose letal (DL50) de cianeto é de 10 mg HCN/kg de peso vivo. Assim sendo, com base nos teores de cianeto total observados nas amostras de tucupi, um indivíduo com 60 kg teria que ingerir 5 L do tucupi correspondente a amostra quatro, para atingir a dose letal de HCN. Porém, como a presença de HCN em alimentos oferece riscos de intoxicação alimentar, os teores de cianeto total observados nas amostras de tucupi analisadas indicam, que ainda se faz necessário um melhor controle das variáveis de processo (tempo de fermentação e cocção) do tucupi, afim de garantir um produto isento de cianetos, ou com níveis totalmente seguros deste composto.

3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMINAS BIOATIVAS

Esta é a primeira pesquisa na qual aminas bioativas foram identificadas e quantificadas em tucupis comerciais. Entre as nove aminas bioativas investigadas, cinco foram detectadas nas amostras de tucupi, sendo: quatro aminas biogênicas (tiramina, putrescina, histamina e triptamina) e uma poliamina (espermidina) (Tabela 3).

Das aminas biogênicas detectadas a tiramina foi identificada em 18% das amostras, a putrescina em todas as amostras, a histamina em 72%, e a triptamina em 32%. Dentre as aminas bioativas, as aminas biogênicas podem ser utilizadas como parâmetro ou critério de qualidade em alimentos, pois podem refletir a má qualidade da matéria-prima utilizada, bem como condições higiênico-sanitárias deficitárias durante o processamento de alimentos. Isso se deve ao fato, desses compostos serem produtos do metabolismo de micro-organismos que apresentam enzimas amino-descarboxilases, que irão descarboxilar aminoácidos e formar aminas biogênicas, além de serem termoestáveis (KALÁČ; ŠVECOVÁ; PELIKÁNOVÁ, 2002; GLÓRIA, 2005).

Os alimentos fermentados apresentam maior índice de intoxicações alimentares, devido à intensa atividade microbiana e as condições do meio serem favoráveis para a formação de aminas biogênicas (EFSA, 2011). Assim, a presença das aminas tiramina, putrescina, histamina e triptamina nas amostras de tucupi pode estar relacionada com as boas práticas de fabricação insatisfatórias nas unidades produtoras, devido o processo ainda ocorrer, na maioria dos casos, de maneira artesanal e devido à ineficiência de fiscalização, por parte dos órgãos de controle.

Adicionalmente, o tucupi é considerado um meio favorável para produção de aminas biogênicas, pois há evidências de que a microbiota predomina durante a fermentação da manipueira sejam bacterias lácticas e leveduras, por serem micro-organismos capazes de suportar os baixos níveis de pH atingidos; especialmente no final do processo fermentativo (OGUNTOYINBO; DODD, 2010; CHISTÉ; COHEN, 2011; BRITO et al., 2019). Meios ácidos (pH 2,5-6,5), como o tucupi (Tabela 1), estimulam a produção de aminas biogênicas, por ser um mecanismo de proteção da bactéria ao ambiente ácido (GLÓRIA, 2005).

Tabela 3. Composição de aminas bioativas nas amostras de tucupi.

Amostras	Codificação	Aminas bioativas (mg/L)					Soma de Aminas biogênicas*
		Tiramina	Putrescina	Histamina	Triptamina	Espermidina	
Unidades agroindustriais	1	nd	31,79 ± 1,28 ^a	1,55 ± 0,11 ^{cd}	nd	0,44 ± 0,15 ^g	33,34
	2	nd	6,24 ± 0,29 ^e	1,56 ± 1,03 ^{cd}	nd	nd	7,80
	3	4,21 ± 0,04 ^a	7,01 ± 0,22 ^e	1,00 ± 0,04 ^{cd}	nd	0,80 ± 0,12 ^{efg}	12,22
	4	0,83 ± 0,02 ^c	10,54 ± 0,49 ^d	66,85 ± 2,78 ^a	nd	1,64 ± 0,06 ^{bcd}	78,22
	5	nd	2,29 ± 0,05 ^{hijl}	nd	2,94 ± 0,19 ^a	0,92 ± 0,01 ^{efg}	5,23
	6	nd	16,11 ± 0,34 ^c	4,01 ± 0,19 ^c	2,53 ± 0,14 ^{ab}	0,67 ± 0,01 ^{fg}	22,65
	7	3,66 ± 0,16 ^b	2,49 ± 0,13 ^{hijl}	13,62 ± 0,09 ^b	0,81 ± 0,03 ^c	nd	30,64
	8	nd	1,60 ± 0,08 ^{ijl}	16,79 ± 1,59 ^b	nd	nd	18,39
	9	nd	23,07 ± 0,87 ^b	1,95 ± 0,16 ^{cd}	1,77 ± 0,12 ^d	nd	26,79
	10	nd	2,86 ± 0,14 ^{ghij}	15,98 ± 0,53 ^b	nd	1,72 ± 0,35 ^{bc}	18,84
	11	nd	2,77 ± 0,04 ^{hijl}	nd	1,65 ± 0,05 ^d	1,03 ± 0,02 ^{efg}	4,42
Unidades artesanais	12	nd	1,77 ± 1,03 ^{ijl}	nd	nd	2,20 ± 0,14 ^{ab}	1,77
	13	nd	2,83 ± 0,07 ^{ghij}	nd	nd	1,39 ± 0,16 ^{cde}	2,83
	14	nd	1,23 ± 0,26 ^{jl}	0,49 ± 0,09 ^d	nd	1,08 ± 0,06 ^{def}	1,72
	15	nd	3,22 ± 0,05 ^{ghi}	1,14 ± 0,03 ^{cd}	nd	1,68 ± 0,13 ^{bcd}	4,36
	16	nd	1,00 ± 0,02 ^l	2,21 ± 0,09 ^{cd}	nd	nd	3,21
	17	nd	1,25 ± 0,03 ^{jl}	1,64 ± 0,19 ^{cd}	nd	2,48 ± 0,25 ^a	2,89
	18	nd	5,29 ± 0,53 ^{ef}	0,81 ± 0,06 ^{cd}	nd	0,80 ± 0,11 ^{efg}	6,10
	19	nd	4,65 ± 0,22 ^{fg}	1,13 ± 0,51 ^{cd}	nd	0,85 ± 0,18 ^{efg}	5,78
	20	nd	5,21 ± 0,12 ^{ef}	nd	0,62 ± 0,15 ^c	0,66 ± 0,04 ^{fg}	5,83
	21	0,49 ± 0,08 ^c	3,94 ± 0,24 ^{fgh}	1,51 ± 0,21 ^{cd}	nd	0,56 ± 0,13 ^{fg}	5,94
	22	nd	1,78 ± 0,03 ^{ijl}	nd	2,10 ± 0,02 ^{bd}	0,42 ± 0,01 ^g	3,88

Os valores com letra iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si (Teste de Tukey a 5% de significância); nd = não detectado pelo método. *Soma das aminas biogênicas (Tiramina + Putrescina + Histamina + Triptamina)

Embora aminas biogênicas como a histamina, a tiramina e a putrescina sejam necessárias para muitas funções fisiológicas em humanos e animais, e sejam rapidamente detoxificadas, o consumo de alimentos com elevadas concentrações destes compostos pode causar efeitos tóxicos, como: dores de cabeça, disfunções respiratórias, palpitação, hiper ou hipotensão e uma série de desordens alérgicas (LADERO et al., 2010).

Apesar do tucupi, após o processo de fermentação, ser submetido a um processo de cocção, para eliminação do HCN (CAMPOS, CARVALHO; MATTIETTO, 2016), as aminas bioativas são termo resistentes (LEHANE; OLLEY, 2000; TAPINGKAE et al., 2010, ALVAREZ; MORENO-ARRIBAS, 2014), não sendo assim eliminadas por esse tratamento térmico, como foi observado na pesquisa realizada por Brito et al. (2019). Como há relatos do envolvimento de aminas biogênicas em casos de intoxicação alimentar (EFSA, 2011), se faz necessário identificar a etapa do processamento do tucupi na qual as aminas identificadas são formadas, para que se possa fazer um controle eficiente da presença das mesmas no produto final.

De acordo com EFSA (2011), os níveis de histamina que podem causar efeitos adversos a saúde são: 50 mg de histamina para indivíduos saudáveis e limites inferiores para indivíduos com intolerância à histamina; 600 mg de tiramina para indivíduos saudáveis que não tomam medicamentos inibidores da monoamino oxidase (MAOI), 50 mg para indivíduos que tomam medicamentos da terceira geração MAOI e 6 mg para indivíduos que tomam medicamentos MAOI clássicos. Portanto, o nível de histamina encontrado na amostra 4 (66,85 mg/mL) é preocupante, para indivíduos com intolerância à histamina e para indivíduos que consomem medicamentos MAOI clássicos.

Entre as poliaminas, a espermidina foi identificada em 77% das amostras de tucupi (Tabela 3), o que é perfeitamente justificável, uma vez que esta amina é predominante em vegetais (BARDÓCZ, 1995; ELIASSEN et al., 2002). Em concentrações normalmente encontradas em alimentos, as poliaminas não são tóxicas, porém elas podem acelerar o crescimento de tumores. Então, para pacientes em tratamento de câncer recomenda-se uma dieta com reduzidos teores poliaminas (CIPOLLA; HAVOUIS; MOULINOX, 2010; KALÁČ, 2014).

A presença de poliaminas em alimentos é relevante devido ao caráter antioxidante dessas aminas, com exceção da putrescina, que embora tenha sido relatada por alguns autores como sendo uma poliamina, não atua como antioxidante (KALÁČ, 2014). Desta forma, a

putrescina seria melhor classificada no grupo das aminas biogênicas, pois estruturalmente ela é uma diamina, mas é formada pela descarboxilação do aminoácido ornitina, e também é intermediário obrigatório na biossíntese da espermidina e da espermina (KALAČ; KRAUSOVÁ, 2005; MOINARD; CYNOBER; BANDT, 2005, KALAČ, 2014). Em alimentos fermentados, a putrescina é classificada como uma amina biogênica, e elevados teores desta amina são considerados raros em produtos frescos. Porém o aumento dos níveis da putrescina pode ocorrer pela atividade de vários grupos de bactérias, principalmente *Enterobacteriaceae* e *Clostridium spp.*, em condições inadequadas de armazenamento e manipulação (KALAČ, 2014).

De acordo com EFSA (2011), informações sobre as concentrações de putrescina e cadaverina que podem causar efeitos adversos agudos à saúde e/ou potencializar os efeitos da histamina e de outras aminas biogênicas, ainda são insuficientes. Entretanto, algumas pesquisas reportam que a atividade farmacológica da putrescina e da cadaverina são menos potentes do que a da histamina e da tiramina, ainda que a questão mais relevante da putrescina e da cadaverina em relação ao alimento, seja o fato da potencialização da toxicidade de outras aminas; especialmente a histamina. De acordo com Kalač (2014), o conteúdo de poliaminas em um produto é considerado baixo quando for menor que 10 mg/kg, alto quando maior que 10 mg/kg e muito alto para níveis superiores a 100 mg/kg. Assim, todas as amostras de tucupi analisadas apresentaram teores de poliaminas (espermidina) considerados baixos.

Deve-se enfatizar que as amostras provenientes de agroindústrias apresentaram os maiores valores na somatória das aminas biogênicas (Tabela 3). A amostra 4 proveniente de uma agroindústria, apresentou o maior teor de cianeto total (114,66 mg HCN/L) e livre (38,38 HCN/L), bem como os maiores teores de aminas biogênicas (78,22 mg/L), estes resultados indicam que as etapas de processamento do tucupi, fermentação e cocção foram deficientes aliado ao fato desta agroindústria ter um elevado volume de produção uma vez que o pH do produto (3,66) permite que o meio seja favorável a produção destes compostos, em virtude de sua formação ser um mecanismo de proteção da bactéria ao meio ácido. Portanto, conhecer os níveis das aminas biogênicas, assegurar as Boas Práticas de Fabricação e Manipulação nas diferentes etapas de beneficiamento do tucupi e ter um controle efetivo, principalmente nas etapas de fermentação e cocção são importantes do ponto de vista funcional, toxicológico e do controle de qualidade do produto.

4 CONCLUSÃO

Neste estudo foram avaliados o padrão físico-químico, os níveis de cianeto, e pela primeira vez, foram determinados o perfil e teores de amins bioativas em amostras de tucupi comerciais. Com relação as propriedades físico-químicas, foram observadas diferenças entre as amostras, devido as condições de processamento do produto serem muito distintas. Foram detectadas quatro amins biogênicas (tiramina, putrescina, histamina e triptamina), onde a presença delas pode ser um indicativo da má qualidade da matéria-prima utilizada e/ou boas práticas de fabricação insastifatórias durante a produção do produto. As amostras provenientes de agroindústrias apresentaram as maiores concentrações de cianeto total e de amins biogênicas, o que mostra a ineficiência de fiscalização, por parte dos órgãos de controle, assim como uma deficiência no controle das etapas de fermentação e cocção do produto. O teor de cianeto aliado a presença de amins biogênicas requer uma atenção, para que seja oferecido ao consumidor um produto de melhor qualidade e com segurança para a saúde. Os resultados da pesquisa indicam que, embora exista um padrão de identidade e qualidade para o Tucupi, o produto continua sendo comercializado fora dos padrões, oferecendo risco ao consumidor.

5 REFERÊNCIAS

ABREU, L. F.; MATTIETTO, R. A. Procedimentos de fabricação dos derivados de mandioca: recomendações para obtenção de produtos seguros e de qualidade. IN: MODESTO JÚNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. **Cultura da mandioca: apostila**. Belém – PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014, p. 165 – 182.

AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO ESTADO DO PARÁ. Instrução Normativa n.º 001/2008 de 24 de junho de 2008. Padrão de identidade e qualidade do tucupi para comercialização no Estado do Pará. **Diário Oficial do Estado do Pará**, p. 7, 26 jun. 2008. Seção 3. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/diarios/6633377/pg-7-executivo-3-diario-oficial-do-estado-do-para-doepa-de-26-06-2008>>. Acesso em: 13 fev, 2019.

ALVAREZ, M.A.; MORENO-ARRIBAS, M. V. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. **Trends in Food Science & Technology**, v. 39, p. 146-155, 2014.

ANYOGU, A.; AWAMARIA, B.; SUTHERLAND, J. P.; OUOBA, L. I. I. Molecular characterisation and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. **Food control**, v. 39, p. 119-127, 2014.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). **Official methods of analysis**, 16º ed, 3ª rev, 1997.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 341-346, 1995.

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; LOPES, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; PENA, R. S. Influence of spontaneous fermentation of *manipueira* on bioactive amine and carotenoid profiles during *tucupi* production. **Food Research International**, v. 120, p. 209-216, 2019.

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S.; GLÓRIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, p. 484–490, 2017.

CAGNON, J. R.; CEREDA, M. P.; PANTAROTTO, S. **Cultura de tuberosas amiláceas latino-americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, ago/2002. v. 2 (Culturas de tuberosas amiláceas latino-americanas) 1 CD-ROM.

CAMPOS, A. P. R.; CARMO, J. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Avaliação das Características Físico-Químicas e Microbiológicas de Tucupi Comercial**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 25 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 112). Versão eletrônica.

CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 23 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 107). Versão eletrônica.

CEREDA, M. P. Caracterização dos subprodutos da industrialização da mandioca. **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, v. 4, cap. 1, p. 13-37, 2002.

CHARLES, A. L.; SRIROTH, K.; HUANG, T. C. Proximate composition, mineral contents, hydrogen cyanide and phytic acid of five cassava genotypes. **Food Chemistry**, v. 92, n. 4, p. 615-620, 2005.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 41-6, 2011.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 3, n. 27, p. 437-440, 2007.

CIPOLLA, B. J.; HAVOUIIS, R.; MOULINOUX, J. P. Polyamine reduced diet (PRD) nutrition therapy in hormone refractory prostate cancer patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 64, p. 363-368, 2010.

EFSA (European Food Safety Authority) 2011. **Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods**. EFSA Journal, v. 9, n. 10, p. 2392.

ELIASSEN, K. A.; REISTAD, R.; RISØEN, U.; RØNNING, H. F. Dietary polyamines. **Food Chemistry**, v.78, p.273-280, 2002.

ESSERS, A. J. A.; BOSVELD, M.; VAN DER GRIFT, R. M.; VORAGEN, A. G. J. Studies on the quantification of specific cyanogenes in cassava products and introduction of a new chromogen. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 63, n. 3, p. 287-296, 1993.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v. 4, p. 1-38, 2005.

KALAC̃, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

KALAC̃, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 219-230, 2005.

KALAC̃, P., ŠVECOVÁ, S., PELIKÁNOVÁ, T. Levels of biogenic amines in typical vegetable products. **Food Chemistry**, v. 77, p. 349–351, 2002.

LADERO, V.; CALLES-ENRÍQUEZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; ALVAREZ, M. A. Toxicological effects of dietary biogenic amines. **Current Nutrition & Food Science**, v. 6, p. 145-156, 2010.

LEHANE, L.; OLLEY, J. Histamine fish poisoning revisited. **International Journal of Food Microbiology**, v. 58, n. 1–2, p. 1-37, 2000.

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

MOINARD, C.; CYNOBER, L.; BANDT, J. P. Polyamines: metabolism and implications in human diseases. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 184–197, 2005.

NHASSICO, D., MUQUINGUE, H., CLIFF, J., CUMBANA, A., BRADBURY, J. H. Rising African cassava production, diseases due to high cyanide intake and control measures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 2043–2049, 2008.

OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. **Food Control**, n. 21, p. 306–312, 2010.

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 7.0. www.statsoft.com, 2004.

TAPINGKAE, W.; TANASUPAWAT, S.; PARKIN, K. L.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt fermented fishery products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 2, p. 92–99, 2010.

CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DA FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA NO PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS E CAROTENOIDES DURANTE A PRODUÇÃO DE TUCUPI

RESUMO

O tucupi é um molho típico da região amazônica do Brasil, produzido após a fermentação espontânea e a cocção da manipueira, que é um subproduto líquido obtido da produção de farinha de mandioca. A formação de aminos bioativas e suas alterações durante o processamento do tucupi foram investigadas pela primeira vez. Foi realizado também o monitoramento das alterações físico-químicas, parâmetros de cor instrumental e perfil de carotenoides. Quanto às mudanças no perfil dos carotenoides, o all-*trans*- β -caroteno foi o carotenoide majoritário, seguido pelos seus isômeros 9 e 13-*cis*, e esse perfil não foi alterado ao longo do processo. Espermidina (poliamina), putrescina, tiramina e histamina (aminas biogênicas) foram as aminos bioativas identificadas durante o processo de produção do tucupi, porém seus teores foram baixos (0,76-7,24 mg/L). A análise de componentes principais sugeriu três etapas distintas durante a produção do tucupi: a primeira foi caracterizada pela manipueira até 12 h de fermentação com os maiores valores de pH, açúcares totais e redutores, assim como o teor de amido total; a segunda etapa refere-se ao final do processo de fermentação (16 a 24 h), no qual as aminos biogênicas (histamina e tiramina) foram produzidas; e a terceira etapa caracterizada pelo produto final (tucupi), obtiveram os maiores valores de acidez, sólidos solúveis, poliaminas e tiramina. Logo, os resultados sugerem a necessidade de um controle na fermentação da manipueira para evitar ou minimizar a formação de aminos biogênicas.

Palavras-chave: Produto amazônico, manipueira, fermentação, *Manihot esculenta*, ACP, ACH.

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; LOPES, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; PENA, R. S. Influence of spontaneous fermentation of *manipueira* on bioactive amine and carotenoid profiles during *tucupi* production. **Food Research International**, v. 120, p. 209-216, 2019.

1 INTRODUÇÃO

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é a quinta cultura mais importante no mundo, com uma produção de aproximadamente 285 milhões de toneladas de raízes por ano (FAOSTAT, 2017). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017), a produção brasileira de mandioca em 2017 foi de 21 milhões toneladas, com destaque para a região Norte, onde é amplamente utilizada na dieta, principalmente como farinha de mandioca. No Brasil, a mandioca é utilizada na produção de vários alimentos. Na região amazônica, um produto alimentício chamado tucupi é um molho altamente apreciado e amplamente utilizado como ingrediente em vários pratos tradicionais da Amazônia brasileira. Atualmente, tem sido apreciado por grandes chefs na elaboração de diversos pratos, devido as características sensoriais exóticas.

O tucupi é um subproduto obtido do processamento da farinha de mandioca. As raízes são trituradas e prensadas, resultando em uma massa sólida para produção de farinha e uma fração líquida chamada manipueira para a produção de tucupi. Após ser submetida a uma fermentação espontânea e em seguida cocção, a manipueira é transformada em tucupi (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). Entretanto, apesar do amplo uso do tucupi, seu processamento ocorre de forma rudimentar, com a falta de informações tecnológicas sobre as principais etapas da produção, desde a fermentação da manipueira até o produto final.

Estudos sobre a qualidade do tucupi, são escassos. A principais informações disponíveis estão relacionadas as alterações no pH, acidez total, sólidos solúveis, qualidade microbiana e teor de cianeto total e livre (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; CHISTÉ; COHEN, 2011; CAMPOS et al., 2016; CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016; CAMPOS et al., 2017). A principal preocupação associada ao ácido cianídrico (HCN) está no fato de que as raízes da mandioca contêm glicosídeos cianogênicos com potencial para liberar esse composto durante o processamento (SHIGAKI, 2015). De fato, foi relatado que o tucupi apresenta variações no conteúdo de cianeto total (55,58 a 157,17 mgHCN/kg) e livre (9,47 a 46,86 mgHCN/kg) (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). Campos et al. (2016) e Campos, Carvalho e Mattietto (2016) observaram teores de cianeto total e livre abaixo dos valores reportados por Chisté, Cohen e Oliveira (2007), o que mostra a falta de padronização para o tucupi comercializado. Esses estudos enfatizaram a importância de controlar a produção de tucupi para garantir sua segurança e qualidade.

Em produtos alimentícios, especialmente os fermentados, o perfil e os teores de amins bioativas podem estar relacionados à qualidade e segurança durante a produção e armazenamento de alimentos (EFSA, 2011; MARTUSCELLI et al., 2013; BRITO et al., 2017). É conhecido que as amins bioativas exibem papéis relevantes na saúde humana. O termo amins bioativas ou amins biologicamente ativas refere-se a poliaminas e também amins biogênicas. As poliaminas espermidina e espermina estão envolvidas em várias funções celulares, incluindo a estabilização do DNA, regulação da expressão gênica e proliferação celular. Portanto, eles desempenham papéis importantes no sistema imunológico, trato digestivo e de neuroproteção (RAMANI; BANDT; CYNOBER, 2014; SHARMA; KUMAR; DESHMUKH, 2018).

As amins biogênicas são produzidas e se acumulam durante os processos de fermentação, principalmente através da descarboxilação de aminoácidos pelas enzimas microbianas. Geralmente estão associados a atividades neuro e vasoativas e podem resultar em efeitos adversos na saúde humana. A histamina e a tiramina são as amins mais comumente associadas a intoxicações alimentares (GLÓRIA, 2005; EFSA, 2011; ORDONEZ et al., 2013; GARDINI, et al., 2016).

Alguns estudos evidenciam a predominância de bactérias lácticas em produtos fermentados à base de mandioca (LACERDA et al., 2005; OGUNTOYINBO; DODD, 2010), e esses micro-organismos têm a capacidade de produzir amins biogênicas (LINARES et al., 2011). O tucupi é considerado um meio propício para a produção de amins biogênicas, logo os níveis e teores de amins podem ser utilizados como índices de qualidade e segurança (MARTUSCELLI et al., 2013). Nenhuma informação foi elucidada sobre as amins no tucupi, diante disso, o conhecimento dos níveis destes compostos neste produto é importante do ponto de vista funcional, toxicológico e do controle de qualidade.

Informações sobre as propriedades funcionais do tucupi, ainda são escassas. As raízes de mandioca utilizadas na produção de tucupi possuem a coloração amarela, logo é provável que os carotenoides estejam presentes. Os principais carotenoides encontrados nas raízes da mandioca são o *all-trans*- β -caroteno e os isômeros 13 e 9-*cis* (KIMURA et al., 2007; FAILLA et al., 2012;) que são carotenoides provitamina A. A ingestão de alimentos contendo carotenoides tem sido associada a redução da incidência de câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas degenerativas (RAO; RAO, 2007; KOKO et al., 2014). Portanto, o consumo de raízes de mandioca ou seus derivados pode representar um acesso de baixo custo

a essa importante vitamina para populações economicamente desfavorecidas. No entanto, a influência da fermentação da manipueira durante a produção de tucupi no perfil de carotenoides ainda não foi relatado na literatura.

Os níveis de carotenoides e aminas bioativas no tucupi, apresentam uma relevância para determinar os índices de qualidade e segurança, logo o objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência e o perfil destes compostos durante a fermentação da manipueira para produção de tucupi e os resultados foram avaliados por duas técnicas exploratórias multivariadas, visando a caracterização das principais etapas do processamento deste produto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os padrões das aminas bioativas foram espermidina (EPD, tricloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), agmatina (AGM, sal sulfato), cadaverina (CAD, dicloridrato), serotonina (SRT, 5-hidroxitriptamina), tiramina (TIM, cloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) assim como all-*trans*- β -caroteno, metanol e éter terci-butilometílico (grau HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Éter de petróleo, éter etílico e acetona foram de grau analítico (Synth, São Paulo, SP, Brasil). A água ultrapura pertence ao Sistema Milli-Q (Millipore Corp., Milford, MA, EUA). As fases móveis e as amostras para análise por HPLC foram filtradas através de membranas de 0,45 μ m Millipore Corp. (Milford, MA, EUA) e filtro de seringa da Filtrilo (Colombo, PR, Brasil), respectivamente.

2.2 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizadas raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (60 kg) de variedades de polpa amarela, comumente usadas na produção de farinha de mandioca, conhecida como “brava” (acima de 100 mg HCN/kg de raiz fresca sem casca) (CAGNON; CEREDA; PANTAROTTO, 2002) foram adquiridos em triplicata (n = 3) no mercado Ver-O-Peso localizado em Belém, Pará, Brasil (latitude 01° 27' 21" e longitude 48° 30' 16"). Essas raízes foram coletadas e processadas em abril, maio e junho de 2016 (20 kg, cada lote).

2.3 OBTENÇÃO DO TUCUPI

Para obtenção do tucupi, as raízes foram lavadas, descascadas com facas de aço inoxidável e lavadas novamente. As raízes descascadas foram trituradas e a massa obtida (15 kg por lote) foi prensada manualmente para extração da fração líquida - manipueira (5 L). Essas etapas (descascamento, trituração e prensagem) foram realizadas no próprio local de compra das amostras, utilizando o mesmo equipamento e condições de processamento dos produtores de tucupi do mercado Ver-o-Peso. A manipueira extraída foi transportada para o laboratório, em embalagens plásticas (5 L) a temperatura ambiente. O transporte da amostra do mercado para o laboratório durou, em média, 30 min.

No laboratório, a manipueira (5 L) foi colocada em um recipiente de aço inoxidável, previamente higienizado com solução de hipoclorito de sódio (100 mg/L) e realizado um enxágue novamente com água potável. A manipueira então foi submetida a um processo de fermentação espontânea 30 °C (temperatura ambiente da região) durante 24 h em estufa (Q-316 M5, Quimis, Brasil). Durante a fermentação, alíquotas de 250 mL foram retiradas para as determinações analíticas, em intervalos de 4 horas, até o final da fermentação (24 h). Após a fermentação, a manipueira foi submetida à cocção a ≈ 100 °C por 10 minutos para obter o tucupi. As definições das condições de processo para a produção de tucupi foram baseadas no estudo de Chisté e Cohen (2011). O tucupi foi obtido de três diferentes lotes de manipueira (n = 3).

Todas as análises foram realizadas em triplicata (n = 3) imediatamente após a coleta das amostras dos nove pontos do processamento do tucupi: mandioca triturada (1° ponto), na manipueira recém-extraída (2° ponto) e manipueira após 4, 8, 12, 16, 20 e 24 h de fermentação (3° ao 8° ponto); e o produto fermentado após cocção (tucupi) (9° ponto).

2.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

2.4.1 Caracterização físico-química durante a produção de tucupi

O teor de umidade (g/100 g) foi determinado por secagem em estufa a 105 °C, a acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,1 N (resultados expressos em g/100 mL de ácido láctico), os valores de pH foram obtidos por leitura direta com potenciômetro, amido total (g/100 g), e os açúcares redutores e totais (g/100 g) foram determinados pelo método Lane-Eynon (AOAC, 1997). Os teores de sólidos solúveis foram determinados por medida direta na amostra, em um refratômetro digital (Q767B0, QUIMIS, Brasil) e os valores expressos em °Brix. Os

parâmetros de cor foram medidos em um colorímetro (CR-400, Konica Minolta Sensing, Japão), seguindo as seguintes especificações: modo de reflectância, utilizando iluminação difusa, iluminante C e os ângulos de 0° e de 2°, referentes aos ângulos de detecção e do observador, respectivamente, e fonte D65. Os resultados foram expressos como coordenadas de cor no espaço CIELAB ($L^*a^*b^*$), sendo L^* (luminosidade) e as coordenadas a^* (componente vermelho - verde), b^* (componente amarelo - azul). Os valores *Chroma* (C_{ab}^*) e ângulo hue (h_{ab}°) foram calculados de acordo com as equações (1) e (2):

$$C_{ab}^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (1)$$

$$h_{ab}^\circ = 180 + \arctang\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (2)$$

Quando $[-a^*, +b^*]$ (quadrante II)

2.4.2 Análise de carotenoides

A extração dos carotenoides da mandioca (10 g) e tucupi (10 mL) foi realizado de acordo com Rodriguez-Amaya e Kimura (2004). Após extração exaustiva, uma alíquota do extrato de carotenoides foi evaporado sob fluxo de N_2 e redissolvido em éter metil terc-butílico (MTBE) para análise de HPLC.

A análise de HPLC-DAD foi realizada num HPLC Agilent (Agilent, Modelo 1260 Infinity, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma bomba quaternária (G1311C), uma válvula de injeção Rheodyne com um loop de 20 μ L, um forno (G1316A) e um detector DAD (G1328C). Os carotenoides foram separados em uma coluna C30 YMC (5 μ m, 250 x 4,6 mm), a 29°C, fluxo de 0,9 mL/min, utilizando fase móvel com gradiente linear composto de MeOH: MTBE na proporção de 95:5 a 70:30 em 30 min, seguido de 50:50 em 20 min (CHISTÉ; MERCADANTE, 2012). Os carotenoides foram identificados de acordo com a ordem de eluição na coluna C30 e co-cromatografia com os padrões. Os carotenoides foram quantificados a 450 nm, utilizando uma curva analítica de 6 pontos (em duplicata) para o all-*trans*- β -caroteno (1,56 - 50 μ g/mL) ($r^2 \geq 0,98$). O teor de carotenoides (n=3, base úmida) foi expresso em μ g/mL de manipueira e tucupi.

A Academia Nacional de Ciências, Instituto de Medicina (NAS-IOM) utiliza um fator de conversão para calcular o valor da vitamina A, onde 12 μ g de all-*trans*- β -caroteno na dieta correspondente a 1 μ g de equivalente de atividade de retinol (RAE) e a atividade utilizada foi

de 100% para o all-*trans*- β -caroteno e 50% para cada isômero *cis* de β -caroteno (NAS-IOM, 2001).

2.4.3 Determinação de aminas bioativas

As aminas foram extraídas da mandioca (5 g) com 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%, homogeneizadas em agitador por 5 min, seguido de centrifugação (Jouan Thermo MR23i, França) a 11180 x *g* a 4 °C, por 10 min. Este processo foi repetido por mais duas vezes. Os sobrenadantes foram combinados, em balão volumétrico, e filtrado em papel filtro qualitativo e em membranas de 0,45 μ m (BRITO et al., 2017). A manipueira e o tucupi (5 mL) foram centrifugados e filtrados em papel filtro qualitativo e em membranas de 0,45 μ m.

Nove aminas bioativas foram pesquisadas, sendo: espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina. As aminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por pareamento de íons, em coluna de fase reversa. Um cromatógrafo modelo LC-10CE, com câmara de mistura à alta pressão, conjunto de lavagem automática de pistão e injetor automático modelo SIL-10AD VP (Shimadzu, Kioto, Japão) foi utilizado e as aminas foram separadas utilizando coluna Novapak C18 (3,9×300 mm, 4 μ m, 60 Å, Waters, MA, USA) e um gradiente de eluição de acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 15 mM, com pH ajustado para 4,9 com ácido acético glacial (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B) (BRITO et al., 2017).

A identificação das aminas foi feita por comparação entre os tempos de retenção e a coeluição com padrões. A quantificação foi feita por fluorimetria (340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente) após derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído, utilizando curvas analíticas (duplicata) para cada amina ($r^2 \geq 0,99$). O conteúdo de aminas bioativas (n = 3, base úmida) foram expressos em mg/L de amostra.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados analíticos foram submetidos à análise estatística, empregando análise de variância (ANOVA) a 5% de significância, teste complementar de comparação de médias de Tukey ($p \leq 0,05$). Duas técnicas exploratórias multivariadas, Análise de Componentes Principais (ACP) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (ACH), foram aplicadas para avaliar a produção de tucupi usando o Statística 7.0. Para a ACP, pH, acidez, açúcares redutores, açúcares totais, amido total, cor, L*, carotenoides e aminas bioativas foram usadas como variáveis ativas, na obtenção dos componentes principais e como variáveis suplementares (coordenadas cromáticas a* e b*) foram projetadas no espaço. A ACP foi realizada utilizando matriz covariância. Para ACH, a árvore hierárquica foi obtida considerando as mesmas variáveis ativas aplicadas a ACP e as etapas de processamento da produção de tucupi foram unidas pelo método de Ward's como regra de ligação, considerando as distâncias euclidianas como o coeficiente de similaridade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. MUDANÇAS NAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

As raízes de mandioca utilizadas para extração de manipueira nos três experimentos da produção de tucupi apresentaram composição química semelhante ao reportado na literatura (LADEIRA; SOUZA; PENA, 2013; KOKO et al., 2014) quanto aos seguintes aspectos: teor de umidade ($70,68 \pm 3,38$ g/100 g), pH ($5,5 \pm 0,3$), acidez total ($0,24 \pm 0,05$ g/100 g ácido láctico), açúcares redutores ($0,93 \pm 0,41$ g/100 g), açúcares totais ($2,20$ e $1,13$ g/100 g), sólidos solúveis ($7,24 \pm 0,14$ °Brix) e amido total ($20,42 \pm 5,60$ g/100 g). As variações observadas nesses parâmetros são aceitáveis, pois dependem do grau de maturação da raiz, condições climáticas, práticas de cultivo, entre outros fatores (FASUYI; ALETOR, 2005).

As mudanças nas características físico-químicas e nos parâmetros de cor durante a produção de tucupi estão na Tabela 1. Durante a fermentação espontânea as principais mudanças observadas são o aumento significativo na acidez e diminuição nos valores de pH, típico da fermentação da manipueira para a produção de tucupi, visto que o aumento da acidez pode auxiliar na preservação de produtos fermentados (CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007; CHISTÉ; COHEN, 2011; CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016). O teor de açúcares totais reduziram em aproximadamente 64% dos níveis iniciais após 24 horas de fermentação, bem como foi observado um aumento inicial nos açúcares redutores, possivelmente devido à

hidrólise de açúcares não-redutores, favorecida pela redução do pH e aumento da acidez do meio (FERREIRA et al., 2013).

Não foram observadas mudanças no teor de sólidos solúveis, ao longo da fermentação da manipueira, diferentemente do comportamento observado no teor de açúcares totais, isto pode ser atribuído à produção de substâncias solúveis, como ácidos orgânicos, durante a fermentação (CHISTÉ; COHEN, 2011; CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016; CAMPOS et al., 2017). A produção destes ácidos orgânicos durante este processo é atribuída à hidrólise de carboidratos por micro-organismos fermentativos, como as bactérias lácticas (OGUNTOYINBO; DODD, 2010; FAYEMI; OJOKOH, 2014).

O elevado teor de amido observado na manipueira antes da fermentação, quando comparado aos valores durante a fermentação (Tabela 1), é atribuído ao fato do amido estar suspenso na manipueira durante a homogeneização da amostra, enquanto que na coleta das amostras durante a fermentação, o amido foi decantado. Durante a coleta, não foi realizada homogeneização, pois este procedimento não é comum durante as fermentações realizadas pelos produtores de tucupi. Além disso, a homogeneização poderia interferir no processo de fermentação devido à aeração da manipueira.

Durante a extração da manipueira, a maior parte do amido contido na massa de mandioca é carregado com o líquido, pois a filtração é feita em malhas com aberturas que não são suficientes para reter as partículas de amido (9 - 17 μm) (LEONEL, 2007; LADEIRA et al., 2013). Neste estudo, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) no teor de amido durante o processo de fermentação. Assim sendo, a separação do amido no início do processo, a qual envolveria uma etapa a mais no processamento, não é necessária; mas caso seja desejável, essa separação pode ser realizada antes ou após a fermentação, sem interferir nas características do produto, uma vez que o amido não está contribuindo para o processo fermentativo.

A cor amarela da manipueira (Tabela 1), caracterizada pelos valores a^* e b^* no segundo quadrante ($-a, +b$), não se alterou ($p > 0,05$) durante e nem após a fermentação, assim como os demais parâmetros de cor, incluindo L^* (luminosidade) e C_{ab} (croma). Estes resultados sugerem que os carotenoides permaneceram inalterados (MELÉNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2006).

Tabela 1. Caracterização físico-química e parâmetros de cor durante a produção de tucupi.

Propriedades	Manipueira	Tempo de fermentação (h)*						Após cocção (Tucupi)
		4	8	12	16	20	24	
pH	6,01 ± 0,28 ^a	5,86 ± 0,22 ^a	5,20 ± 0,12 ^b	4,50 ± 0,06 ^c	4,20 ± 0,06 ^{cd}	4,07 ± 0,07 ^d	3,97 ± 0,07 ^d	4,10 ± 0,11 ^d
Acidez (g ácido láctico/100 g)	0,02 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,01 ^b	0,28 ± 0,04 ^b	0,68 ± 0,24 ^{ab}	0,89 ± 0,35 ^{ab}	1,16 ± 0,49 ^a	1,33 ± 0,39 ^a	1,27 ± 0,42 ^a
Sólidos solúveis (°Brix)	6,90 ± 1,40 ^b	6,82 ± 1,49 ^b	6,61 ± 1,26 ^b	6,31 ± 1,28 ^b	6,00 ± 1,31 ^b	6,10 ± 1,19 ^b	5,94 ± 1,26 ^b	9,34 ± 3,64 ^a
Açúcares totais (g/100 g)	3,58 ± 0,37 ^a	3,50 ± 0,35 ^a	3,50 ± 0,12 ^a	2,70 ± 0,24 ^{ab}	2,08 ± 0,39 ^{bc}	1,62 ± 0,25 ^c	1,29 ± 0,21 ^c	1,23 ± 0,55 ^c
Açúcares redutores (g/100 g)	1,17 ± 0,22 ^{ab}	1,37 ± 0,28 ^{ab}	1,46 ± 0,31 ^{ab}	1,63 ± 0,32 ^a	1,55 ± 0,16 ^{ab}	1,34 ± 0,10 ^{ab}	0,99 ± 0,18 ^b	1,34 ± 0,06 ^{ab}
Amido total (g/100 g)	13,05 ± 1,86 ^a	2,92 ± 0,54 ^b	2,34 ± 1,05 ^b	2,23 ± 1,21 ^b	2,50 ± 0,65 ^b	2,37 ± 1,11 ^b	2,63 ± 1,62 ^b	3,97 ± 1,88 ^b
Parâmetros de cor								
<i>L</i> *	37,51 ± 3,20 ^a	34,32 ± 3,53 ^a	29,01 ± 3,50 ^a	30,70 ± 2,25 ^a	32,64 ± 4,14 ^a	33,53 ± 1,90 ^a	32,76 ± 1,46 ^a	30,37 ± 0,73 ^a
<i>a</i> *	-3,77 ± 0,99 ^a	-3,99 ± 1,19 ^a	-4,22 ± 1,29 ^a	-4,50 ± 1,33 ^a	-4,83 ± 1,40 ^a	-4,55 ± 1,69 ^a	-4,29 ± 0,94 ^a	-2,80 ± 0,55 ^a
<i>b</i> *	16,13 ± 5,74 ^a	13,59 ± 1,62 ^a	14,98 ± 1,09 ^a	16,39 ± 0,14 ^a	17,23 ± 1,20 ^a	20,62 ± 1,93 ^a	20,13 ± 6,35 ^a	15,71 ± 0,23 ^a
<i>C</i> _{ab} *	16,46 ± 5,68 ^a	14,02 ± 1,80 ^a	15,39 ± 1,22 ^a	16,82 ± 0,26 ^a	17,71 ± 1,33 ^a	21,00 ± 2,22 ^a	20,49 ± 6,29 ^a	15,95 ± 0,10 ^a
<i>h</i> _{ab} *	100,85 ± 2,79 ^a	103,56 ± 1,68 ^a	102,42 ± 1,71 ^a	102,34 ± 1,55 ^a	103,18 ± 1,03 ^a	100,71 ± 2,74 ^a	100,19 ± 2,30 ^a	98,37 ± 3,15 ^a

*Média (± desvio padrão) com letras diferentes na mesma linha são diferentes estatisticamente ($p \leq 0,05$; Teste Tukey).

3.2. ALTERAÇÕES NO TEOR DE CAROTENOIDES

O cromatograma obtido da análise de carotenoides HPLC-DAD das raízes de mandioca utilizadas na produção de tucupi mostrou a presença de três carotenos: 9-*cis*- β -caroteno, all-*trans*- β -caroteno e 13-*cis*- β -caroteno, sendo o all-*trans*- β -caroteno o composto majoritário (Figura 1). Esse mesmo perfil de carotenoides em raízes de mandioca já foi reportado na literatura (RODRIGUEZ-AMAYA; KIMURA, 2004; FAILLA et al., 2012).

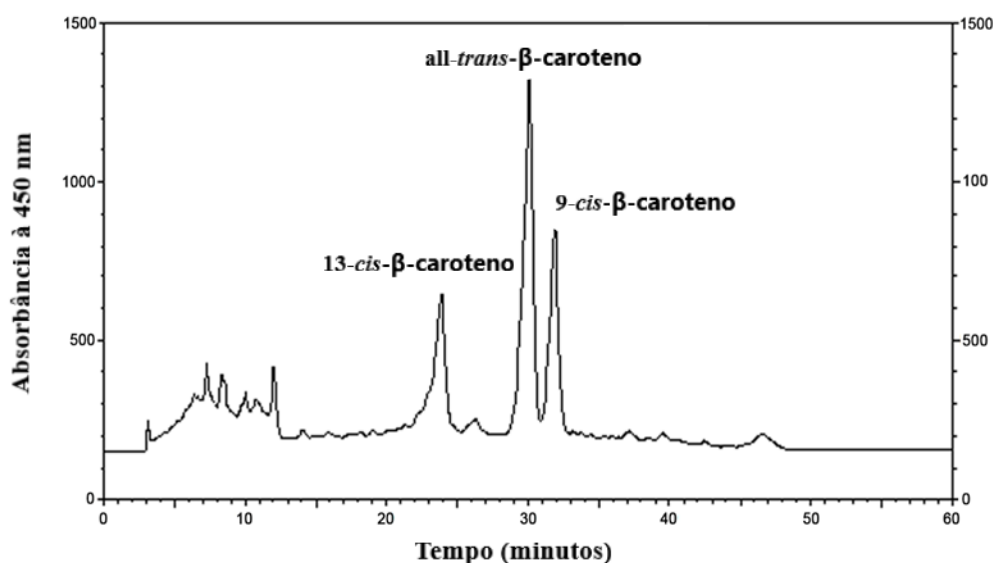


Figura 1. Cromatograma obtido do HPLC-DAD a 450 nm dos carotenoides extraídos das raízes de mandioca utilizadas para a produção de tucupi.

Durante todo o processo de fermentação da manipueira, e também após a cocção durante a produção do tucupi, o perfil cromatográfico permaneceu o mesmo, e nenhum outro composto associado à degradação dos carotenoides foi observado. Portanto, esta é a primeira vez que o perfil de carotenoides é monitorado e quantificado (Figura 2) para caracterizar as suas mudanças durante a produção do tucupi.

Na primeira etapa da produção do tucupi, a manipueira foi submetida a uma fermentação espontânea e após 24 h, a concentração de all-*trans*- β -caroteno permaneceu constante (1,03 - 1,65 $\mu\text{g/mL}$), assim como nos isômeros 9-*cis* (0,53 - 0,79 $\mu\text{g/mL}$) e 13-*cis* (0,30 - 0,38 $\mu\text{g/mL}$). O teste estatístico utilizado (Tukey HSD) não evidenciou diferenças significativas no conteúdo de carotenoides ($p > 0,05$) durante as etapas de processamento. No entanto, foi observado após a cocção um leve aumento em seus níveis. Essas pequenas mudanças observadas, possivelmente se devem à concentração do produto, devido a remoção parcial da água que ocorre durante esse

processo, uma vez que para obter o tucupi, a manipueira fermentada precisa ser submetida à cocção por 10 min / $\approx 100^{\circ}\text{C}$ (CHISTÉ; COHEN, 2011).

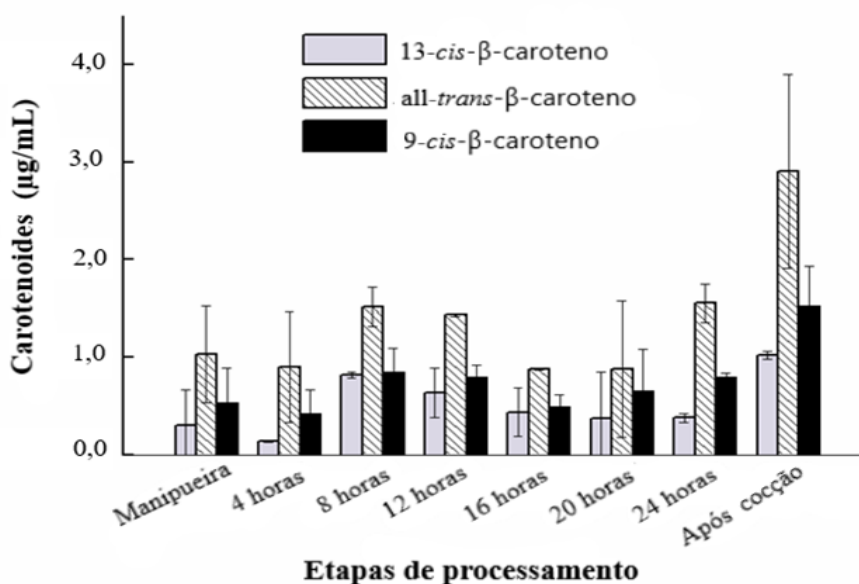


Figura 2. Alterações dos carotenoides durante a produção de tucupi. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os teores de 9-*cis*-β-caroteno, all-*trans*-β-caroteno e 13-*cis*-β-caroteno durante o processo de produção.

Na preparação do fufu (massa de mandioca fermentada seguida de cocção), foi possível observar a isomerização *trans-cis* do β-caroteno (THAKKAR et al., 2009). Na produção do gari (produto fermentado da mandioca, semelhante a farinha d'água, amplamente consumido em muitos países da África Ocidental), estes autores observaram uma perda mínima de β-caroteno (8%) após 3 dias de fermentação à temperatura ambiente. Porém, Chávez et al. (2007) relataram que uma fermentação mais longa (7 dias) do gari, resulta numa perda de β-caroteno em torno de 66%.

Em relação a atividade de provitamina A, o β-caroteno e seus *cis*-isômeros são os compostos responsáveis por esta atividade na manipueira e no tucupi, pois possuem pelo menos um anel β-ionona não-substituído com uma cadeia lateral poliênica de no mínimo de 11 carbonos. Como observado para os teores de carotenoides, a atividade provitamina A (expressa como equivalente à atividade do retinol, RAE) foi semelhante durante as etapas de processamento do tucupi, com valores variando de 0,12 μg RAE/mL (manipueira) a 0,18 μg RAE/mL (após 24 h de fermentação), com um leve aumento (0,35 μg RAE/mL) após a cocção (tucupi); também devido à concentração do produto.

3.3. ALTERAÇÕES NAS AMINAS BIOATIVAS

Esta é a primeira pesquisa na identificação e quantificação de aminas bioativas no tucupi. Entre as nove aminas bioativas investigadas somente 4 (quatro) foram detectadas durante a produção do tucupi, sendo: a poliamina espermidina, e a aminas biogênicas tiramina, putrescina, histamina (Tabela 2). A manipueira foi caracterizada pela presença apenas da espermidina e putrescina. Este resultado é semelhante ao reportado para aminas bioativas em mandioca cozida (GLÓRIA, 2005), sendo identificadas apenas a espermidina (0,16 a 0,27 mg/100 g) e a putrescina (0,08 a 0,61 mg/100 g).

Ao longo da fermentação, não houve mudança significativa nos níveis de espermidina e putrescina ($p > 0,05$). No entanto, a presença de tiramina e histamina foi detectada a partir de 16 h de fermentação até o final da produção de tucupi e os níveis de histamina permaneceram constantes ($p \leq 0,05$) apesar da pequena redução observada após a cocção; enquanto que os níveis de tiramina aumentaram significativamente ($p \leq 0,05$). A presença da espermidina e da putrescina é esperada nos alimentos, pois são inerentes às plantas e a todos os organismos vivos. A espermidina está envolvida no crescimento, renovação e metabolismo celular; considerando o fato que a putrescina é um precursor obrigatório na formação de poliaminas (KALÁČ; KRAUSOVÁ, 2005; KALÁČ, 2014).

Segundo a literatura, existem diversos micro-organismos envolvidos no início da fermentação das raízes de mandioca, entre eles, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Clostridium*, *Propionibacterium* e *Bacillus* sp. (LACERDA et al., 2005; OGUNTOYINBO; DODD, 2010). No entanto, à medida que a fermentação avança, o *Lactobacillus* se torna predominante, incluindo *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. manihotvorans* (LACERDA et al., 2005; ELIJAH et al., 2014). Estas bactérias são capazes de produzir tiramina e a histamina, como uma forma de proteção contra o meio ácido (diminuição do pH), o que pode ser prejudicial à sobrevivência das bactérias (GLÓRIA, 2005).

Alimentos fermentados, possuem condições favoráveis para a formação de aminas biogênicas, tanto pela disponibilidade de aminoácidos livres quanto pela presença de micro-organismos com atividade descarboxilase (EFSA, 2011). Portanto, essas bactérias possuem a capacidade de descarboxilar aminoácidos, tais como a tirosina e a histidina, para formar tiramina e histamina, respectivamente, que podem tamponar o pH, garantindo assim sobrevivência das bactérias (GLÓRIA, 2005; O'SULLIVAN et al., 2015).

Tabela 2. Aminas Bioativas (mg/L) durante a produção de tucupi.

Aminas Bioativas	Manipueira	Tempo de Fermentação (h)						Após cocção (Tucupi)
		4	8	12	16	20	24	
Poliaminas								
Espermidina	3,89 ± 1,34 ^a	3,12 ± 0,23 ^a	4,37 ± 1,68 ^a	4,43 ± 1,11 ^a	5,43 ± 1,64 ^a	4,64 ± 2,35 ^a	5,10 ± 2,16 ^a	7,24 ± 1,80 ^a
Aminas Biogênicas								
Putrescina	3,88 ± 1,00 ^a	3,42 ± 0,01 ^a	3,66 ± 1,36 ^a	3,20 ± 0,85 ^a	4,18 ± 1,04 ^a	3,95 ± 1,42 ^a	4,20 ± 1,05 ^a	5,40 ± 1,71 ^a
Histamina	nd	nd	nd	nd	0,97 ± 0,67 ^a	2,02 ± 1,50 ^a	4,08 ± 2,91 ^a	2,26 ± 1,68 ^a
Tiramina	nd	nd	nd	nd	0,76 ± 0,16 ^d	2,54 ± 0,29 ^c	5,48 ± 0,32 ^b	6,60 ± 0,23 ^a

*Média (± desvio padrão) com letras diferentes na mesma linha são diferentes estatisticamente ($p \leq 0,05$; Teste Tukey); nd=não detectado (limite de detecção – 0,4 mg/L).

A presença de tiramina, histamina e putrescina podem ser um indicativo de qualidade em produtos fermentados, pois essas aminas são resultantes de matéria-prima de baixa qualidade e/ou condições higiênico-sanitárias inadequadas (GLÓRIA, 2005; MOHEDANO et al., 2015). Nas primeiras 12 horas de fermentação, somente a espermidina e a putrescina foram detectadas (Tabela 2). No entanto, a partir de 16 h de fermentação até o fim do processo, a contribuição da histamina e da tiramina para os níveis totais tornou-se evidente. Além disso, a cocção não reduziu o conteúdo das aminas biogênicas, o que pode ser atribuído a sua alta estabilidade a processos térmicos (GONZAGA et al., 2009; TAPINGKAE et al., 2010).

Este fato representa uma preocupação, uma vez que essas aminas biogênicas têm sido envolvidas em casos de intoxicação alimentar (EFSA, 2011). Logo, há uma necessidade de entender como e porquê essas aminas são formadas, uma vez que sua formação deve ser evitada. Os níveis de histamina presentes no tucupi foram abaixo dos limites estabelecidos para peixes 100 mg/kg (GLÓRIA, 2005).

No entanto, de acordo com EFSA (2011), os níveis de histamina para causar efeitos adversos a saúde são: 50 mg de histamina para indivíduos saudáveis, mas esse limite pode ser reduzido caso haja casos de intolerância à histamina; e para tiramina são 600 mg de tiramina para indivíduos saudáveis que não tomam medicamentos inibidores da monoamino oxidase (MAOI), porém 50 mg para aqueles que tomam medicamentos da terceira geração MAOI e 6 mg para aqueles que tomam medicamentos MAOI clássicos. Portanto, os níveis de histamina (2,26 mg/kg) e tiramina (6,60 mg/kg) observados são preocupantes para indivíduos com intolerância à histamina e também para indivíduos que consomem medicamentos MAOI clássicos.

Os limites toxicológicos para as aminas biogênicas em alimentos são difíceis de serem estabelecidos, devido às grandes variações intrínsecas intra e interindividuais na sensibilidade de cada indivíduo ou à interferência concomitante de inibidores do sistema de detoxificação, como medicamentos antidepressivos ou álcool (SPANNO et al., 2010). Além disso, a presença de outras aminas biogênicas, como a putrescina e a cadaverina, pode aumentar a toxicidade da histamina (EMBORG; DALGAARD, 2006). A presença de histamina em um alimento, dependendo da sua concentração, pode causar sintomas como dor de cabeça, secreção nasal, broncoespasmo, taquicardia, hipotensão, edema (pálpebras), urticária, prurido, rubor e asma. A intoxicação por tiramina pode resultar em enxaquecas e crises hipertensivas (EFSA, 2011).

Chisté, Cohen e Oliveira (2007) e Campos et al. (2016) avaliaram tucupis comerciais e concluíram que não há padronização no processo de produção deste produto. Foram observadas grandes variações nas características físico-químicas e microbiológicas, indicando deficiências durante o processamento. Fatores como condições sanitárias precárias das unidades de produção podem afetar os padrões de qualidade e segurança alimentar. Portanto, a implementação de Boas Práticas de Fabricação e Manipulação durante a produção de tucupi juntamente com identificação e quantificação de amins biogênicas seriam relevantes para garantir a qualidade e segurança do produto.

3.4. CLASSIFICAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DURANTE A PRODUÇÃO DE TUCUPI POR ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA

Na análise por componentes principais (ACP), os dois primeiros componentes principais, juntos, explicam aproximadamente $\approx 77\%$ da variância dos dados, levando em consideração, as características físico-químicas (pH, acidez total, açúcar total e redutor e amido total), parâmetros de cor (L^* , C_{ab}^* , h_{ab}°), teores de carotenoides e amins bioativas (Figura 3). Na Figura 3a, foram observadas correlações negativas entre o pH e o conteúdo de tiramina ($r = -0,66$), histamina ($r = -0,73$), putrescina ($r = -0,48$) e espermidina ($r = -0,72$). Essas correlações estão de acordo com a afirmativa reportada por Glória (2005), uma vez que em meio ácido, a produção de amins é estimulada como mecanismo de proteção de bactérias ao ambiente ácido. De fato, os níveis de pH observados neste grupo (4,5 a 3,97) (Tabela 1) são altamente favoráveis à produção de amins biogênicas.

Ao agrupar os diferentes estágios da produção de tucupi (Figura 3b), conforme evidenciado pela análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) (Figura 3c) baseado em semelhanças, o primeiro grupo foi formado pela manipueira e as amostras obtidas após 4 h, 8 h e 12 h de fermentação devido aos altos valores de pH, açúcares totais e redutores e amido total neste estágio de processamento, como era esperado. O segundo grupo incluiu manipueira após 16 h, 20 h e 24 h de fermentação, as quais foram caracterizadas pela formação de tiramina e histamina (amins biogênicas), bem como os maiores valores de croma (C_{ab}^*) e acidez.

Finalmente, o último grupo, composto pela etapa final da produção de tucupi (manipueira após 24 h de fermentação e submetida à cocção) foi discriminada das demais amostras (Figura 3b e Figura 3c) devido aos maiores teores de sólidos solúveis, espermidina, putrescina e carotenoides (13-*cis*- β -caroteno, all-*trans*- β -caroteno e 9-*cis*- β -caroteno).

A análise por componentes principais (ACP) classificou o processo de produção do tucupi em diferentes estágios de acordo com os parâmetros avaliados (características físico-químicas, amins bioativas e carotenoides). A separação em grupos permite identificar qual grupo deve ter um maior controle, principalmente em relação às amins biogênicas e aos carotenoides, que são o foco deste trabalho, devido ao interesse pela nutrição e saúde humana

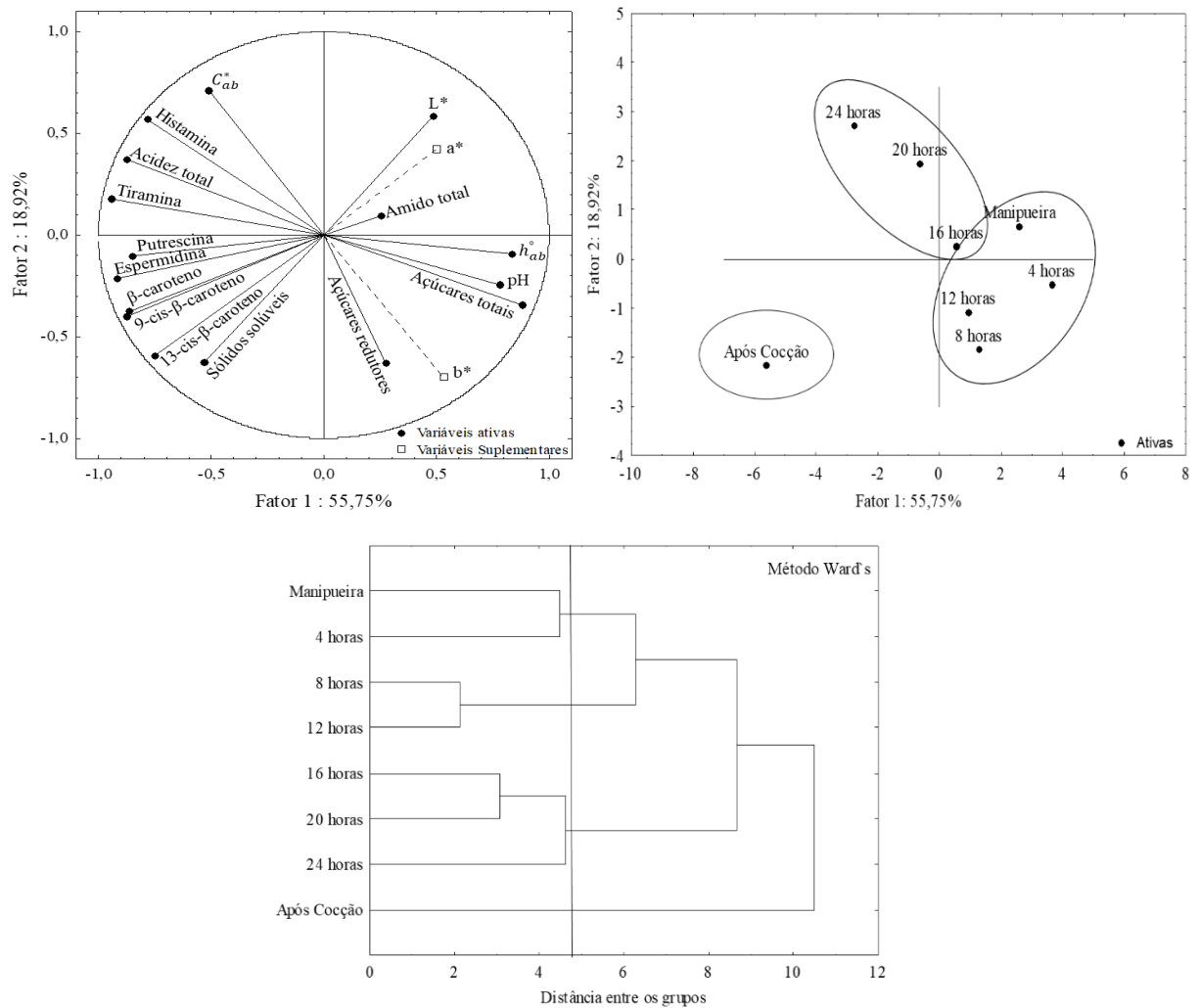


Figura 3. Classificação dos diferentes estágios de produção de tucupi afetados pelas características físico-químicas, teores de carotenoides e amins bioativas. (a) Projecção das variáveis por Análise de Componentes Principais (ACP); e (b) Dispersão das amostras dos diferentes estágios de produção de tucupi pelo PCA (c) Dendrograma pela análise.

4 CONCLUSÃO

Pela primeira vez, foi avaliado o perfil de amins bioativas e carotenoides durante a produção de tucupi. Os perfis de *all-trans*- β -caroteno, *9-cis*- β -caroteno e *13-cis*- β -caroteno foram monitorados nas raízes de mandioca e durante a produção de tucupi, e nenhuma alteração notável foi observada. Uma poliamina e uma amina biogênica foram identificadas na manipueira (espermidina e putrescina) e duas amins biogênicas foram formadas durante o processo de fermentação do tucupi (tiramina e histamina). A análise por componentes principais evidenciou três momentos distintos na produção do tucupi: o primeiro consiste na manipueira até 12 h de fermentação, o segundo refere-se ao final do processo de fermentação (16 a 24 h) e finalmente o terceiro momento refere-se ao produto após cocção (tucupi). Estes resultados sugerem a necessidade de um controle mais efetivo nas condições higiênico-sanitárias durante a fermentação da manipueira, a fim de produzir um tucupi com baixos níveis de amins biogênicas com intuito de garantir um produto com alta qualidade. Com base nesses resultados, são necessários estudos sobre a identificação molecular dos micro-organismos responsáveis pela fermentação espontânea da manipueira, para obtenção do tucupi. Tal conhecimento, irá permitir o desenvolvimento de uma cultura starter adequada para a sua produção com qualidade e segurança.

5 REFERÊNCIAS

- AOAC (1997). Association of official analytical chemists. Official methods of analysis of the AOAC international.
- BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S.; GLÓRIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, n.1, p. 484–490, 2017.
- CAGNON, J. R., CEREDA, M. P., PANTAROTTO, S. **Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas**. 2, São Paulo: Fundacao Cargill, p. 13–37, 2002.
- CAMPOS, A. P. R.; CARMO, J. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Avaliação das Características Físico-Químicas e Microbiológicas de Tucupi Comercial**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 25 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 112). Versão eletrônica.
- CAMPOS, A. P. R.; CARMO, J. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Caracterização físico-química do tucupi durante as etapas de processamento**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2017. 20 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 114). Versão eletrônica.
- CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 23 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 107). Versão eletrônica.
- CHÁVEZ, A. L.; SANCHEZ, T.; CEBALLOS, H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P.; TOHME, J.; ISHITANI, M. Retention of carotenoids in cassava roots submitted to different processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 3, p. 388–393, 2007.
- CHISTÉ, R.C.; COHEN, K. O. Total and free cyanide contents determination during the processing steps for preparing tucupi. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, 41–46, 2011.
- CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupi. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 437–440, 2007.
- CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC/DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 23, p. 5884–5892, 2012.
- EFSA (2011). Panel on biological hazards (BIOHAZ). Scientific opinion on scientific opinion on risk based control of biogenic amine formation in fermented foods. **EFSA Journal**, v. 9, n. 10, p. 2393, 2011.
- ELIJAH, A. I.; ATANDA, O. O.; POPOOLA, A. R.; UZOCHUKWU, S. V. A. Molecular characterization and potential of bacterial species associated with cassava waste. **Nigerian Food Journal**, v. 32, n. 2, p. 56–57 / 57a, 58–65, 2014.

EMBORG, J.; DALGAARD, P. Formation of histamine and biogenic amines in cold smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 4, p. 897–906, 2006.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C.; SIRITUNGA, D.; MOURA, F. F.; FREGENE, M., MANARY, M. J.; SAYRE, R. T. Retention during processing and bioaccessibility of β - carotene in high β -carotene transgenic cassava root. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 15, p. 3861–3866, 2012.

FAOSTAT (2017). **Database, Food and Agriculture Organization of the United Nations**. <http://faostat3.fao.org/home/E/>, Accessed date: 20 June 2018.

FASUYI, A. O.; ALETOR, V. Varietal composition and functional properties of cassava (*Manihot esculenta* Cranz) leaf meal and leaf protein concentrates. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 1, p. 43–49, 2005.

FAYEMI, O. E.; OJOKOH, A. O. The effect of different fermentation techniques on the nutritional quality of the cassava product (fufu). **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 38, n. 1, p. 183–192, 2014.

FERREIRA, S. M.; CALIARI, M.; SOARES JUNIOR, M. S.; BELEIA, A. D. P. Produção de açúcares redutores por hidrólise acida e enzimática de farinha de arroz. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 383–390, 2013.

GARDINI, F.; OZOGUL, Y.; SUZZI, G.; TABANELLI, G.; OZOGUL, F. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–18, 2016.

GLÓRIA, M. B. A. (2005). **Bioactive amines**. In H. Hui, & F. Sherkat (Eds.). Handbook of food science, technology and engineering, London: CRC Press 3632 p.

GONZAGA, V. E.; LESCANO, A. G.; HUAMAN, A. A.; SALMON-MULANOVICH, G.; BLAZES, D. L. Histamine levels in fish from markets in Lima, Peru. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 5, p. 1112–1115, 2009.

IBGE (2017). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento sistemático da produção agrícola**. Rio de Janeiro. vol. 30 n.4 p.1–84, abr.2017. Available online:<[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/lspa_201704.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201704.pdf)>. Acesso: Julho 05, 2017.

KALÁČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005 – mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

KALÁČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1–2, p. 219–230, 2005.

KIMURA, M.; KOBORI, C. N.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; NESTEL, P. Screening and HPLC methods for carotenoids in sweetpotato, cassava and maize for plant breeding trials. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1734–1746, 2007.

KOKO, C. A.; KOUAME, B. K.; ANVOH, B. Y.; AMANI, G. N.; ASSIDJO, E. N. Comparative study on physicochemical characteristics of cassava roots from three local cultivars in Cote d'Ivoire. **European Scientific Journal**, v. 10, n. 33, p. 418–432, 2014.

LACERDA, I. C. A.; MIRANDA, R. L.; BORELLI, B. M.; NUNES, A. C.; NARDI, R. M. D.; LACHANCE, M.-A.; ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeasts associated with spontaneous fermentations during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 213–219, 2005.

LADEIRA, T.; SOUZA, H.; PENA, R. Characterization of the roots and starches of three cassava cultivars. **International Journal of Agricultural Science Research**, v. 2, n. 1, p. 12–20, 2013.

LEONEL, M. Analysis of the shape and size of starch grains from different botanical species. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 579–588, 2007.

LINARES, D. M.; MARTIN, M.C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M. A. Biogenic amines in dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 7, p. 691–703, 2011.

MARTUSCELLI, M.; ARFELLI, G.; MANETTA, A. C.; SUZZI, G. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). **Food Chemistry**, v. 140, n. 3, p. 590–597, 2013.

MELLENDEZ-MARTINEZ, A. J.; BRITTON, G.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1145–1150, 2006.

MOHEDANO, M. L.; LOPEZ, P.; SPANO, G.; RUSSO, P. **Controlling the formation of biogenic amines in fermented foods**. In W. Holzapfel (Ed.). *Advances in fermented foods and beverages* (pp. 273–310). Cambridge shire: Woodhead Publishing, 2015.

NAS-IOM - National Academy of Sciences, Institute of Medicine (2001). **Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc**. Washington: National Academy Press92.

OGUNTOYINBO, F. A.; DODD, C. E. R. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in gari production. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 306–312, 2010,

ORDONEZ, J. L.; CALLEJON, R. M.; MORALES, M. L.; GARCIA-PARRILLA, M. C. A survey of biogenic amines in vinegars. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2713–2719, 2013.

O'SULLIVAN, D. J.; FALLICO, V.; O'SULLIVAN, O.; MCSWEENEY, P. L. H.; SHEEHAN, J. J.; COTTER, P. D.; GIBLIN, L. High-throughput DNA sequencing to survey bacterial histidine and tyrosine decarboxylases in raw milk cheeses. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2015.

RAMANI, D.; BANDT, J. P.; CYNOBER, L. Aliphatic polyamines in physiology and diseases. **Clinical Nutrition**, v. 33, n. 1, p. 14–22, 2014.

RAO, A. V.; RAO, L. G. Carotenoids and human health. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 207–216, 2007.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. (2004). **Harvest Plus handbook for carotenoids analysis** (1st ed.). Washington, DC: Cali: IFPRI and CIAT58 (Chapter 2).

SHARMA, S.; KUMAR, P.; DESHMUKH, R. Neuroprotective potential of spermidine against rotenone induced Parkinson's disease in rats. **Neurochemistry International**, v. 116, p. 104–111, 2018.

SHIGAKI, T. (2015). **Cassava: The nature and uses**. Encyclopedia of food and health (1st ed.). Elsevier.

SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; LOLKEMA, J. S. Biogenic amines in fermented foods. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 64, n. 63, p. 95–100, 2010.

TAPINGKAE, W.; TANASUPAWAT, S.; PARKIN, K. L.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from high salt fermented fishery products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 2, p. 92–99, 2010.

THAKKAR, S. K.; HUO, T.; MAZIYA-DIXON, B.; FAILLA, M. L. Impact of style of processing on retention and bioaccessibility of β -carotene in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1344–1348, 2009.

CAPITULO IV- IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS E AMINAS BIOATIVAS DURANTE A FERMENTAÇÃO ESPONTÂNEA DA MANIPUEIRA PARA A OBTENÇÃO DO TUCUPI

RESUMO

Estudos relacionados à microbiota envolvida na produção do tucupi são escassos na literatura científica, embora pesquisas apontem as bactérias ácido lácticas, como os micro-organismos dominantes na fermentação da mandioca. Adicionalmente, as bactérias lácticas possuem genes produtores de aminas biogênicas. Assim, devido a falta de informação sobre o tema, esta pesquisa teve como objetivo isolar e identificar as bactérias lácticas, durante a fermentação da manipueira para a obtenção do tucupi, bem como estabelecer uma correlação com as aminas bioativas formadas durante o processo. Para tal, técnicas de sequenciamento e comparação de sequências, em bases de dados virtual do GenBank, a nível de similaridade superior de 95%, foram utilizadas para identificar as bactérias lácticas durante a fermentação da manipueira. Foram identificadas duas espécies de bactérias lácticas, o *Lactobacillus fermentum* e o *Lactobacillus plantarum*, sendo que o primeiro foi a espécie bacteriana predominante durante as 24 horas de fermentação da manipueira. Em relação às aminas, foram identificadas uma poliamina (a espermidina) e duas aminas biogênicas (a putrescina e a histamina), as quais não afetaram a sobrevivência das bactérias. Sugere-se que novas pesquisas genéticas sejam realizadas, afim de verificar se as bactérias lácticas identificadas possuem os genes responsáveis pela descarboxilação de aminoácidos, formando assim as aminas biogênicas, bem como, verificar a presença de outros micro-organismos durante o processo de fermentação da manipueira, tais como as leveduras.

Palavras-chaves: Micro-organismos, aminas biogênicas, *Manihot esculenta*, biologia molecular.

1 INTRODUÇÃO

A partir das raízes de mandioca é possível produzir uma infinidade de produtos, dentre os quais se destaca a farinha de mandioca (massa de mandioca triturada, prensada e torrada). Durante a prensagem da massa para a produção da farinha é gerada a manipueira (resíduo líquido), que submetida à fermentação espontânea, por até 24 horas, seguida de cocção, dá origem ao tucupi. Esse produto é um ingrediente tradicional da cultura amazônica, muito utilizado na culinária regional e com grande potencialidade para uso na indústria de alimentos (CHISTÉ; COHEN, 2011; CAMPOS; CARVALHO; MATTIETTO, 2016, PIRES; PENA, 2017; COSTA et al., 2017, COSTA; CARMO; PENA, 2018).

Embora sejam poucas as informações sobre o processo de fermentação da manipueira, para produzir o tucupi, pesquisas apontam as bactérias ácido lácticas como os micro-organismos predominantes na fermentação da mandioca. Assim, acredita-se que a fermentação da manipueira seja realizada por bactérias lácticas e leveduras, uma vez que estes micro-organismos são tolerantes aos baixos níveis de pH observados durante a fermentação (6,0-4,0) (CHISTÉ; COHEN, 2011; ABRIBA et al., 2012). Alguns estudos realizados com a manipueira, para identificar as espécies de bactérias presentes, demonstraram que, de modo geral, há predominância de bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* (AVANCINI et al., 2007, ELIJAH et al., 2014).

As bactérias lácticas possuem um papel importante na fermentação, pois intensificam o processo fermentativo e são responsáveis pela acidificação do meio, o que contribui para a definição das características desejáveis do produto fermentado. Essa acidificação atua também como um fator limitante para o crescimento e sobrevivência de micro-organismos patogênicos (ABRIBA et al., 2012; TETCHI et al., 2012). Por outro lado, as bactérias lácticas possuem genes que sintetizam aminas biogênicas, o que não é desejável em processos fermentativos de alimentos, uma vez que essas aminas em elevadas concentrações podem oferecer riscos à saúde do consumidor (ELSANHOTY; RAMADAN, 2016).

A inexistência de dados na literatura científica sobre as bactérias lácticas envolvidas na produção do tucupi motivou esta pesquisa, que tem por objetivo isolar e identificar as bactérias lácticas, durante a fermentação da manipueira, para a obtenção do tucupi, bem como identificar as aminas bioativas que ocorrem durante este processo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATÉRIA-PRIMA

Foram utilizadas raízes de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) (30 kg) de variedades de polpa amarela, adquiridas em triplicata (n = 3) no mercado Ver-O-Peso, localizado em Belém, Pará, Brasil (latitude 01°27'21" e longitude 48°30'16"). Essas raízes foram coletadas e processadas em outubro, novembro e dezembro de 2018 (10 kg por lote).

2.2 FERMENTAÇÃO DA MANIPUEIRA

Para obtenção da manipueira, as raízes foram lavadas com água potável, descascadas com facas de aço inoxidável e lavadas novamente. As raízes descascadas foram trituradas e a massa obtida (8 kg por lote) foi prensada manualmente para extração da manipueira (4 L). Essas etapas (descascamento, trituração e prensagem) foram realizadas no próprio local de compra das amostras, usando o mesmo equipamento e condições de processamento dos produtores de tucupi do mercado Ver-o-Peso. A manipueira extraída foi transportada para o laboratório, em embalagens plásticas de 5 L à temperatura ambiente. O transporte da amostra do mercado para o laboratório durou, em média, 30 min.

No laboratório, a manipueira (4 L) foi colocada em um recipiente de aço inoxidável, previamente sanitizado com solução de hipoclorito de sódio (100 mg/L) e enxaguado com água potável. A manipueira foi então submetida a um processo de fermentação espontânea a 30°C (temperatura ambiente média da região) durante 24 h, em estufa (Q-316 M5, Quimis®, Brasil), no qual foram retiradas alíquotas no tempo 0 h (início), 12 h (meio) e 24 h (final) de fermentação, esta etapa foi realizada de forma asséptica e com materiais esterilizados. As análises microbiológicas foram realizadas imediatamente após a coleta, e para a determinação das aminas bioativas, as amostras foram acondicionadas em embalagens plásticas de 50 mL e armazenadas sob congelamento (-18°C) até a realização da análise.

2.3 ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS LÁCTICAS (BAL)

Para a obtenção dos isolados, alíquotas de 25 mL da manipueira foram homogeneizadas manualmente, por 2 min, em 225 mL de água peptonada salina 0,1% (Kasvi®, Brasil), obtendo-se a diluição 10⁻¹. A partir desta diluição foram realizadas diluições decimais seriadas até 10⁻⁸. Para enumeração das bactérias lácticas foi utilizada a técnica de inoculação *pour plate*, na qual

alíquotas de 1 mL de cada diluição seriada foram inoculadas em placas de petri estéreis, acrescidas de meio Ágar Man Rogosa e Sharpe (MRS, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), adicionado de cicloheximida (Inlab®, São Paulo, SP, Brasil), para a inibição do crescimento de fungos. As placas foram incubadas invertidas, em estufa bacteriológica a $35,0 \pm 2,0$ °C por 72 h (APHA, 2001).

De cada placa contendo entre 25 e 250 colônias, foram retirados 35% desta contagem de colônias (CAMU et al., 2007) e submetidas à coloração de gram e à prova de catalase, utilizando peróxido de hidrogênio 2%. Colônias catalase negativa e gram positivas, com formato microscópico de cocos ou bacilos foram isoladas e purificadas duas vezes pela técnica de esgotamento, em placas de petri contendo Ágar MRS (Sigma-Aldrich®). Uma sobrecamada do mesmo meio foi adicionada para formação de um ambiente anaeróbico, sendo o conjunto incubado a $35,0 \pm 2,0$ °C por 72 h. Os resultados para contagem foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mL de manipueira (UFC/mL).

2.4 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

2.4.1 Extração do DNA genômico das bactérias

Após a purificação, o DNA das colônias de bactérias foi extraído pela metodologia proposta por Sambrook et al. (2001), utilizando fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, Sigma-Aldrich®). O DNA extraído foi armazenado a -18 °C até o momento da realização das etapas posteriores.

2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A região bacteriana do gene 16S foi amplificada pela realização da etapa de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na qual 2 µL de DNA previamente descongelado e em temperatura ambiente (≈ 25 °C), foram adicionados a 23 µL da solução contendo 16,4 µL de água MilliQ, 2,5 µL de solução tampão 10x (Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA), 1 µL de mix dNTP (Qiagen®, Hilden, Alemanha), 2 µL de cloreto de magnésio ($MgCl_2$ – 50 mM, Invitrogen®), 0,1 µL de *Taq* DNA polimerase (5 U/µL, Invitrogen®) e 0,5 µL de cada primer 616*f* (Invitrogen®) (5' – TTAAAAGGYTCGTAGTYG – 3') e 907*r* (Invitrogen®) (5' – CCGTCAATTCMTTTGAGTTT – 3') (LANE, 1991; HUGERTH et al., 2014), em concentração de 10 pmol, totalizando 25 µL.

Os microtubos com todos os componentes foram submetidos a PCR, utilizando termociclador automático (LabTrace®, mod. K960) programado para as reações de desnaturação inicial a 95 °C/5 min, 35 ciclos de desnaturação (95 °C/1 min), anelamento (58 °C/1 min), extensão (72 °C/1 min), extensão final (72 °C/5 min) e resfriamento (4 °C/∞). Os produtos da PCR foram purificados com o kit de purificação PCR-clean up (Axygen®, AP-PCR-250), seguindo as normas do fabricante.

A identificação molecular foi realizada a partir de reações bidirecionais sequenciadas e analisadas em sequenciador ABI-Prism 3700 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA). A qualidade das sequências foi avaliada com o software FinchTv 1.4.0 (Geospiza®) e comparadas com o grau de identidade, a partir do banco de dados virtual GenBank® (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.5 DETERMINAÇÃO DE AMINAS BIOATIVAS

Para a extração das aminas, foram utilizados 5 mL de manipueira foi com 7 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Essa mistura foi homogeneizada em agitador (5 min), seguido de centrifugação (Jouan Thermo MR23i, França) a 11180 x g a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro qualitativo e em membranas de 0,45 µm (BRITO et al., 2017).

Nove aminas bioativas foram pesquisadas, sendo: espermidina, putrescina, agmatina, cadaverina, serotonina, histamina, tiramina, triptamina e feniletilamina. As aminas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por pareamento de íons, em coluna de fase reversa. Um cromatógrafo modelo LC-10CE, com câmara de mistura à alta pressão, conjunto de lavagem automática de pistão e injetor automático modelo SIL-10AD VP (Shimadzu, Kioto, Japão) foi utilizado. As aminas foram separadas utilizando coluna Novapak C18 (3,9×300 mm, 4 µm, 60 Å, Waters, MA, USA) e um gradiente de eluição de acetato de sódio 0,2 M e octanossulfonato de sódio 15 mM, com pH ajustado para 4,9, com ácido acético glacial (fase móvel A) e acetonitrila (fase móvel B) (BRITO et al., 2017).

A identificação das aminas foi feita por comparação entre os tempos de retenção e a co-eluição com padrões. A quantificação foi feita por fluorimetria (340 e 445 nm de excitação e emissão, respectivamente) após derivatização pós-coluna com *o*-ftalaldeído,

utilizando curvas analíticas (duplicata) para cada amina ($r^2 \geq 0,99$). O teor de aminos bioativas ($n = 3$, base úmida) foi expresso em mg/L de amostra.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados analíticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de significância, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$); utilizando o software Statística 7.0® (STATSOFT INC., 2004).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 MICROBIOTA DA PRODUÇÃO DO TUCUPI

A fermentação da manipueira para produção do tucupi é um processo espontâneo, cuja microbiota ainda não é bem conhecida. Assim, este é o primeiro estudo que identificou as bactérias lácticas que estão envolvidas no processo fermentativo da manipueira para a produção do tucupi. Foi dada ênfase às bactérias lácticas, pois diversas pesquisas reportam que há uma predominância desta classe de micro-organismos na produção de alimentos fermentados a base de mandioca (COULIN et al., 2006; KOSTINEK et al., 2007; CRISPIM et al., 2013; FREIRE; RAMOS; SCHWAN, 2015), e também pelo fato de serem possíveis produtoras de aminos biogênicos (MORACANIN et al., 2015; HENRÍQUEZ-AEDO et al., 2016).

Foram isoladas 19 bactérias lácticas ao longo da fermentação da manipueira, no tempo 0 hora ($n = 10$), 12 horas ($n = 4$) e 24 horas ($n = 5$). Com relação à contagem da população de bactérias lácticas (BAL), foi observado que durante a fermentação os valores permaneceram entre 10^7 e 10^8 UFC/mL até o final do processo. A contagem na manipueira foi de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL e ao atingir 12 horas de processo, esta população bacteriana aumentou $\approx 96\%$ ($4,2 \times 10^8$ UFC/mL) e permaneceu constante até o final da fermentação ($5,8 \times 10^8$ UFC/mL ($p > 0,05$)). Estes resultados confirmam a presença de bactérias lácticas durante todo o processo fermentativo.

Diante disso, foram identificadas, por meio de técnicas de sequenciamento e comparação de sequências em bases de dados virtual do GenBank, em nível superior a 95% de similaridade, duas espécies de bactérias lácticas: o *Lactobacillus fermentum* e o *Lactobacillus plantarum*. A distribuição das espécies encontradas durante o processo, expressa em

porcentagem, é apresentada na Tabela 1, onde é possível observar que o *L. plantarum* esteve presente apenas no início do processo fermentativo, e representou apenas 20% dessa espécie de bactéria láctica; sendo os 80% restantes representados pelo *L. fermentum*. Esta bactéria, por sua vez, esteve presente em todas as etapas do processo: no início (0 h), no meio (12 h) e no fim da fermentação (24 h). O *L. fermentum* foi a única bactéria láctica presente no mosto, a partir das 12 horas de fermentação.

Tabela 1. Identificação molecular das bactérias lácticas isoladas da fermentação da manipueira

Material	Espécie	Acesso	Similaridade (%) ¹
Manipueira			
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	94,76
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MK616469.1	100
3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	99,44
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	100
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	93,19
6	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MH817767.1	98,41
7	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	99,41
8	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	99,46
9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MK616469.1	98,05
10	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK639007.1	98,84
Tempo fermentação 12 horas			
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	100
2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	100
3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK639007.1	99,44
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	98,92
Tempo fermentação 24 horas			
1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	CP035055.1	95,55
2	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MF108112.1	96,47
3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MH175491.1	93,87
4	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	98,76
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	MK640639.1	99,23

¹ Porcentagem de similaridade com as bactérias lácticas disponíveis no GenBank®.

De acordo com Lacerda et al. (2005), a fermentação da mandioca é tipicamente láctica, porém diversos tipos de micro-organismos estão presentes no início do processo. Porém, à medida que a fermentação avança, ocorre uma sucessão desses micro-organismos pelas bactérias lácticas, predominando o gênero *Lactobacillus*. Ampe, Sirvent e Zakhia (2001)

sugeriram que essa sucessão é determinada pelas sensibilidades dos micro-organismos iniciais às condições ácidas do meio, que ocorrem com o avanço do processo fermentativo.

A elevada contagem de bactérias lácticas presente na manipueira ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL) pode ser atribuída ao fato de que, durante as etapas de processamento do tucupi, onde as boas práticas de fabricação são insatisfatórias em algumas unidades processadoras, uma vez que a maior parte da produção ainda ocorre de maneira artesanal. Colehour et al. (2014) reporta que as bactérias lácticas que realizam a fermentação da mandioca podem ser provenientes da matéria-prima, poeira transportada pelo ar, equipamentos e utensílios utilizados na fermentação ou podem ser introduzidas pelos manipuladores.

Elijah et al. (2014) realizaram a caracterização molecular de espécies bacterianas associadas aos resíduos da mandioca, e dentre estes resíduos, observaram na manipueira uma diversidade bacteriana, sendo que dentre as 26 espécies de bactérias detectadas, o *L. fermentum* foi a espécie dominante, seguido do *L. plantarum*, uma vez que a predominância do *L. fermentum* foi semelhante ao comportamento obtido no estudo. Ao longo da fermentação espontânea, os micro-organismos que melhor se adaptam ao meio ambiente e exibem a maior taxa de crescimento, dominam o processo de fermentação (HOLZAPFEL, 2002). O controle de fermentações espontâneas, como a que ocorre na produção do tucupi, é difícil devido a ocorrência de uma sucessão de flora microbiana e às múltiplas atividades dos micro-organismos (AMMOR; MAYO, 2007; DI CAGNO et al., 2013).

3.2 AMINAS NA PRODUÇÃO DO TUCUPI

Os *Lactobacillus* são relatados como fortes produtores de aminas biogênicas, em diferentes alimentos fermentados (SPANO et al., 2010). No acompanhamento do processo de fermentação da manipueira foram identificadas três aminas bioativas, uma poliamina (a espermidina) e duas aminas biogênicas (a putrescina e a histamina) (Figura 2). Estes resultados estão de acordo com Brito et al. (2019), que identificaram uma poliamina (a espermidina) e três aminas biogênicas (a putrescina, a histamina e a tiramina) nas etapas de produção do tucupi. O fato de Brito et al. (2019) terem observado uma terceira amina biogênica, a tiramina, pode ser atribuído à dificuldade no controle da fermentação na manipueira, por ser um processo espontâneo. Adicionalmente, a deficiência nas Boas Práticas de Fabricação dos locais de produção do tucupi, pode contribuir para as mudanças observadas no perfil de aminas bioativas.

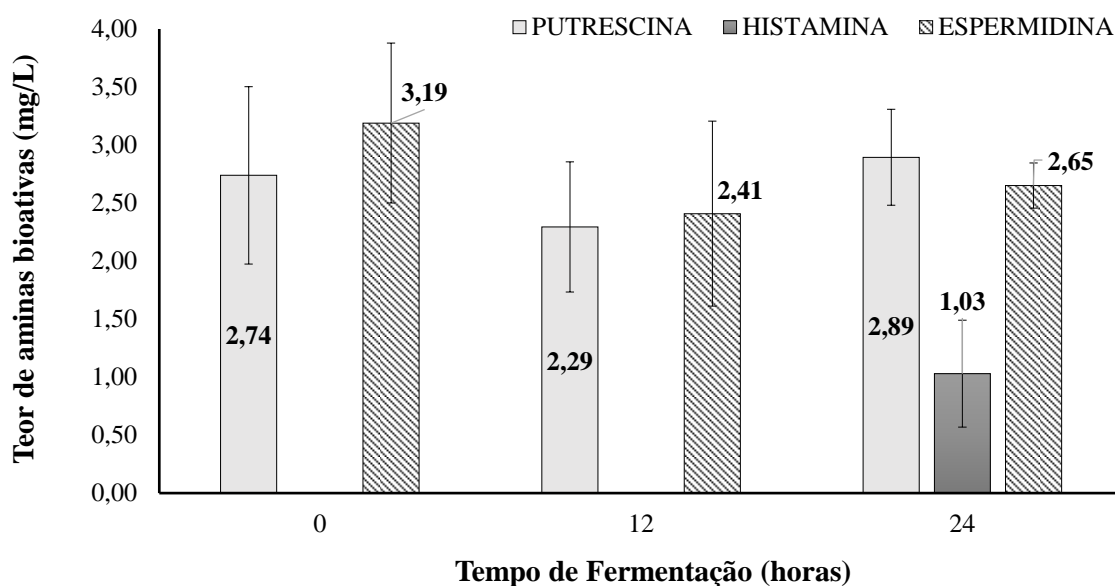


Figura 1. Perfil e teor das aminas bioativas identificadas durante a fermentação da manipueira para a produção do tucupi.

Seguindo a mesma tendência observada por Brito et al. (2019), não houve mudança significativa nos teores de espermidina e putrescina ($p > 0,05$) ao longo da fermentação. A presença destas aminas é justificável, pelo fato das mesmas serem inerentes às plantas e a todos os organismos vivos. A espermidina está envolvida no crescimento, renovação e metabolismo celular; e a putrescina é um precursor obrigatório na formação de poliaminas (KALÁČ; KRAUSOVÁ, 2005; KALÁČ, 2014).

A espermidina e a putrescina foram observadas em todas as etapas do processo de fermentação da manipueira, com concentrações médias de 2,58 mg/L e 2,47 mg/L, respectivamente. Os perfis destas aminas são semelhantes, mas as concentrações são inferiores às reportadas por Brito et al. (2019), que encontraram concentrações médias de 4,43 mg/L para espermidina e 3,78 mg/L para putrescina. As diferenças observadas nas concentrações das aminas podem ser atribuídas à capacidade dos micro-organismos de descarboxilar aminoácidos, a qual é altamente variável, e dependente não apenas das espécies, mas também da linhagem do micro-organismo e das condições ambientes (COTON et al., 1998; MARCOBAL et al., 2006).

Segundo Glória (2005), as bactérias lácticas são capazes de produzir a tiramina e a histamina, como uma forma de proteção contra o meio ácido (diminuição do pH), que ocorre durante a fermentação; o que pode ser prejudicial à sobrevivência das bactérias. Porém, no

presente estudo não há evidências de que a formação da tiramina e da histamina tenham sido prejudiciais à sobrevivência das bactérias lácticas identificadas, uma vez que houve um aumento na contagem das bactérias durante a fermentação, de $1,5 \times 10^7$ UFC/mL para $5,8 \times 10^8$ UFC/mL. Como pode ser observado na Figura 2, a histamina por ser um metabolito secundário (WINK, 2018), só foi formada na fase final da fermentação, onde os níveis de pH são mais baixos, elevando a acidez.

O *L. fermentum* e o *L. plantarum*, identificados durante o processo de fermentação da manipueira, têm a capacidade de descarboxilar aminoácidos e, assim, podem produzir a histamina, a tiramina e a putrescina (GLÓRIA, 2005). Neste trabalho, apenas foi realizada a identificação das bactérias lácticas, porém é necessário relacionar a presença de genes que codificam a descarboxilase, com capacidade de sintetizar aminas, destes micro-organismos (LUCAS et al., 2005; EFSA, 2011; GUO et al., 2015). Landete et al. (2007) observaram uma correlação de 100% entre a presença dos genes de histidina descarboxilase, tirosina descarboxilase e ornitina descarboxilase, e a produção de histamina, tiramina e putrescina, respectivamente.

4 CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo em que foi realizada a identificação das bactérias lácticas atuantes na fermentação da manipueira, para a produção do tucupi. Apenas as espécies *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum*, foram identificadas durante todo o processo de fermentação, sendo que a primeira só foi identificada no início do processo de fermentação. Adicionalmente, foram identificadas três aminos bioativas, sendo uma poliamina (a espermidina) e uma amina biogênica (a putrescina), durante todo o processo de fermentação, e a amina biogênica histamina, apenas na etapa final da fermentação. Não foi evidenciado que as aminos identificadas tenham afetado a sobrevivência das bactérias, uma vez que a contagem destes micro-organismos apresentou um aumento de $\approx 96\%$ nas primeiras 12 horas, e se manteve constante até o fim do processo. Embora a literatura aponte para uma correlação entre as bactérias lácticas e a produção das aminos biogênicas, pesquisas genéticas são necessárias, para comprovar a capacidade das bactérias *L. plantarum* e *L. fermentum* identificadas na fermentação da manipueira, de codificar a descarboxilase, para poder sintetizar as aminos biogênicas. Estudos para a investigar a presença de leveduras durante o processo de fermentação da manipueira, para a produção do tucupi, também são relevantes.

5 REFERÊNCIAS

ABRIBA, C.; HENSHAW, E. E.; LENOX, J.; EJA, M.; IKPOH, I. S.; AGBOR, B. E. Microbial succession and odour reduction during the controlled fermentation of cassava tubers for the production of “foofoo”, a staple food consumed popularly in Nigeria. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 2, n. 4, p. 500–506, 2012.

AMMOR, M. S.; MAYO, B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. **Meat Science**, v. 76, n.1, p. 138–146, 2007.

AMPE, F.; SIRVENT, A.; ZAKHIA, N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by ‘Denaturing Gradient Gel Electrophoresis’ and ‘Quantitative rRNA Hybridization’. **International Journal of Food Microbiology**, v. 65, p. 45 – 54, 2001.

APHA - American Public Health Association Vanderzant C, Splittstoesser DF. 1992. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (3rd ed.). Washington, DC.

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

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; LOPES, A. S.; GLÓRIA, M. B. A.; PENA, R. S. Influence of spontaneous fermentation of *manipueira* on bioactive amine and carotenoid profiles during *tucupi* production. **Food Research International**, v. 120, p. 209-216, 2019.

BRITO, B. N. C.; CHISTÉ, R. C.; PENA, R. S.; GLÓRIA, M. B. A.; LOPES, A. S. Bioactive amines and phenolic compounds in cocoa beans are affected by fermentation. **Food Chemistry**, v. 228, p. 484–490, 2017.

CAMPOS, A. P. R.; CARVALHO, A. V.; MATTIETTO, R. A. **Efeito da fermentação e cocção nas características físico-químicas e teor de cianeto durante o processamento de tucupi**, Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 23 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 107). Versão eletrônica.

CAMU, N.; DE WINTER, T.; VERBRUGGHE, K.; CLEENWERCK, I.; VANDAMME, P.; TAKRAMA, J. S.; VANCANNEYT, M.; DE VUYST, L. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 6, p. 1809–1824, 2007.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Teor de cianeto total e livre nas etapas de processamento do tucupi. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 1, p. 41-6, 2011.

COLEHOUR, A. M.; MEADOW, J. F.; LIEBERT, M. A.; CEPON-ROBINS, T. J.; GILDNER, T. E.; URLACHER, S. S.; BOHANNAN, B. J. M.; SNODGRASS, J. J.; SUGIYAMA, L. S.

Local domestication of lactic acid bacteria via cassava beer fermentation. **PeerJ**, v. 2, p. e479, 2014.

COSTA, T. S.; CARMO, J. R.; BRAGA, A. C. C.; PENA, R. S. Tucupi creamy paste: development, sensory evaluation and rheological characterization. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 1, p. 115-124, 2017.

COSTA, T. S.; CARMO, J. R.; PENA, R. S. Powdered tucupi condiment: sensory and hygroscopic evaluation. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 1, p. 33-40, 2018.

COTON, E.; ROLLAN, G.; BERTRAND, A.; LONVAUD-FUNEL, A. Histamine-producing lactic acid bacteria in wines: early detection, frequency, and distribution. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, p. 199-204, 1998.

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Characterization of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, p. 131–136, 2006.

CRISPIM, S. M.; NASCIMENTO, A. M. A.; COSTA, P. S.; MOREIRA, J. L. S.; NUNES, A. C.; NICOLI, J. R.; LIMA, F. L.; MOTA, V. T.; NARDI, R. M. D. Molecular identification of *Lactobacillus* spp. associated with *puba*, a Brazilian fermented cassava food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 15-21, 2013.

DI CAGNO, R.; CODA, R.; DE ANGELIS, M.; GOBBETTI, M. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 1–10, 2013.

EFSA (European Food Safety Authority) 2011. **Scientific opinion on risk based control of biogenic amines formation in fermented foods**. EFSA Journal, v. 9, n. 10, p. 2392.

ELIJAH, A. I.; ATANDA, O. O.; POPOOLA, A. R.; UZOCHUKWU, S. V. A. Molecular characterization and potential of bacterial species associated with cassava waste. **Nigerian Food Journal**, v. 32, n. 2, p. 56 – 65, 2014.

ELSANHOTY, R. M.; RAMADAN, M. F. Genetic screening of biogenic amines production capacity from some lactic acid bacteria strains. **Food Control**, v. 68, p. 220-228, 2016.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; SCHWAN, R. F. Microbiological and chemical parameters during cassava based-substrate fermentation using potential starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **Food Research International**, v. 76, p. 787-795, 2015.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In H. Hui; L.L. Nollet. **Handbook of Food Science, Technology and Engineering**. Ed. Marcel Dekker, v.4, p. 1-38, 2005.

GUO, X.; GUAN, X.; WANG, Y; LI, L.; WU, D.; CHEN, Y.; PEI, H.; XIAO, D. Reduction of biogenic amines production by eliminating the *PEP4* gene in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of Chinese rice wine. **Food Chemistry**, v. 178, p. 208–211, 2015.

HENRÍQUEZ-AEDO, K.; DURAN, D.; GARCIA, A.; HENGST, M. B.; ARANDA, M. Identification of biogenic amines-producing lactic acid bacteria isolated from spontaneous malolactic fermentation of Chilean red wines. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 183-189, 2016.

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

HUGERTH, L.W.; MULLER, E. E. L.; HU, Y. O. O.; LEBRUN, L. A. M.; ROUME, H.; LUNDIN, D.; WILMES, P.; ANDERSSON, A. F. et al. Systematic Design of 18S rRNA Gene Primers for Determining Eukaryotic Diversity in Microbial Consortia. **Plos One**, v. 9, n. 4, p. 1–11, 2014.

KALAČ, P. Health effects and occurrence of dietary polyamines: A review for the period 2005–mid 2013. **Food Chemistry**, v. 161, p. 27–39, 2014.

KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. A review of dietary polyamines: formation, implications for growth and health and occurrence in foods. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 219-230, 2005.

KOSTINEK, M.; SPECHT, I.; EDWARD, V.A.; PINTO, C.; EGOUNLETY, M.; SOSSA, C.; MBUGUA, S.; DORTU, C.; THONART, P.; TALJAARD, L.; MENGU, M.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. Characterisation and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. **International Journal of Food Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 342–351, 2007.

LACERDA, I. C. A.; MIRANDA, R. L.; BORELLI, B. M.; NUNES, A. C.; NARDI, R. M. D.; LACHANCE, M.A.; ROSA, C. A. Lactic acid bacteria and yeast associated with spontaneous fermentation during the production of sour cassava starch in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 213-219, 2005.

LANDETE, J. M.; DE LAS RIVAS, B.; MARCOBAL, A.; MUÑOZ, R. Molecular methods for the detection of biogenic amine-producing bacteria on foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 258-269, 2007.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In Goodfellow M, Stackebrandt E (ed), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley and Sons, Chichester, UK, 1991, p. 115-175

LUCAS, P. M.; WOLKEN, W. A. M.; CLAISSE, O.; LOLKEMA, J. S.; LONVAUD-FUNEL, A. Histamine-producing pathway encoded on an unstable plasmid in *Lactobacillus hilgardii* 0006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1417-1424, 2005.

MARCOBAL, A., DE LAS RIVAS, B., MUÑOZ, R. Methods for the detection of bacteria producing biogenic amines on foods: a survey. **Journal of Consumer Protect and Food Safety**, v. 1, p. 187-196, 2006.

MORACANIN, S. V.; STEFANOVIC, S.; RADICEVIC, T.; BOROVIĆ, B.; DJUKIC, D. Production of biogenic amines by lactic acid bacteria isolated from Uzicka sausages. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 308 – 311, 2005.

PIRES, F. C. S.; PENA, R. S. Optimization of spray drying process parameters for tucupi powder using the response surface methodology. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3459–3472, 2017.

SAMBROOK, J.; MACCAULLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.rd. ed. Cold Springs Harbour Press, NY, ISBN 0-87969-577-3, P. 2344.

SPANO, G.; RUSSO, P.; LONVAUD-FUNEL, A.; LUCAS, P.; ALEXANDRE, H.; GRANDVALET, C.; COTON, E.; COTON, M.; BARNAVON, L., BACH, B.; RATTRAY, F.; BUNTE, A.; MAGNI, C.; LADERO, V.; ALVAREZ, M.; FERNÁNDEZ, M.; LOPEZ, P.; DE PALENCIA, P. F.; CORBI, A.; TRIP, H.; LOLKEMA, J. S. Biogenic amine in fermented foods. **European journal of clinical nutrition**, v. 64, p. 95 – 100, 2010.

STATSOFT, INC. **STATISTICA (data analysis software system)**, versão 7.0. www.statsoft.com, 2004.

TETCHI, F. A.; SOLOMEN, O. W.; CÉLAH, K. A.; GEORGES, A. N. Effect of cassava variety and fermentation time on biochemical and microbiological characteristics of raw artisanal starter for attiéké production. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 10, p. 40–47, 2012.

WINK, M. Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction? **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 364, 2018.