

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E  
MICROBIOLÓGICA DE BEBIDAS  
FERMENTADAS PRODUZIDAS PELOS  
ÍNDIOS TAPIRAPÉ**

**EUZICLEI GONZAGA DE ALMEIDA**

**2009**

**EUZICLEI GONZAGA DE ALMEIDA**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE  
BEBIDAS FERMENTADAS PRODUZIDAS PELOS ÍNDIOS TAPIRAPÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos, para a  
obtenção do título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Almeida, Euziclei Gonzaga de.

Caracterização físico-química e microbiológica de bebidas fermentadas produzidas pelos índios Tapirapé / Euziclei Gonzaga de Almeida. – Lavras : UFLA, 2009.

114 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Cauim. 2. Aldeia. 3. Tapi'itãwa. 4. Mandioca. 5. Arroz. 6. Semente de algodão. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 664.024

**EUZICLEI GONZAGA DE ALMEIDA**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE  
BEBIDAS FERMENTADAS PRODUZIDAS PELOS ÍNDIOS TAPIRAPÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciências dos Alimentos, para a  
obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 31 de julho de 2009

Profa. Dra. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli	UFLA
Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias	UNILAVRAS
Profa. Dra. Cristina Ferreira Silva	UFLA
Prof. Dr. Luis Roberto Batista	UFLA

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A minha mãe, Edmunda Gonzaga de Souza. Ela é uma mãe amorosa, que criou uma boa e grande família e me inspirou a continuar estudando em busca dos meus ideais. E à memória de meu pai Rômulo Xavier de Almeida que deixou lembranças. Ambos, pelo exemplo de luta, trabalho, honestidade e criação.

A todos os meus irmãos e familiares.

A minha esposa Helivânia e a meu filho Roberth Klay.

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus sou extremamente agradecido por ter me concedido força e saúde para realização deste trabalho.

A minha orientadora Professora Rosane Freitas Schwan, pela oportunidade concedida, confiança, apoio, amizade, carinho, dedicação e profissionalismo durante estes seis anos e meio de convivência. Expresso meus sentimentos de imensa alegria, felicidade, gratidão e constante superação. Que Deus possa te abençoar muitas vezes mais.

A Capes pela concessão de bolsa de estudos, ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela realização do curso e parte das análises físico-químicas. E ao curso de Microbiologia Agrícola (DBI/UFLA) pelas disciplinas cursadas e disponibilidade dos laboratórios para execução do experimento.

A comunidade indígena TAPIRAPÉ, em especial à aldeia Tapi'itãwa, cacique e demais representantes.

A meus amigos e informantes TAPIRAPÉ, ex-cacique Xywaeri José Pio, esposa e filha que se empenharam e não mediram esforços para contribuir, durante as etapas de preparação dos vários tipos de cauins, tornando possível a coleta das amostras para posteriores análises.

Às “Irmanzinhas de Jesus”, pelas informações e apoio concedido.

A minha mãe Edmunda Gonzaga de Souza e meus irmãos que sempre me apoiaram e incentivaram a estudar.

Gostaria de agradecer especialmente a minha esposa Helivânia Pereira de Abreu Almeida e a meu filho Roberth Klay Abreu Almeida pela incansável

compreensão diante dos problemas familiares, econômicos e sentimentais, nos momentos de ausência.

Ao meu sogro Frederico e familiares.

Agradeço também ao Professor Eduardo Valério de Barros Vilas boas e seu orientando Luiz (Luisinho) pela realização de parte das análises físico-químicas, em seu laboratório (DCA/UFLA).

Não poderia esquecer meus amigos Ildon Rodrigues do Nascimento e Wander Bruno dos Santos pelos muitos ensinamentos e contribuição primordial para minha carreira de Pós-Graduando.

Embora tenha empreendido um grande esforço para a conclusão deste curso, esta tese jamais seria realizada sem o auxílio de muitas outras pessoas. Entre elas, particularmente gostaria de agradecer enormemente à minha companheira Cíntia Lacerda Ramos que, com sua maneira dedicada, compartilhou da árdua tarefa de realização das várias etapas do experimento. E é responsável em grande parte pela realização desse estudo. Em especial às minhas amigas Cláudia Cristina Auler do Amaral, Maria Gabriela da Cruz Pedroso Miguel, Ana Luiza Freire e ao meu amigo Pedro Martins Sousa pela ajuda prestada e companheirismo, durante realização do experimento.

Às minhas amigas e companheiras Ivani Maria Gervásio, Maria Aparecida Sousa Dias (Cidinha), Magda Melo pela prestatividade, conselhos e ensinamentos.

Aos demais, sou extremamente agradecido pelo apoio e amizade, relacionando seus nomes a seguir: Carla, Cássia, Emerson, Gilberto, Lucas, Karina Herrera, Karina, Whasley, Luana, Evânia, Beatriz, Danielle, Sílvio, Matheus, Tiago, Claudinelli, Alessandra Millezi, Mara Elisa, Carolina, Lívia, Mariana, Maiara, Sarita, Lílian, Marcela, Ligiane, Krisle, Rogério, Paula, Maryeimy, Jessé, Márcia, João Paulo, Caio Fortes, Félix e Rômulo.

Agradeço também, aos Professores Disney Ribeiro Dias (UNILAVRAS), pela colaboração nas sugestões e correção dos artigos, Eustáquio, Romildo, Patrícia e Cristina (DBI/UFLA) pelos ensinamentos, bem como aos professores Luís Roberto, Roberta, Luís Carlos, Luís Contado (DCA/UFLA).

Aos funcionários Lamartine, Ironcina, Sebastiana (Du), Rafaela, Zélia, Paulo (Paulinho) Antônio, Elaine, Eula (DBI/UFLA).

Ao meu amigo Odair (das manilhas) de Confresa por ter disponibilizado transporte e ter me acompanhado durante preparo e coleta das amostras na aldeia Tapi'itãwa.

Sou eternamente grato a todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. Aos laços de profunda solidariedade e companheirismo e incrível fraternidade formada com todos os irmãos de Lavras e região. Deus seja louvado.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
.....	
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	1
1 Introdução Geral.....	1
2 Referencial Teórico.....	5
2.1 População indígena do Brasil.....	5
2.2 O povo TAPIRAPÉ.....	10
2.3 Alimentos fermentados produzidos pelos índios Tapirapé.....	15
2.3.1 Polvilho.....	16
2.3.2 Farinha de puba.....	17
2.3.3 Beiju.....	18
2.3.4 Cauim.....	18
2.4 Caracterização bioquímica e molecular de bactérias.....	19
3 Referências Bibliográficas.....	26
CAPÍTULO 2: Caracterização físico-química e microbiológica de cauins preparados pela tribo Tapirapé, Mato Grosso, Brasil.....	33
1 Resumo.....	34
2 Abstract.....	36
3 Introdução.....	38
4 Material e Métodos.....	40
4.1 Área de estudo.....	40
4.2 Preparo de cauim cozido e fermentado.....	40
4.2.1 Cauim de mandioca (brava) com arroz.....	40
4.2.2 Cauim de amendoim com arroz.....	43

4.2.3 Cauim de semente de algodão com arroz.....	45
4.3 Amostragem.....	46
4.4 Análises microbiológicas.....	46
4.5 Caracterização físico-química.....	47
5 Resultados.....	49
5.1 Cauim cozido e fermentado.....	49
5.2 Cauim de mandioca com arroz.....	53
5.2.1 Análises físico-químicas.....	53
5.2.2 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de mandioca com arroz.....	56
5.3 Cauim de amendoim com arroz.....	57
5.3.1 Análises físico-químicas.....	57
5.3.2 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de amendoim com arroz.....	61
5.4 Cauim de semente de algodão com arroz.....	62
5.4.1 Análises físico-químicas.....	62
5.4.2 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de semente de algodão com arroz.....	65
6 Discussão.....	67
7 Referências Bibliográficas.....	75
<b>CAPÍTULO 3: Identificação de bactérias presentes em fermentação de sementes de algodão e arroz por métodos dependentes e independentes de cultivo.....</b>	<b>79</b>
1 Resumo.....	80
2 Abstract.....	81
3 Introdução.....	82
4 Material e Métodos.....	85
4.1 Preparo do cauim ou da bebida.....	85

4.2 Coleta das amostras.....	86
4.3 Contagem de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias Gram-negativas, bactérias do ácido láctico (BAL).....	86
4.4 Identificação de bactérias.....	87
4.5 Extração do DNA.....	88
4.6 Análise de PCR.....	89
4.7 Análise de DGGE.....	89
4.8 Análise das sequências.....	90
5 Resultados e Discussão.....	92
5.1 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de semente de algodão com arroz.....	92
5.1.2 Identificação convencional.....	96
5.2 Dinâmica da população microbiana utilizando eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	102
6 Conclusão.....	110
7 Referências Bibliográficas.....	111

## RESUMO

ALMEIDA, Euziclei Gonzaga de. **Caracterização físico-química e microbiológica de bebidas fermentadas pelos índios da tribo Tapirapé.** 2009. 114 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

A tribo Tapirapé é composta por cerca de 680 índios, distribuídos em cinco aldeias, vivendo na região norte de Mato Grosso, Brasil. Na aldeia Tapi'itãwa, situada no município de Confresa, vivem aproximadamente 260 índios. A base alimentar desses indivíduos é formada de cereais, legumes, tubérculos, frutas, caça e pesca. Cereais e legumes, em especial, são transformados, de forma tradicional e rudimentar, em alimentos e bebidas fermentadas. Dentre esses, destaca-se a bebida cauim, produzida a partir dos mais variados substratos, tais como arroz, mandioca, milho, amendoim, semente de algodão e batata-doce. As matérias-primas para a produção do cauim são coletadas nos campos ou cultivadas em suas roças (cultivo itinerante). O processamento é diversificado e as técnicas de preparo passadas de geração a geração. O objetivo deste trabalho foi determinar as características microbiológicas e físico-químicas do cauim obtido de diversas fontes na aldeia Tapi'itãwa. Além disso, verificou-se a importância social e cultural dessas bebidas no uso diário e comemorações festivas, o ambiente de preparo, a fonte de inóculo e como se distribuem as tarefas de preparação dessas bebidas. O desenvolvimento desse estudo foi realizado, inicialmente, por entrevistas com os indígenas, buscando saber os tipos de alimentos e bebidas produzidos, a matéria-prima utilizada e o modo de preparo. As bebidas foram preparadas e amostras foram coletadas para posterior análise microbiológica e físico-química dos teores de carboidratos e ácidos orgânicos por CLAE. Os valores de pH, sólidos solúveis, acidez total, proteína total e amido variaram de acordo com o tempo de fermentação. Foram observados valores entre 3,83 e 6,92 para pH; 5,92 e 7,83 para °Brix; 0,81 e 11,77 para amido; 2,44 e 5,61 para proteínas totais; 0,0037 e 0,68 g/L para frutose; 0,07 e 50,52 g/L para sacarose; 2,29 e 50,36g/L para maltose; 3,36 e 64,83g/L para ácido lático; 0,33 e 10,69 g/L de ácido acético e entre 0,01 e 0,76g/L de etanol entre todas as bebidas analisadas. Amostras de cauim produzido a partir de semente de algodão e arroz foram coletadas a cada 8 h de fermentação, para análise da microbiota presente na bebida, no período de 48 h de fermentação. Não houve crescimento de leveduras e fungos filamentosos, nas amostras analisadas. A população bacteriana alcançou valores em torno de 8,0 log UFC / mL. Um total de 162 estirpes de bactéria foram isoladas e identificadas. As bactérias foram agrupadas em Gram-negativa (12,96%), Gram-positiva catalase positiva (58,15%) e Gram-positiva catalase

negativa (41,84). Dentre os isolados Gram-positivos, os *Lactobacillus* (58,15%) foram dominantes, durante todo o processo, de fermentação, seguidos de espécies de *Corynebacterium* (29,08%) e de espécies do gênero *Bacillus* (12,76%). Análises de DGGE foram realizadas com o intuito de observar a dinâmica das comunidades de bactérias e fungos, sendo possível observar que não houve predomínio de uma ou mais bandas durante todo o processo fermentativo de cauim de sementes de algodão com arroz. É um indicativo de que os resultados obtidos estão de acordo com os da identificação pelo método tradicional, confirmando os resultados apresentados neste estudo.

**Palavras-chave:** Aldeia Tapi'itãwa, arroz, cauim, mandioca, semente de algodão.

---

Comitê Orientador: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Orientador)

## ABSTRACT

ALMEIDA, Euziclei Gonzaga. **Physico-chemical and microbiological quality of fermented beverages by the Indian tribe Tapirape.** 2009. 114p. Tese (Ciência dos Alimentos) Federal University of Lavras, Lavras, MG.\*

The Tapirapé tribe is composed of about 680 Indians, divided into five villages, living in northern Mato Grosso, Brazil. Tapi'itāwa is the village, which is located in the town of Confresa where live about 260 Indians. The staple food of these individuals is made up of cereals, legumes, tubers, fruit, hunting and fishing. Cereals and vegetables, in particular, are processed in a traditional and rudimentary into foods and fermented beverages. Among these, there is a beverage, called cauim produced from a variety of substrates, such as rice, cassava, corn, peanuts, cotton and sweet potatoes. The raw materials for cauim production are extracted in the fields or in their cultivated fields (shifting cultivation). Processing is diverse and preparation techniques passed down from generation to generation. The objective of this study was to determine the microbiological and physical-chemical properties of cauim from different sources prepared in the village Tapi'itāwa. In addition, there was a social and cultural importance of these fermented beverages in daily use and festive celebrations. The development of this study was carried out initially by interviews with the Indians, seeking to know the types of foods and beverages produced, the raw material used and the way of each one was prepared. The beverages were prepared and samples were collected for microbial analysis and physical chemistry of carbohydrates and organic acids by HPLC. The pH, soluble solids, acidity, total protein and starch varied according to fermentation time. It was observed values between 3.83 and 6.92 for pH, 5.92 and 7.83 for ° Brix, 0.81 and 11.77 for starch 2.44 and 5.61 for total protein, 0.0037 and 0.68 g / L for fructose, 0.07 and 50.52 g / L for sucrose, and 2.29 50.36 g / L for maltose, 3.36 and 64.83 g / L for lactic acid, 0.33 and 10.69 g / L acetic acid and between 0.01 and 0.76 g / L of ethanol for all beverages analyzed. Samples of cauim produced from seed cotton and rice were collected every 8 h of fermentation for analysis of the microbiota present during 48 h of fermentation. There was no growth of yeasts and

filamentous fungi, in the samples analyzed. The bacterial population reached values around 8.0 log CFU / mL. A total of 162 strains of bacteria were isolated and identified. The bacteria were grouped into Gram-negative (12.96%), Gram-positive catalase positive (58.15%) and Gram-positive catalase negative (41.84). Among the isolated Gram-positive *Lactobacillus* (58.15%) were dominant throughout the process of fermentation, followed by *Corynebacterium* species (29.08%) and species of the genus *Bacillus* (12.76%). DGGE analysis were performed in order to observe the dynamics of communities of bacteria and fungi, revealing that there was a predominance of one or more bands throughout the fermentation of cauim cotton seed with rice. It is an indication that the results are in agreement with the identification by the traditional method, confirming the results presented in this study.

**Keywords:** Village Tapi'tāwa, rice, cauim, cassava, cotton seed.

---

Guidance Committee: Rosane Freitas Schwan - UFLA (Major Professor)

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

Várias nações, tribos e aldeias utilizam as técnicas fermentativas tradicionais e/ou rudimentares para produzirem seus alimentos e bebidas. Na literatura, existem informações de que bebidas fermentadas já eram produzidas na Babilônia (Iraque) há mais de 7.000 anos, há 5.000 anos no Egito, há 4.000 anos no México, há 3.500 anos atrás no Sudão (Pedersen, 1979). Relata-se que a utilização dessa técnica teve seu início na China, sendo difundida para outras nações como Coréia, Japão e outros países orientais. Além desses, hoje outros países como Estados Unidos, México, Indonésia e Brasil, utilizam a fermentação para produzir vários tipos de alimentos e bebidas fermentadas.

Alimentos fermentados têm um papel vital na história do desenvolvimento do homem, oferecendo grande variedade de sabores, aromas e texturas que enriquecem sua nutrição. Acredita-se que a importância desses alimentos será ainda maior quando a população mundial alcançar de 8 a 12 bilhões de habitantes, já no século XXI. De modo geral, os alimentos e bebidas fermentadas podem ser produzidos e distribuídos a baixo custo e são geralmente de alto valor nutricional, fornecendo proteínas, vitaminas e minerais à maioria dos consumidores (Steinkraus, 1996).

Atualmente, alguns alimentos fermentados são industrializados e fazem parte da dieta da população de quase todo o globo, como por exemplo: pão, queijos, iogurtes, vinagre, bebidas fermentadas (cerveja, vinho) e fermento-destiladas (uísque, cachaça, tequila). Fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos de produzir e preservar alimentos. O processo de fermentação é relativamente eficiente, pois apresenta elevado tempo de prateleira, sem muitas vezes necessitar de refrigeração para sua preservação. Essas características são altamente apropriadas para a utilização em países em

desenvolvimento e outras áreas onde o acesso a equipamentos sofisticados é mais difícil.

Povos oriundos de várias partes do mundo contribuíram para o aperfeiçoamento e utilização das técnicas fermentativas. Nos países asiáticos, vários estudos têm sido feitos sobre alimentos e bebidas fermentadas produzidos pelos nativos daquela região. Esses alimentos são produzidos em casas, vilas ou em indústrias de pequeno porte. Existem, entretanto, alguns alimentos fermentados, como o molho de soja, que já são produzidos com tecnologia de alta qualidade e em larga escala. Muitos alimentos de origem indígena ou nativa da Ásia e África são produzidos por processos fermentativos espontâneos, que na maioria das vezes podem envolver a mistura de culturas de bactérias, leveduras e/ou fungos filamentosos. No oeste da África, os alimentos fermentados representam uma importante parte da dieta de muitos países, além disso, são vistos como uma forma de introduzir variedade no consumo de matérias-primas como mandioca, trigo e peixe. Como exemplo, podem ser citados a agbelima, produzida a partir da mandioca, consumido nesses países, gari, kokonte e lafun ou fufu (Amoa-Awua et al., 1996).

Muitos dos micro-organismos encontrados nos alimentos fermentados podem ser consumidos pelo homem. Esses microrganismos produzem várias enzimas como amilases, proteases, lipases, pectinases, entre outras que permitem que outros grupos microbianos colonizem os mais diversos substratos e modifiquem o sabor, preservando o alimento. Nas últimas duas décadas, tem-se pesquisado mais sobre a microbiota envolvida nos alimentos fermentados indígenas da Ásia e África, buscando melhorar a qualidade e estabilidade do produto (Steinkraus, 1996; Ampe et al., 2001; Miambi et al., 2003; Tou et al., 2006). Estudos também têm sido realizados com a manipulação genética dos micro-organismos envolvidos, visando a melhoria da qualidade e eficiência da produção de alimentos fermentados (Holzapfel, 1997).

Várias tribos indígenas brasileiras fazem uso da fermentação, tanto tribos da Amazônia (Araweté), quanto do Xingu (kayapó), e demais regiões onde residem os nativos brasileiros. Dentre essas tribos, a comunidade indígena dos TAPIRAPÉ faz uso da fermentação para produzir alimentos e bebidas básicos na dieta alimentar de sua população. Os índios Tapirapé atualmente habitam duas áreas indígenas, a Tapirapé/Karajá, sendo constituída de indivíduos Tapirapé e Karajá, e a Urubu Branco, onde vivem apenas os índios Tapirapé. A comunidade Tapirapé pertence ao tronco linguístico tupi-guarani e totalizam, atualmente, um número aproximado de 650 integrantes (UNEMAT, 2006).

A literatura sobre alimentos fermentados produzidos e consumidos por índios brasileiros é extremamente escassa. São vários os tipos de alimentos e bebidas fermentadas produzidos pelos índios Tapirapé, e pouco ainda é conhecido sobre seu preparo e qualidade nutricional. Para o preparo desses alimentos são utilizados diversos substratos como cauí de milho (verde), de arroz, mandioca (puba), amendoim, banana, semente de algodão, bacaba, abóbora e semente de banana brava. Os processos de produção dos alimentos indígenas são empíricos e rudimentares, utilizando-se como fermento ou inóculo o líquido da mastigação da batata-doce, que é adicionado ao recipiente de preparação da bebida, propiciando o desenvolvimento e proliferação dos microrganismos fermentadores responsáveis pelos processos fermentativos (Almeida et al., 2007). Os substratos utilizados nessa fermentação são coletados nos campos silvestres próximos à aldeia ou cultivados pelos membros da aldeia em suas roças (culturas itinerantes).

Este levantamento motivou a nossa equipe ao estudo dos alimentos fermentados produzidos pelos índios Tapirapé. O projeto ora proposto objetivou identificar a biodiversidade envolvida no preparo de diferentes alimentos e bebidas fermentadas por técnicas de isolamento tradicional e molecular, e

também avaliar a composição química e nutricional dos alimentos e bebidas fermentados. Os resultados obtidos a partir deste trabalho serão de extrema relevância nacional para a identificação da biodiversidade microbiana envolvida nesses processos fermentativos e para a divulgação do conhecimento da culinária indígena.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 População indígena do Brasil**

Na época do descobrimento do Brasil, em 1500, estudiosos estimaram que existiam cerca de 1 a 10 milhões de índios em nosso país. Esses índios estavam divididos em tribos, de acordo com o tronco linguístico ao qual pertenciam: tupi-guaranis (região do litoral), macro-jê ou tapuias (região do Planalto Central), aruaques (Amazônia) e caraíbas (Amazônia). Após períodos de conflito seja por escravização, catequização ou por desrespeito e interesses pelas terras, essa população foi reduzida. Os grupos indígenas mais numerosos eram o Jê e o Tupi. Várias tribos foram originadas do tronco Tupi (Figura 1) sendo que a família Tupi-guarani apresenta a maior diversidade de dialetos. Em termos estimativos, os linguistas concluem que, cerca de 1300 línguas diferentes eram faladas pelas muitas sociedades indígenas, então existentes no território que corresponde aos atuais limites do Brasil ([www.funai.com.br](http://www.funai.com.br)). Atualmente, cerca de 180 línguas são faladas pelos membros destas sociedades, as quais pertencem a mais de 30 famílias lingüísticas diferentes.

Apesar do decréscimo da população indígena, ainda existe uma grande diversidade de índios no Brasil. Esses ocupam 12,3% do solo brasileiro (107 milhões de hectares). Os índios no Brasil encontram-se distribuídos em 562 locais diferentes no território brasileiro, totalizando cerca de 378.679 índios (Figura 2). São 258 povos (ou etnias) concentrados, em sua maioria (70% do total), numa parcela da Amazônia Legal que engloba seis estados: Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Mato Grosso e Pará. Além desses, devemos considerar ainda a existência de 40 povos isolados na Amazônia ocidental. No estado do Amazonas está a maior concentração de etnias. Entretanto, no estado de Mato Grosso, são encontrados cerca de 32 povos indígenas. Nos últimos dez

anos, houve crescimento da população indígena brasileira (Figura 3) sendo importante um estudo e o registro de seus hábitos alimentares. A população indígena brasileira, de modo geral, é organizada em sistemas tribais, que se caracterizam pelas relações de parentesco, ou seja, a cooperação entre descendentes de um ancestral em comum. No sistema tribal existe a tendência das aldeias se localizarem próximas a rios. Dentro do espaço cercado, as casas ou ocas, são construídas e forma-se o pátio. Nesse pátio, constrói-se a “Takana” (casa dos homens) onde ocorrem as reuniões, rituais e outras celebrações importantes para a aldeia, em que somente os homens participam. Mulheres e crianças participam dos festivais (cauinagem), cerimônias e outras celebrações que ocorrem no pátio da aldeia. Em algumas tribos as casas são construídas de madeira (trançada), preenchida com barro e cobertas com folhas de palmeiras. Em cada casa, geralmente, vive uma família, constituída não apenas de mãe, pai e filhos, mas de um chefe e todos os seus descendentes (Mellati, 1983). Cada aldeia tem um líder (cacique), um vice-cacique e demais representantes que se reúnem e tomam as decisões importantes para o benefício de toda a comunidade. Geralmente não existem diferenças entre o que as pessoas possuem ou fazem, mas sim uma divisão de tarefas entre homens, mulheres e crianças. As mulheres cuidam das crianças, da comida, da colheita, do preparo dos alimentos e bebidas, da fabricação de cerâmica e artesanatos; enquanto os homens plantam, caçam, pescam e se defendem (guerras). O líder de cada aldeia não tem o poder de um rei. Ele trabalha como os outros homens do grupo, e seu poder de liderança é exercido durante as reuniões, nos períodos de guerra ou em situação de calamidade. Quando há alguma ameaça à tribo ou um grande trabalho a fazer, todos se unem. A cultura indígena no Brasil é bastante diversificada e a maioria dos índios brasileiros vive da caça, pesca, coleta ou extrativismo e da agricultura de milho, amendoim, feijão, abóbora, batata-doce e principalmente mandioca. Algumas tribos utilizam os processos fermentativos para produzir alimentos e

bebidas fermentadas com fins nutricionais, estimulantes, medicinais e religiosos. A elaboração desses produtos fermentados baseia-se em conhecimentos empíricos antigos que são transferidos de geração para geração (Balduz, 1979; Melatti, 1983; Wagley, 1988). Os povos indígenas originários da América Latina tradicionalmente têm se caracterizado pelo forte consumo de bebidas fermentadas e de outras substâncias como as plantas, em seus festivais e rituais. Nas comemorações de caráter religioso e social, o consumo dessas bebidas é acompanhado por cantos e danças coletivas que consolidam a unidade do povo e transmitem o seu legado cultural. Por exemplo, o povo Mapuche (Chile) fermenta certos tipos de cultivos distintos, como a maçã e o pinho, que são convertidos em chicha e muzay (Traipi & Griffith, 2006). Essas bebidas não provocam vício nem alterações físicas nos consumidores e não contêm conservantes, corantes artificiais ou extratos que podem gerar alterações ou adulterações na bebida. Além disso, a fermentação não atinge um alto grau de teor alcoólico (Traipi & Griffith, 2006). Há muitos anos, os índios Tapirapé, assim como os demais povos tradicionais da Amazônia, possuem relações íntimas e de profunda familiaridade com o meio ambiente, do qual dependem para suprir suas necessidades nutricionais e/ou para sobrevivência (Wagley, 1988).

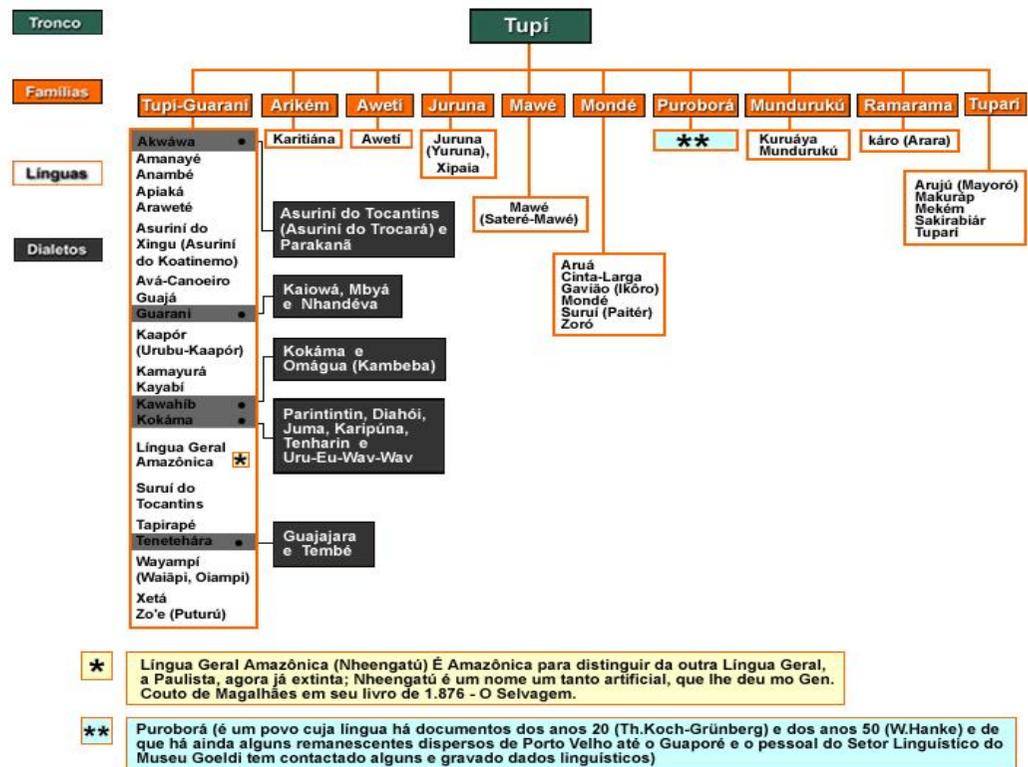


FIGURA 1 Diversidade de línguas e dialetos originados do tronco Tupi. Fonte: Socioambiental, 2009.

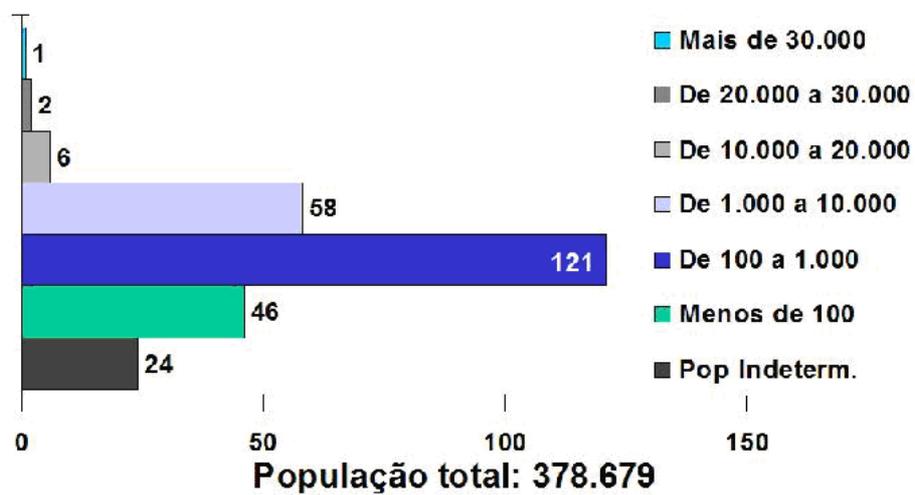


FIGURA 2 Distribuição das 258 tribos indígenas brasileiras conforme sua população total.

Fonte: Associação de Missões Transculturais Brasileiras - AMTB, 2006.

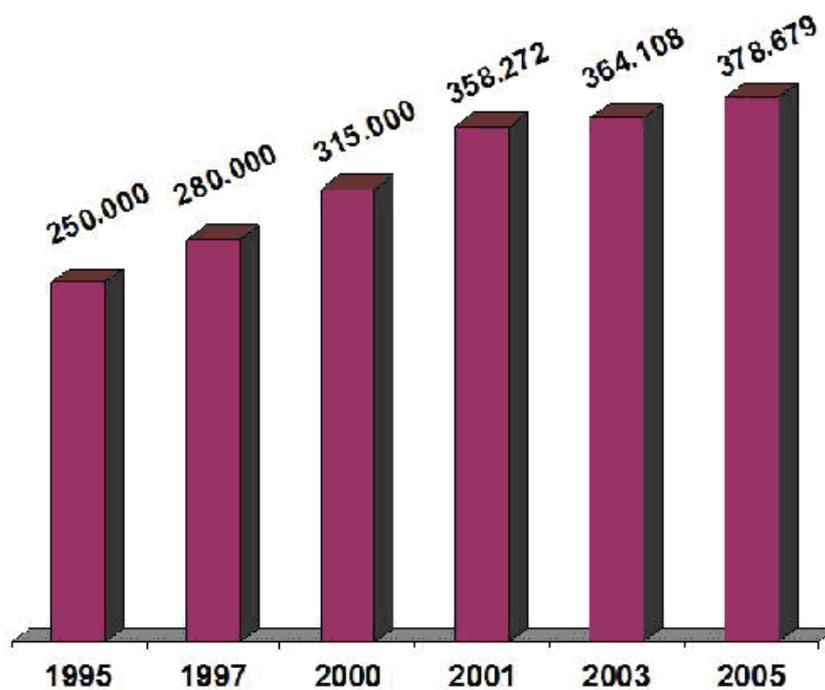


FIGURA 3 Crescimento populacional das tribos indígenas brasileiras.  
 Fonte: AMTB, 2006.

## 2.2 O povo TAPIRAPÉ

Os índios Tapirapé habitaram uma área localizada entre os rios Tocantins e Xingu até o século XVII. Depois, por volta da segunda metade do século XVIII, sua presença foi anotada ao norte do rio Tapirapé, onde se encontram até os dias atuais (Baldus, 1979). Eles habitam duas áreas indígenas, a Tapirapé/Karajá, com 66.166 ha, que foi homologada em 1983, sendo constituída de indivíduos Tapirapé e Karajá, e a Urubu Branco, com extensão de 167533 há, homologada em 1998, onde vivem apenas índios Tapirapé. Na área Urubu Branco existem quatro aldeias que se organizam da seguinte forma: uma

funciona como aldeia sede e as outras três estão anexadas a ela. Cada aldeia tem seus caciques, comprometidos com sua comunidade de forma coletiva (3º Grau Notícias, 2005). Vivem também no Mato Grosso, na área indígena Tapirapé-Karajá, nos municípios de Santa Terezinha e Luciara, e no Pará, na área indígena Karajá, Santana do Araguaia. Em 1990, de acordo com os dados da FUNAI, eram aproximadamente 2100 índios.

As aldeias Tapirapé são denominadas (do norte para o sul): Anapatawa, Xexotawa (grafado “Chichutawa”), Moo’ytawa (“Moutawa”), Makotawa (“Mankutawa”), e Tapi’itawa (“Tampiitawa”) (Wagley, 1988).

Em 1900 os Tapirapé totalizavam aproximadamente 1500 índios habitando cinco aldeias, localizadas próximas à margem esquerda do Araguaia (Wagley, 1988). Essa comunidade pertence ao tronco linguístico tupi-guarani e totalizam atualmente um número aproximado de 650 integrantes (Korira I-Tapirapé, 2006).

Os Tapirapé são prováveis ancestrais dos índios Tupinambás da costa brasileira que devido ao processo de colonização do Brasil, foram forçados a viver sempre migrando a fim de se afastar dos contatos com os brancos. Segundo a tradição Tapirapé, diz-se que esses índios vieram do Norte e do Leste, mudando sempre para o Sul (Baldus, 1979).

De acordo com Wagley (1988), os índios Tapirapé viveram um período em contato com os índios Karajá e Javaé, na Ilha do Bananal, no estado do Tocantins. Devido a alguns desentendimentos foram expulsos por esses, passando a habitar a margem oeste do Rio Araguaia, em Mato Grosso.

Os Tapirapé habitam uma região de floresta tropical, com flora e fauna tipicamente amazônicas. E por serem agricultores, coletores, caçadores e pescadores suas aldeias devem estar próximas a densas florestas, em terrenos altos e inundáveis (Fundação Nacional do Índio - FUNAI, 2005).

Com o reconhecimento da Área Indígena Tapirapé/Karajá em 1983, os Tapirapé passaram a reivindicar seu próprio território. Em 20 de novembro de 1993, 62 índios Tapirapé ocuparam uma fazenda e então reocuparam a aldeia Tapi'itãwa. Em 1994, a presidência da FUNAI aprovou o relatório produzido pelo GT (Grupo Técnico) instituído no ano anterior e encarregado de definir a área Urubu Branco conforme proposta dos Tapirapé. Em outubro de 1996 o Ministro da Justiça, Nelson Jobim, assinou a portaria 599, declarando essa Terra Indígena como sendo de posse permanente dos Tapirapé, a qual foi homologada no mesmo ano (FUNAI, 2005). Atualmente, o povo Tapirapé está reconstituindo o sistema habitacional em cinco aldeias, voltando a repovoar as áreas que tinham sido forçados a “abandonar”.

Para o povo Tapirapé, a cultura tem um significado místico e histórico, sendo repassada de uma geração a outra. Este mesmo autor afirma que para os Tapirapé, os animais, as plantas, os rios e os córregos têm alma, como se fossem membros da aldeia. Dessa forma, respeito e valores são atribuídos à caça, à pesca, coleta e agricultura, e fazem com que essas populações tradicionais da Amazônia tenham relações íntimas e de profunda familiaridade com o meio ambiente. Tendo os sistemas culturais um importante papel na comunidade Tapirapé, isso facilita a utilização e preservação dos recursos naturais para fins culturalmente apropriados.

Segundo Wagley (1988) os Tapirapé, através de suas comemorações festivas, conseguem manter uma relação de respeito com o próximo, valorizando e mantendo uma classe uniforme dentro da aldeia. A morte entre eles sempre foi muito respeitada, a ponto de serem adiados ou até mesmo cancelados os festivais e rituais por um ou mais anos, dependendo do número e os intervalos entre as mortes ocorridas.

De acordo com o levantamento feito pelos alunos da escola Tapirapé, em 1988, o grupo coletava 47 espécies de frutas silvestres que eram utilizadas

como importantes fontes de alimentos. Esses índios possuem um profundo conhecimento botânico da região e aproveitam as espécies vegetais úteis e vitais à sua subsistência. Essas coletas são realizadas em conjunto com a pesca, coleta de ovos de tartarugas, frutas silvestres, mel, cocos e explorando as matas galerias das proximidades (FUNAI, 2005). Alguns tabus alimentares desapareceram por completo da cultura Tapirapé. Isso justifica-se diante do processo de aculturação pelo qual passaram ou mesmo devido à escassez de caça e peixes na região onde se encontra a reserva. Segundo Toral (1994), a relação é basicamente a mesma anotada por Wagley (1988), e a única ressalva a se fazer é que, devido à escassez da carne verificada nos dias de hoje, a maioria das espécies interditadas devido a tabus alimentares, como espécies de veado e tatu, tiveram seu consumo atualmente permitido a sexos e grupos etários aos quais, até a década de 40 e 50, eram proibidos. Toral (1994) também relata que, o abandono do sistema tradicional e o esgotamento dos terrenos próximos à área de refúgio para onde foram transferidos no início da década de 50, causou um decréscimo no rendimento da agricultura. Atualmente, as espécies mais cultivadas são mandioca para a fabricação de farinha, milho, arroz, banana, mamão, mandioca mansa, aipim, cará, batata-doce, abóbora, amendoim, andu (tipo de feijão) algodão. As fontes de proteína animal que fazem parte da dieta dos índios da Tribo Tapirapé são oriundas, principalmente da ingestão das carnes dos animais silvestres, porco queixada, porco caititu, paca, cotia, tamanduá-bandeira, jabuti, quati, macaco-prego, tartaruga, tracajá, veado-campeiro, veado-mateiro, tatu, guariba, anta e pato-do-mato.

Após o nascimento de uma criança na tribo Tapirapé, tanto a mulher quanto o marido seguem a dieta pós-parto que é baseada no consumo da bebida cauim fermentado. Segundo Wagley (1988), após o nascimento de uma criança, a mãe deverá tomar somente cauim durante o primeiro mês. Depois, poderá escolher um tipo de proteína animal (tartaruga, peixe) que comerá com cauim

durante o segundo mês. No terceiro mês da dieta, escolherá outra fonte de proteína. Consequentemente, ao introduzir uma fonte de proteína, poderá continuar a dieta caso a criança não tenha problemas de saúde. Se isso acontecer, os pais terão que retornar ao início da dieta.

Os festivais e rituais encontram-se arraigados na cultura Tapirapé. Em destaque, encontram-se a cauinagem e o kawió. O primeiro – cauinagem – geralmente ocorre para festejar a chegada da colheita em agradecimento à boa produtividade da mãe-terra, em virtude das chuvas ocorridas. O mais importante nesse festival é que o anfitrião da festa oferece a todos os membros da aldeia o que produziu em sua roça (Wagley, 1988). O outro festival celebrado pelos índios Tapirapé – o Kawió – acontece na época de preparação de uma criança para o cargo de cacique. Nesse festival é preparada uma bebida fermentada, obtida do grão de milho maduro, pela família da criança em questão. Geralmente ao ser oferecido aos demais participantes da tribo, esses retribuem com presentes, gerando assim uma distribuição de bens entre os índios da aldeia. Essa atitude impossibilita o acúmulo de bens nas mãos de um ou poucos índios, o que faz com que não exista diferença de classes sociais, dentro da comunidade indígena (Wagley, 1988).

Os Tapirapé em primeiro lugar são horticultores, seguidos por caçadores e pescadores e por último os coletores (Wagley, 1988). Atualmente, continuam mantendo esse mesmo processo para sua alimentação. Assim, os substratos (matéria-prima) para produção de alimentos e bebidas fermentadas, são extraídos diretamente da floresta, do cerrado, ou são cultivados em roças itinerantes. Segundo Wagley (1988), esses índios fazem uso da fermentação há muitos e muitos anos. O principal produto agrícola cultivado pelos Tapirapé é a mandioca, tanto a venenosa quanto a não venenosa e é preparada e consumida de várias maneiras. As mandiocas doces (não venenosa) são cozidas ou assadas. As amargas (venenosas) passam por processamentos variados, envolvendo

fermentação com microbiota ainda desconhecida. Assim como a mandioca, outros substratos também são utilizados para produzir um tipo de bebida conhecida como “cauim” (Kawí). A cultura do povo Tapirapé foi, e continuará sendo capaz de propiciar a harmonia e sobrevivência desses povos da Amazônia. Sobrevivência não somente física, mas social, cultural, econômica e espiritual.

### **2.3 Alimentos fermentados produzidos pelos índios Tapirapé**

Os índios do tronco linguístico Tupi-guarani fazem uso da fermentação na obtenção de uma grande variedade de alimentos e bebidas fermentadas. Para isso, diferentes substratos são utilizados como matéria-prima, destacando-se a mandioca, o arroz, o milho, o amendoim, a seiva de palmeiras e frutos como o ananás e o caju. Muitos alimentos de origem indígena foram adotados pelos colonizadores e atualmente fazem parte da alimentação básica da maioria dos brasileiros. A mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) é nativa do Brasil e, portanto já utilizada pelos povos indígenas mesmo antes da colonização pelos portugueses. Alguns dos alimentos produzidos pelos índios brasileiros a partir da mandioca, como a farinha de mandioca, polvilho, farinha de puba e beiju contribuem com boa parte da dieta da população brasileira. Entretanto, ainda existe grande variedade de alimentos fermentados utilizados pelos índios brasileiros que são desconhecidos da população nacional e internacional.

Os índios da aldeia Tapirapé produzem diferentes alimentos e bebidas fermentadas de modo empírico e artesanal. Dentre os alimentos elaborados pelos índios Tapirapé cita-se o polvilho azedo e doce, farinha de puba, beiju, cauim cozido de arroz, cauim cozido de amendoim, cauim cozido de milho, cauim fermentado, misto e kawió. A seguir são descritos alimentos fermentados produzidos pelos índios da tribo Tapirapé:

### 2.3.1 Polvilho

O tubérculo da mandioca é o substrato utilizado para o preparo do polvilho doce e azedo, farinha de puba e do beiju. O processamento desse tubérculo visa, além da eliminação da toxidez e a preservação, a modificação de suas características reológicas e sensoriais. Segundo Ampe et al. (2001), durante a fermentação, quando se utiliza a mandioca como substrato, o pH decresce rapidamente, igualando-se ao pKa do ácido láctico. O lactato e o acetato são os metabólitos mais importantes encontrados nas amostras dos produtos da fermentação da mandioca, como por exemplo, durante a obtenção do polvilho azedo. Embora não ocorra inoculação e nem suplementação nutricional (Carvalho et al., 1999) durante o processo fermentativo, ocorre o crescimento de diversos micro-organismos naturalmente presentes na matéria-prima, na água e nos tanques de fermentação (Silveira et al., 2000). Leveduras e bactérias do ácido láctico já foram isoladas e identificadas durante a fermentação do polvilho (Silveira et al., 2000; Lacerda et al., 2005). Dentre os produtos fermentados a partir da mandioca, o polvilho tem sido o mais estudado. Em Minas Gerais, o processo fermentativo de mandioca para produção de polvilho azedo tem sido estudado há vários anos (Cereda, 1987; Carvalho et al., 1995; Carvalho et al., 1999; Silveira et al., 2000; Silveira et al., 2003; Lacerda et al., 2005). A microbiota foi caracterizada em feculárias em Minas Gerais durante a produção de polvilho e foram encontradas bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus* e *Lactococcus* (Silveira et al., 2003). *Lactobacillus plantarum* foi o micro-organismo predominante durante a fermentação (Silveira et al., 2003). Recentemente, Lacerda et al. (2005) identificaram bactérias lácticas e leveduras envolvidas no processamento de polvilho azedo. Leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Dipodascus* e *Issatchenchia* foram isoladas e então caracterizadas por técnicas tradicionais e moleculares (sequenciamento da região D1/D2, da subunidade rRNA). Os

resultados apresentados pelos autores Carvalho et al. (1999), Silveira et al. (2003) e Lacerda et al. (2005) indicaram a dominância de bactérias lácticas e a presença de várias bactérias patogênicas, envolvidas na produção de polvilho.

### **2.3.2 Farinha de puba**

A farinha de puba ou carimã, também inicialmente produzida somente pelos índios brasileiros, é atualmente produzida por grande parte da população do Norte e Nordeste do Brasil. A puba (do Tupi, massa azeda de mandioca) é semelhante a diversos alimentos fermentados de origem africana como o fufu e o gari (Oyewole, 2001; Miambi et al., 2003). De acordo com a variedade de mandioca utilizada no preparo da farinha, podem ocorrer variações no conteúdo de açúcares totais, proteínas e fibras no produto final. Cultivares amargas (bravas) apresenta níveis de açúcares totais e proteínas mais elevadas, possuindo baixos níveis de fibras (Padonou et al., 2005). É um alimento muito apreciado pelos Tapirapé, sendo consumida com vários tipos de carnes, principalmente a de peixe.

A microbiota e bioquímica envolvida na fermentação de puba ainda não foram estudadas em detalhes. Almeida et al. (1993) identificou bactérias, leveduras e fungos filamentosos no líquido de fermentação constatando que os ácidos, acético, butírico e láctico predominavam na maceração que se inicia a partir de 48 horas e se completa quando a atividade amilolítica é máxima. Almeida et al. (1993) mostrou que, na pubagem, a microbiota se modifica durante o processo fermentativo, iniciando-se com enterobactérias e corinebactérias, que aos poucos são substituídas por bactérias lácticas e bactérias esporuladas, surgindo, posteriormente, os fungos *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium* e *Aspergillus*. Entre as bactérias, diversos isolados eram produtores de amilases e pectinases. Bactérias lácticas importantes na fermentação da

mandioca, como *Lactobacillus plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, são produtoras de pectinases e fungos do gênero *Aspergillus* são reconhecidamente produtores de enzimas pécnicas, celulolíticas e hemicelulolíticas (Menezes et al., 1998).

### **2.3.3 Beiju**

O beiju é preparado a partir do mesmo substrato utilizado para a farinha de puba (mandioca venenosa), que também passa pelos mesmos processos descritos anteriormente até a obtenção do bolo de massa de mandioca e puba seca. Os indígenas costumam comê-lo com peixe ou outro tipo de carne (Wagley, 1988). A microbiota associada à produção de beiju ainda não foi identificada.

### **2.3.4 Cauim**

Os índios Tapirapé também elaboram bebidas não alcoólicas que são fermentadas a partir de outros substratos diferentes da mandioca, por diferentes técnicas e processamentos, originando a bebida chamada cauim (kawí). Vários substratos são utilizados pelos índios TAPIRAPÉ para produzir essa bebida “cauim”, tais como: arroz; mandioca; milho; amendoim; semente de algodão; bacaba; buriti; banana; abóbora; semente de bananeira brava e demais frutas fermentescíveis. O cauim, de acordo com os procedimentos de preparação pode ser denominado de cauim cozido e/ou cauim fermentado. Ambos são consumidos pelos índios Tapirapé, especialmente por crianças com idade inferior a dois anos. A bebida kawió também é produzida por fermentação, mas é utilizada somente nos festivais de preparação para o cargo de cacique. O processo de preparação da bebida é bem rudimentar e tradicional. A adição do inóculo desencadeia o processo fermentativo, pois a saliva contém a enzima

amilase que age sobre os componentes do amido, principal componente do substrato. A amilase age quebrando esses açúcares complexos, liberando açúcares simples que são utilizados pelos micro-organismos iniciadores do processo fermentativo. Os micro-organismos envolvidos no processo de fermentação dessa bebida e seu metabolismo fermentativo não são conhecidos. A população microbiana identificada em amostras de cauim de mandioca com arroz foi de  $7,9 \times 10^9$  UFC / mL e a de leveduras de  $3,2 \times 10^4$  UFC / mL. Os gêneros de leveduras mais frequentes foram: *Candida*, *Cryptococcus*, *Lypomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Trichosporon* (Schwan et al., 2007). O pequeno número de isolados de bactérias Gram negativas foi representado pelas espécies de *Enterobacter cloacae*, *E. agglomerans* e *Serratia plymuthica*. Entre as bactérias Gram positivas os gêneros mais encontrados foram: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, e *Paenibacillus* (Almeida et al., 2007). Pesquisas ainda deverão ser realizadas para identificação da microbiota envolvida no processo fermentativo e informações sobre a qualidade nutricional dos alimentos produzidos pela população indígena brasileira.

Pesquisas devem ser realizadas para caracterizar a dinâmica populacional da microbiota envolvida no processo fermentativo, buscando informações sobre a qualidade e segurança nutricional dos alimentos e bebidas produzidos pela população indígena brasileira.

#### **2.4 Caracterização bioquímica e molecular de bactérias**

O número de micro-organismos identificados cresce a cada ano, sendo descritos mais de 47.000 fungos, 30.000 protozoários, 26.000 algas, 5.000 bactérias e 1.000 vírus. Esses números são, no entanto, pequenos diante do total de espécies, estimado em cerca de dois milhões (Rosseló-Mora & Amann, 2001). Isso significa que foram descobertas e nomeadas talvez menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbianas (Rosseló-Mora & Amman, 2001). A

principal razão para isso é que, até há um tempo atrás, os micro-organismos tinham que ser cultivados para serem identificados e, além disso, a frequência de ocorrência das populações, a sazonalidade, e em muitos casos, a dependência de hospedeiros e/ou substratos específicos para sua sobrevivência e multiplicação (Torsvik & Ovreas, 2002).

Os isolados Gram-negativos são identificados utilizando kits do Sistema Bac-Tray I, II e III (Difco). Inicialmente, realiza-se o teste para detectar a presença ou ausência da enzima oxidase (cloridrato de N, N, N, N-tetrametil-p-fenilondiamina 1g; 100mL de H<sub>2</sub>O). Os isolados Gram e oxidase negativos são inoculados no sistema Bac-Tray I e II e os Gram negativos e oxidase positivos nos kits do sistema Bac-Tray III.

Os isolados de bactérias Gram-positivos são submetidos a testes de coloração de Gram, motilidade, catalase, oxidase, esporulação e produção de ácido e gás a partir de glicose. Os isolados Gram-positivos e catalase positiva são subdivididos em formadores de esporos (bacilos) e não formadores de esporos (corinebactéria). E os isolados Gram-positivos e catalase negativa (lactobacilos) são subdivididos em homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios. Todos esses grupos são submetidos a provas bioquímicas estabelecidas para cada grupo como descrito anteriormente. Os resultados positivos ou negativos são utilizados para identificar os isolados quanto ao gênero e espécie.

A interpretação dos resultados das provas bioquímicas para identificação dos isolados segue instruções de Macfaddin (1980), “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt et al., 1994), “The Prokaryotes”.

Os fungos leveduriformes são identificados com base em testes bioquímicos e chaves dicotômicas propostas por Barnett et al. (2000) e Kurtzman & Fell (1998).

A identificação e classificação das leveduras é usualmente realizada pela comparação das características morfológicas e fisiológicas, o que em alguns casos pode levar à incorreta classificação da espécie ou à falsa identificação do isolado (Esteve-Zaroso et al., 1999). Esse erro é ainda maior quando os isolados originam-se de regiões tropicais, uma vez que os isolados padrões normalmente são originados de regiões temperadas. A metodologia padrão para a identificação de leveduras requer aproximadamente 90 testes, e o processo é complexo, laborioso e demorado. Com o advento e avanço da tecnologia do DNA recombinante várias limitações dos métodos convencionais de cultivo foram superadas. Recentes progressos em biologia molecular têm levado ao desenvolvimento de novas técnicas para a identificação de leveduras baseada na similaridade ou dissimilaridade de DNA, RNA ou proteínas. Isso inclui padrões de aloenzimas, hibridização DNA-DNA, cariotipagem eletroforética, análise de microsátélites, RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) e RFLP de DNA cromossomal, DGGE (Prakitchaiwattana et al., 2004; Nielsen, et al., 2005; Jespersen et al., 2003; Mills et al., 2002; Scorzetti et al., 2002; Girafa & Neviani, 2001; Chen et al., 2008; Ercolini et al., 2001; Cocolin et al., 2002; Vogelmann et al., 2009; Flórez & Mayo, 2006; Cocolin et al., 2007) e RFLP de DNA mitocondrial. A técnica PCR (polymerase chain reaction) ou reação em cadeia da polimerase desenvolvida por Mullis & Faloona (1987), trouxe grande contribuição para estudos moleculares de diversidade e ecologia microbiana. Essa técnica permitiu a amplificação de sequências de DNA específicas utilizando oligonucleotídeos “*primers*” (Saiki et al., 1988), sendo simples, rápida e de alta sensibilidade para pequenas quantidades de DNA molde.

Um importante avanço na área de exploração da biodiversidade da ecologia microbiana foi o uso do rRNA, uma impressão digital molecular que

pode ser utilizada para identificar micro-organismos permitindo o desenvolvimento de técnicas independentes do cultivo para análise da diversidade (Amann et al., 1995). Para a amplificação dos espaçadores são utilizados *primers* já conhecidos e utilizados de maneira geral para bactérias e fungos, como por exemplo, os *primers* ITS1 e ITS4, pelo fato de corresponderem a regiões bastante conservadas do genoma (White et al., 1990).

Utilizando-se iniciadores específicos para região conservada rRNA é possível, através de PCR, gerar produtos com tamanho de fragmentos semelhantes, mas com composição de bases diferentes. A variabilidade da sequência pode ser analisada através de eletroforese em gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante ou DGGE (Muyzer et al., 1993). A eletroforese em gel, com gradiente de desnaturação (DGGE) de amplicons de rRNA 16S e 18S, tem sido utilizada para caracterizar ecossistemas complexos. Segundo essa técnica, o DNA total do habitat de interesse é extraído e uma região hipervariada do rRNA 16S para micro-organismos procarióticos e 18S para micro-organismos eucarióticos é amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR). Amplicons de RNA de mesmo tamanho, mas com composição distinta, podem ser separados pela eletroforese em gel com gradiente de desnaturação, gerando um perfil genotípico da comunidade. A técnica de DGGE foi inicialmente introduzida na ecologia microbiana por Muyzer et al. (1993). Nessa técnica, utilizam-se géis de poliacrilamida contendo um gradiente linear desnaturante (de uréia e formamida), onde moléculas de DNA de mesmo tamanho, porém com diferentes sequências, apresentam perfis migratórios diferentes. Essa separação baseia-se em um princípio físico simples de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula em relação à sua conformação, que pode ser helicoidal, parcialmente desnaturada ou fita simples. As moléculas parcialmente desnaturadas, movimentam-se mais lentamente no gel do que moléculas em fita

dupla (Muyzer & Smalla, 1998). Durante a eletroforese em condições crescentes de desnaturação, os fragmentos permanecem em dupla fita até que eles atinjam as condições necessárias para a desnaturação dos domínios da molécula chamados 'melting domains'. Esses domínios caracterizam-se por possuírem condições de desnaturação idênticas, fazendo com que, a uma determinada concentração de desnaturante ocorra desnaturação completa nesses domínios, situados ao longo da molécula. Quando há a desnaturação de um domínio, processa-se transição na conformação da molécula, que passa de helicoidal para parcialmente desnaturada e a migração da molécula no gel é interrompida (Rosado & Duarte, 2002). Usando-se a técnica de DGGE, pode-se detectar aproximadamente 50% das variações de sequências em fragmentos de DNA, com até 500 pares de bases. Essa porcentagem pode ser aumentada para quase 100% quando se acrescenta a um dos lados do fragmento de DNA um segmento rico em GC (grampo de GC). Esse grampo de GC, quando anexado à extremidade 5' de um dos iniciadores, é amplificado por PCR juntamente com o DNA molde, agindo como um domínio de alta resistência à desnaturação, que impede a dissociação das duas fitas do DNA em fitas simples. Normalmente, o comprimento do grampo de GC varia entre 30 e 50 nucleotídeos (Muyzer & Smalla, 1998). O DNA presente em um gel de DGGE pode ser transferido para membranas de náilon e hibridizado com sondas específicas para detecção de grupos microbianos específicos. Além disso, bandas podem ser eluídas do gel, reamplificadas e sequenciadas, permitindo a análise de homologia com sequências depositadas em banco de dados (Muyzer & Smalla, 1998).

Cacau, suco de uva e a bebida fermentada cauíim constituem um ambiente caracterizado por um baixo pH e alta concentração de carboidratos fermentescíveis, possivelmente oferecendo ambiente propício para o crescimento de leveduras (Mills et al., 2002; Sipiczki, 2003).

Porém, os métodos tradicionais de isolamento são parcialmente seletivos e excluem parte da comunidade microbiana existente na amostra a ser analisada (Chen et al., 2008). Assim, o PCR-DGGE tem surgido como uma das técnicas moleculares mais promissoras para o estudo do perfil de ecologia microbiana de habitats naturais ou desconhecidos, tendo se expandido para alimentos e bebidas (Muyzer & Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Giraffa & Nievani, 2001; Ampe et al., 1999; Ercolini et al., 2001; Cocolin et al., 2002).

Mesmo assim, espécies que se encontram abaixo de 4% da microbiota de leveduras podem não ser cultivadas pelo método tradicional. Além disso, o limite de detecção da técnica DGGE é de 1% da microbiota de leveduras (Prakitchaiwattana et al., 2004).

Tem sido sugerido que, em alguns habitats naturais, de 90 a 99% da microbiota pode ser população viável, mas não cultivável (PVNC) pelos métodos tradicionais (Amann et al., 1995; Ercolini et al., 2001). Alguns autores relatam que *Candida zemplinina* não tenha sido isolada por métodos tradicionais de cultivo por ser uma (PVNC) em fermentação de vinho e cacau (Mills et al., 2002; Nielsen et al., 2005).

A técnica DGGE é uma ferramenta viável para a detecção de organismos (PVNC), o que lhe confere certa vantagem (Muyzer & Smalla, 1998; Kurtzman & Robnett, 1998; Scorzetti et al., 2002; Giraffa & Neviani, 2001) com as demais técnicas moleculares.

Segundo Prakitchaiwattana et al. (2004), o DNA de outros grupos microbianos pode interferir na amplificação do DNA de interesse e comprometer a confiança e qualidade dos dados obtidos por DGGE. Porém, espécies que apresentam em grande população na amostra a ser analisada geram suficiente quantidade de DNA molde, tendo assim, grande probabilidade de detecção.

Portanto, o conhecimento sobre a diversidade microbiana presente durante fermentação da bebida indígena “cauim” é de grande importância para

estudos futuros, por exemplo, a seleção de estirpes que possam ser usadas como culturas starter.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

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**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 146-151, Nov. 2007.

ALMEIDA, P. F. de; MORAES, I. O.; CASTRO, R. C.; MENEZES, T. J. B. Fermentação de mandioca para produção de puba carimã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 113-120, 1993.

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

AMPE, F.; BENOMAR, N.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J. P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a maize-fermented dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5464-5473, 1999.

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 hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 45-54, Apr. 2001.

ASSOCIAÇÃO DE MISSÕES TRANSCULTURAIS BRASILEIRAS.  
Disponível em: <[www.amtb.org.br](http://www.amtb.org.br)>. Acesso em: 08 set. 2006.

BALDUS, H. Os grupos de comer e os grupos de trabalho dos Tapirapé. In: \_\_\_\_\_, **Ensaios de etnologia brasileira**. São Paulo: Ed. Nacional, 1979. p. 44-59. (Brasílica, 101)

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeast**: characteristic and identification. 3. ed. Cambridge: University, 2000. 1139 p.

CARVALHO, E. P.; CANHOS, V. P.; VILELA, E. R.; ASQUERI, E. R.; CARVALHO, H. P. Determinacion de la flora microbiana de la fecula de yuca fermentada (polvilho azedo) durante las diferentes etapas de procesamiento. **Alimentaria**, Madrid, n. 305, p. 97-103, 1999.

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

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

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, n. 25, p. 492-501, Jan. 2008.

COCOLIN, L.; AGGIO, D.; MANZANO, M.; CANTONI, C.; COMI, G. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast population in raw milk. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 5, p. 407-411, 2002.

COCOLIN, L.; DIEZ, A.; URSO, R.; RANTSIOU, K.; COMI, G.; BERGMAIER, L.; BEIMFOHR, C. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 100-109, Nov. 2007.

ERCOLINI, D. G.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. The potencial of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 24, p. 610-617, 2001.

ESTEVE-ZARZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 329-337, 1999.

FLÓREZ, A. B.; MAYO, B. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 110, p. 165-171, 2006.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO. **Museu do índio**. Disponível em: <<http://www.museudoindio.org.br/>>. Acesso em: 28 jun. 2005.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p.19-34, July 2001.

HAMMES, N. W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera lactobacillus and carnobacterium. In: BALLOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. H.; SCHLEIFER, K. D. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v. 2, p. 1535-1594.

HOLZAPFEL, W. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. **Food Control**, Oxford, v. 8, n. 5/6, p. 241-258, Oct./Dec. 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

JESPERSEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 191-200, Apr. 2003.

KORIRA I-TAPIRAPÉ, N. **A origem dos peixes**. Disponível em: <<http://www.unemat.br/~indigena/jornal9/noticia08.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2006.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Ed.). **The yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdan: Elsevier, 1998. 79 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large-subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 331-371, 1998.

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**, Amsterdam, v. 105, p. 213-219, 2005.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527 p.

MELATTI, J. C. **Índios do Brasil**. 48. ed. São Paulo: Hucitec, 1983. 220 p.

MENEZES, T. J. B. de.; SARMENTO, S. B. S.; DAIUTO, E. R. Influência de enzimas de maceração na produção de puba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 112-118, 1998.

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**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 11-120, Apr. 2003.

MILLS, D. A.; JOHANNSEN, E.; COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4884-4893, Oct. 2002.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Oxford, v. 2, n. 3, p. 317-322, June 1999.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 127-141, 1998.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, Mar. 1993.

NIELSEN, D.S.; HØNHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations investigated using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 271-284, Mar. 2005.

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

PADONOU, W.; MESTRES, C.; NAGO, C. M. The quality of boiled cassava roots: instrumental characterization and relationship with physicochemical properties and sensorial properties. **Food Chemistry**, London, v. 89, n. 2, p. 261-270, Feb. 2005.

PEDERSEN, C. S. **Microbiology of food fermentations**. Westport: AVI, 1979. 778 p.

PRAKITCHAIWATTANA, C. J.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 4, n. 8, p. 865-877, Sept. 2004.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F. Utilização de eletroforese em gel com gradientes de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura para estudar a diversidade microbiana. In: MELLO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Ed.). **Genética e melhoramento de microrganismos**. São Paulo: USP, 2002. p. 97-128.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 39-67, 2001.

SAIKI, R. K.; GELFAUD, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washington, v. 239, p. 487-494, 1988.

- SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 966-972, Sept. 2007.
- SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large-subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Oxford, n. 2, p. 495-517, 2002.
- SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P. de; PÁDUA, I. P. M.; DIONÍZIO, F. L.; MARQUES, S. C. Isolamento e caracterização da microbiota ácido-lática envolvida no processo fermentativo para produção do polvilho azedo. **Pro-Homine**, [S.l.], v. 2, p. 7-15, 2003.
- SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P. de; PILON, L.; SCHWAN, R. F. Aspectos gerais e microbiológicos da fermentação da fécula de mandioca para produção de polvilho azedo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68/69, p. 26-31, 2000.
- SIPAICZKI, M. *Candida zemplina* sp. nov., na osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. **International Journal of Systematics Bacteriology**, Washington, v. 53, p. 2079-2083, 2003.
- SOCIOAMBIENTAL. Disponível em: <<http://www.socioambiental.org/>>. Acesso em: 10 jun. 2009.
- STEINKRAUS, K. H. **Handbook of indigenous fermented foods**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 792 p.
- TORAL, A. A. de. Disponível em: <<http://www.socioambiental.org/pib/epi/tapirape/tapirape.shtm>>. Acesso em: 10 mar. 2005.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 240-245, June 2002.

TOU, E. H.; GUYOT, J. P.; MOUQUET-RIVIER, C.; ROCHETTE, I.; COUNIL, E.; TRAORÉ, A. S.; TRÈCHE, S. Study through surveys and fermentation kinetics of the traditional processing of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) into ben-saalga, a fermented gruel from Burkina Faso. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 1, p. 52-60, 2006.

TRAIPI, N.; GRIFFTH, M. **O abuso do álcool e de outras substâncias pelos povos indígenas**. Disponível em: <<http://www.pabo.org/portuguese/ad/indign-v1e1-por.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2006.

UNEMAT, 2006. Disponível em: <<http://www.unemat.br/~indigena/jornal9/noticia08.htm>>. Acesso em: 28 fev. 2006.

VOGELMANN, S. A.; SEITTER, M.; SINGER, U.; BRANDT, M. J.; HERTEL, C. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 130, n. 3, p. 205-212, Apr. 2009.

WAGLEY, C. **Lágrimas de boas vindas**: os índios Tapirapé do Brasil Central. Belo Horizonte: Itatiaia, 1988. 304 p.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. New York: Academic, 1990. p. 315-322.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE CAUINS PREPARADOS PELA TRIBO TAPIRAPÉ, MATO GROSSO, BRASIL**

## 1 RESUMO

Os índios da aldeia Tapirapé produzem diferentes alimentos e bebidas fermentadas de modo empírico e artesanal. Para o preparo desses alimentos são utilizados diversos substratos como cauim de milho (verde), de arroz, mandioca (puba), amendoim, banana, semente de algodão, bacaba, abóbora e semente de banana-brava. Objetivou-se neste trabalho, determinar as características microbiológicas e físico-químicas do cauim, obtido de diversas fontes, elaborado na aldeia Tapi'itãwa. O desenvolvimento desse estudo foi realizado inicialmente por entrevistas com os indígenas, buscando saber os tipos de alimentos e bebidas produzidos, a matéria-prima utilizada e o modo de preparo. Três bebidas foram preparadas com substratos cozidos e por processo fermentativo. Mandioca, arroz, amendoim e sementes de algodão foram os substratos utilizados na elaboração das bebidas e foram inoculados com o líquido resultante da mastigação de batata-doce. As bebidas foram preparadas e amostras foram coletadas para posterior análise microbiológica e físico-químicas (pH, proteínas, acidez total e amido e teores de carboidratos, álcoois e ácidos orgânicos por CLAE). Para o cauim de mandioca com arroz, com o decorrer da fermentação, houve aumento dos valores de ácido láctico e acético e aumento dos valores de pH, com valores finais de 7,36 g/L; 0,86 g/L e 3,83 respectivamente, na amostra T48 h de fermentação. Em geral, os carboidratos tenderam a diminuir com o tempo de fermentação juntamente com os valores de amido. Os valores de proteína não variaram com o tempo de fermentação (média de 3,33%). A bebida cauim de amendoim com arroz apresentou diminuição nos valores de pH, amido e proteína (4,0, 0,81% e 3,94%), no final do processo fermentativo. Os valores de carboidratos tenderam a aumentar no início do processo fermentativo (glicose 1,88 g/L, T8 h; sacarose 50,52 g/L, T16 h e maltose 50,36 g/L, T16), passando a diminuir a partir dessas amostras até as 48 h de fermentação. Para essa bebida, as concentrações de etanol aumentaram com a fermentação, mas foram sempre inferiores a 0,31 g/L. Dentre os ácidos analisados, destaca-se o láctico que apresentou maiores concentrações, sendo de 26,9 g/L na amostra T0, aumentando para 64,82 g/L, no final do processo fermentativo. O ácido tartárico que não foi detectado nas amostras SF e T0, mas apresentou 30,61 g/L na amostra T8, variando durante a fermentação e atingindo 34,17 g/L na amostra T48. Para cauim de semente de algodão com arroz, os valores de pH e amido decresceram para 4,76 (T48 h) e 0,99% (T48 h), respectivamente. Os valores de proteína variaram de 4,84% (T16 h) a 2,44% (T32 h). Os valores de carboidratos foram inferiores aos das demais bebidas, sendo que o carboidrato maltose não foi detectado nas amostras analisadas. Os valores de ácido láctico só foram detectados a partir da amostra T40 h, atingindo maior valor na amostra T48 (23,96 g/L). O ácido cítrico, embora não tenha sido detectado nas amostras

T0, T16 e T24 h, apresentou maior valor que os demais no final do processo fermentativo (64,71 g/L). As concentrações dos demais ácidos variaram de acordo com o tempo de fermentação. Os valores de etanol aumentaram para 0,76 g/L na amostra T32, diminuindo para 0,37 g/L no final do processo fermentativo. Os Tapirapé utilizam cauim no seu cotidiano, comemorações festivas e rituais, sendo consumido por infantes, crianças e adultos. A fermentação prolonga o tempo de consumo ou a duração dos produtos, propiciando melhoria no sabor e aroma das bebidas, através das transformações dos açúcares ou ácidos pelos micro-organismos fermentadores. A inoculação propicia a quebra de açúcares complexos em açúcares simples, desencadeando o processo fermentativo.

**Palavras-chave:** Aldeia Tapi'itãwa, amendoim, arroz, bebidas indígenas, cauim, mandioca, processo fermentativo e semente de algodão.

## 2 ABSTRACT

The Indians of the Tribe Tapirapé produce different foods and fermented beverages. For the preparation of these foods several substrates are used, such as rice, cassava (Puba), peanuts, banana, cotton seed, bacaba, pumpkin seeds and banana. The objective of this study was to determine the microbiological and physical-chemical properties of cauim, obtained from various sources. The development of this study was initially carried out by interviews with the Indians, seeking to know the types of foods and beverages produced, the *raw* material used and the mode of preparation of them. Three beverages were prepared by cooking and fermentation process. Cassava, rice, peanut and cotton seed were the substrates used in the preparation of beverages and were inoculated with the liquid resulting from chewing sweet potato. The cauim were prepared and samples were collected for microbial and physicochemical analysis (pH, protein, total acidity and starch and concentrations of carbohydrates, alcohols and organic acids by HPLC). For the cauim produced from cassava and rice, there was an increase of both lactic acid and acetic acid and an increase in pH, with final values of 7.36 g / L, 0.86 g / L and 3.83 respectively during the 48 h of fermentation. In general, carbohydrates had the tendency to decrease with time of fermentation along with the values of starch. Protein levels did not vary during fermentation (3.33%). Cauim prepared from peanut and rice showed a decrease in pH, starch and protein (4.0, 0.81% and 3.94%) at the end of the fermentation process. The values of carbohydrates increased at the beginning of the fermentation process (glucose 1.88 g / L, T8 h, sucrose 50.52 g / L, T16 h and maltose 50.36 g / L, T16), and decreased afterwards until the end of fermentation. For this beverage, the ethanol concentration increased with fermentation, but was always below 0.31 g / L. Among the acids analyzed, the lactic acid showed the highest concentrations, being 26.9 g / L at T0 sample, increasing to 64.82 g / L at the end of the fermentation process. The tartaric acid was not detected in SF samples and T0, but showed concentrations of 30.61 g / L in the sample T8, varying during fermentation and reached 34.17 g / L in sample T48. For cauim elaborated from cotton seed and rice, the pH and starch decreased to 4.76 (T48 h) and 0.99% (T48 h), respectively. Protein values ranged from 4.84% (T16 h) 2.44% (T32 h). The values of carbohydrates were lower than those of other beverages, and the maltose was not detected in any samples. The values of lactic acid were only detected from the sample T40 h, reaching higher values in sample T48 (23.96 g / L). Citric acid, although was not detected in samples T0, T16 and T24 h, showed a higher value than the others cauim at the end of fermentation (64.71 g / L). The concentrations of all acids varied according to fermentation time. The values of ethanol increased to 0.76 g / L in sample T32, decreasing to 0.37 g / L at the end of the fermentation

process. Tapirapé people use cauim in their daily diet as staple food, festivals and ritual celebrations, being consumed by infants, children and adults. Fermentation prolongs the time of consumption or duration of products by improvement of flavor and aroma of the beverage through the transformation of sugars and acids by fermenting micro-organisms. Inoculation provides the breakdown of complex sugars into simple sugars, triggering the fermentation process.

**Keywords:** Village Tapi'itãwa, peanuts, rice, Indian beverages, cauim, cassava, fermentation and cotton seed.

### 3 INTRODUÇÃO

Os povos indígenas têm se caracterizado pelo forte consumo de bebidas fermentadas tradicionais e pelo uso frequente de outras substâncias, extraídas de plantas, em seus festivais e rituais. Nas comemorações de caráter religioso e social, o consumo dessas bebidas é acompanhado por cantos e danças coletivas que consolidam a unidade do povo e transmitem seu legado cultural (Traipi & Griffith, 2006). Várias tribos indígenas brasileiras empregam processos fermentativos no preparo de alimentos e bebidas, seja na Amazônia (tribo Araweté), na região do Xingu (tribo Juruna) ou na região central do país (tribo Tapirapé). O povo Mapuche da Argentina utiliza a maçã (*Malus* sp.) e o pinho na obtenção de bebidas fermentadas de baixo teor alcoólico, conhecidas como chicha e muzay (Traipi & Griffith, 2006). Outras tribos indígenas, como os Araweté da Amazônia, os Kayapó do Xingu, os Karajá e Javaé da Ilha do Bananal e os Tapirapé utilizam a fermentação para produzir alimentos e bebidas.

Os Tapirapé habitam uma região de floresta tropical, com flora e fauna tipicamente amazônicas. Por serem agricultores, coletores, caçadores e pescadores, suas aldeias devem estar próximas a densas florestas em terrenos altos e inundáveis. Os Tapirapé historicamente vivem da horticultura, valendo-se da caça e da pesca, secundariamente, e da coleta, como atividade minoritária, para subsistir (Wagley, 1988). Assim, os substratos (matéria-prima), para produção de alimentos e bebidas fermentadas, são cultivados em roças itinerantes ou são extraídos diretamente da floresta e do cerrado.

Segundo Wagley (1988), o principal produto agrícola cultivado pelos Tapirapé era a mandioca, tanto a brava quanto a mansa, preparada e consumida de várias maneiras. As doces (não venenosas) eram cozidas ou assadas, enquanto as amargas (venenosas) precisavam passar por um processamento prévio, envolvendo fermentação.

A diversidade de alimentos e bebidas fermentadas produzidas em todo o mundo é grande. Dentre esses, citam-se a agbelima produzida a partir de mandioca, consumida em Gana, Togo e Benin (massa tipo pão) com *Lactobacillus* (Lb.) spp., *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus* spp., e *Bacillus* spp., predominantes durante o processo fermentativo (Amoa-Awua et al., 1996; Mante et al., 2003). A Boza, produzida na Bulgária a partir de milho, trigo e arroz, e fermentação promovida pela mistura de leveduras e bactérias do ácido láctico (Blandino et al., 2003). E a sobia preparada a partir do trigo e consumida na Arábia Saudita, fermentada por *Lb. cellobiosus*, *Lb. buchineri*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii*, *Leuconostoc lactis* e *Pediococcus pentosaceus*. Coliformes como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* (E.) *aerogenes*, *E. sakazakii*, *E. cloacae* e *Serratia liquefaciens*. E leveduras como *Candida* (C.) *tropicalis*, *C. cifferii*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *Kloeckera japonica* e *Rhodotorula rubra* (Gassem, 2002).

Vários substratos são utilizados pelos índios Tapirapé para produzir a bebida fermentada “cauim” tais como, mandioca, arroz, amendoim, milho e a semente de algodão. Esses substratos são processados de formas diferenciadas de maneira tradicional e rudimentar, conferindo característica peculiar a cada uma das bebidas.

Verificando a importância social e cultural dessas bebidas no uso diário e comemorações festivas, o ambiente de preparação, a fonte de inóculo e como se distribuem as tarefas de preparação e produção dessas bebidas, objetivou-se caracterizar físico-química e microbiologicamente o cauim preparado com a mistura de diferentes substratos: arroz (*Oryza sativa* L.), mandioca (*Manihot esculenta* ranz L.), batata-doce (*Ipomoea batatas*, L.), amendoim (*Arachis hypogaea*, L.) e semente de algodão (*Gossypium hirsutum* L.).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado junto ao povo Tapirapé, na aldeia Tapi'itãwa, nas imediações da Serra do Urubu Branco, a aproximadamente 32 km de Confresa, a 10,8° de latitude sul e a 51,3° de longitude oeste, no extremo norte do estado de Mato Grosso, Brasil. A região tem clima equatorial quente e úmido (três meses secos), com vegetação de Transição – Amazônia e Cerrado (Miranda & Amorim, 2000).

Visitas foram realizadas com o objetivo de fazer o levantamento dos alimentos e bebidas fermentadas produzidos pelos índios Tapirapé. Assim, observou-se o ambiente de preparação, recipientes utilizados, fonte de substrato ou matéria-prima, técnicas de preparo, tempo de preparação, consumo e armazenamento.

Foram utilizados para a produção de cauim os seguintes substratos: mandioca (*Manihot esculenta* L.), semente de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), amendoim (*Arachis hypogaea* L.), arroz (*Oryza sativa* L.) e batata-doce (*Ipomoea batatas* L.).

### 4.2 Preparo de cauim cozido e fermentado

#### 4.2.1 Cauim de mandioca (brava) com arroz

Foram utilizados como substrato, para preparo do cauim, mandioca brava (puba pilada, 3 Kg) e arroz limpo (sem casca, 3 kg), para o preparo de, aproximadamente, 10 litros de cauim.

Para obtenção da puba, as raízes de mandioca foram colhidas na roça dos Tapirapé, limpas, picadas e colocadas, com casca, em saco de linhagem, os quais foram imersos em recipiente com água (3 litros de água para cada quilo de

mandioca) e deixados de molho por três a quatro dias (Figura 1), favorecendo a hidrólise das fibras da mandioca e liberação de compostos cianogênicos. Depois desse período a casca foi retirada e as raízes fermentadas foram secas ao sol. Depois de seco esse substrato foi pilado para obter a farinha de mandioca puba.

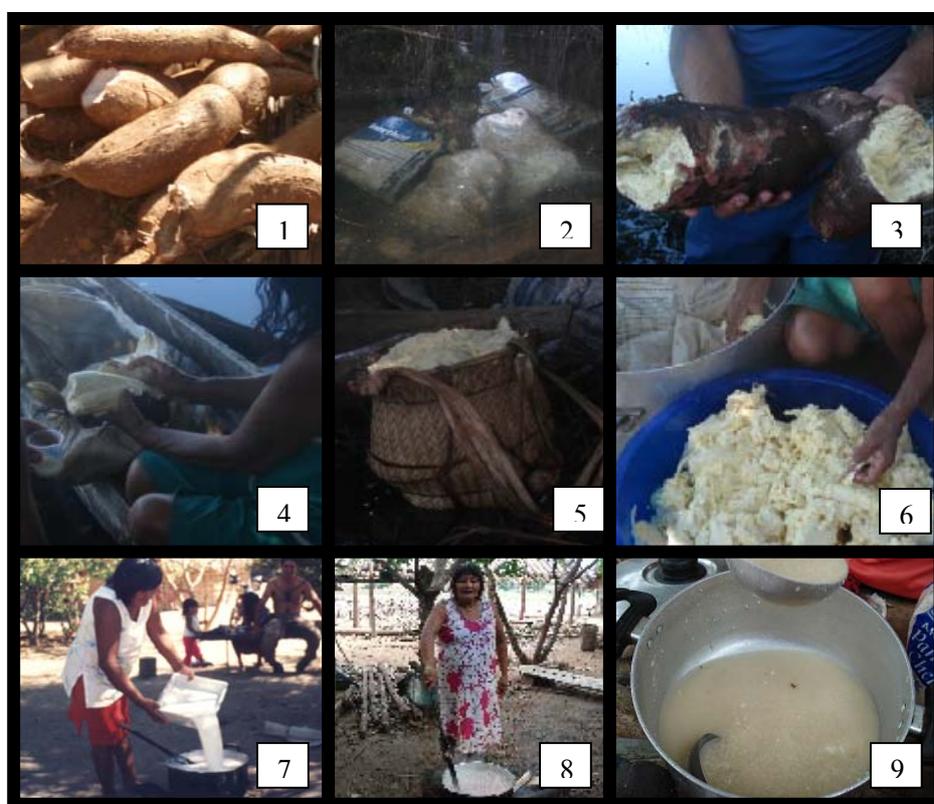


FIGURA 1 Processamento dos substratos (pubagem – fotos 1 a 6) para produção de caim de mandioca com arroz (fotos 7 a 9).

O arroz foi adquirido no mercado local da cidade de Confresa. O arroz foi deixado de molho em água (1:2) para umedecer, durante 10 a 20 minutos (Figura 2), findos os quais retirou-se a água e o arroz úmido foi pilado para obter a farinha de arroz utilizada no preparo da bebida.

A farinha de arroz foi adicionada em água quase em fervura para iniciar o cozimento dos substratos. Em seguida, a farinha de puba foi adicionada. Durante o cozimento, a mistura foi homogeneizada continuamente durante 60 minutos, tempo necessário ao completo cozimento. Nessa etapa, obteve-se o cauim cozido (mingau) (Figura 2). Para o preparo da bebida de cauim (cauim fermentado), aproximadamente cinco litros do cauim cozido foi inoculado com 150 a 200 mL do líquido da mastigação de batata-doce crua. Após inoculação, o recipiente foi coberto e deixado em repouso durante 24 horas, para fermentar, obtendo como produto final o cauim fermentado de mandioca com arroz (bebida fermentada).



FIGURA 2 Fluxograma geral de produção de cauim cozido e cauim fermentado.

#### 4.2.2 Cauim de amendoim com arroz

Foram utilizados 2,5 Kg de amendoim sem casca (com película) e 2,5 Kg de arroz limpo sem casca para o preparo deste cauim.

O amendoim foi pilado sem necessidade de secagem e remoção da película. A farinha de amendoim obtida foi transferida para recipiente, contendo cinco litros de água e submetida ao cozimento (Figura 3).



FIGURA 3 Processamento dos substratos para produção de cauim de amendoim com arroz.

Durante essa etapa, o óleo de amendoim foi removido e a solução foi agitada constantemente para homogeneização do substrato. Após 20 minutos de cozimento da farinha de amendoim, adicionou-se a farinha de arroz (2,5 Kg), obtida a partir do processo descrito para cauim de mandioca com arroz. Volumes de água foram adicionados à mistura para obtenção da fluidez desejada e favorecer a homogeneização. O ponto de cozimento foi observado de acordo com o amolecimento dos grânulos das farinhas de amendoim e arroz ou quando a mistura apresentou consistência semelhante a mingau (cauim cozido).

O cauim de amendoim com arroz foi submetido à fermentação, como descrito para o cauim de mandioca com arroz, para obtenção da bebida fermentada de cauim.

#### **4.2.3 Cauim de semente de algodão com arroz**

Este cauim foi obtido a partir de 3 Kg de semente de algodão desfiada e 3 Kg de arroz limpo sem casca.

As sementes de algodão, desfiadas, foram colocadas em recipiente com água à temperatura ambiente, por período de três a quatro horas, para intumescimento. Durante o período de intumescimento são preparadas as brasas e cinzas que serão empregadas no cozimento das sementes de algodão. Os Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa queimaram garapa (*Apuleia sp*), amarelim (*Chlorophora tinctoria*) ou angico (*Piptadenia sp*), para obtenção das brasas e cinzas. As cinzas e as brasas foram adicionadas em recipiente de alumínio, contendo aproximadamente 10L de água, homogeneizadas, deixando-se a mistura em repouso por 30 a 40 minutos. Depois desse tempo, necessário à sedimentação do material sólido, as brasas e demais partículas em suspensão foram retiradas e descartadas. O líquido resultante do material sedimentado obtido, chamado água de cinzas, foi utilizado para o preparo do cauim de algodão e arroz.

As sementes de algodão intumescidas foram piladas e lavadas em água de cinza, sucessivamente, em peneira até que toda a polpa da semente fosse dissolvida. Em seguida, a solução de polpa de semente de algodão, juntamente com o arroz previamente umedecido, foi aquecida e homogeneizada até cozimento, obtendo-se o cauim cozido.

O cauim de algodão com arroz foi submetido à fermentação, como descrito para o cauim de mandioca, porém, sem inoculação com a mastigação da batata-doce. Deixou-se fermentar durante 24 horas, obtendo o cauim fermentado de semente de algodão com arroz e consumido até 48 horas, como descrito para os demais tipos de cauim.

#### **4.3 Amostragem**

Foram coletadas amostras de cauim cozido (testemunha) nos mesmos tempos em que foram coletadas amostras do cauim cozido submetido à fermentação, ou seja, 0h, 12h, 24h, 36h e 48h para o cauim de mandioca com arroz e 0h, 8h, 16h, 24h, 32h, 40h e 48h para os cauims de amendoim com arroz e semente de algodão com arroz. Em cada tempo, 20 mL das amostras foram coletadas e transferidas para frascos Erlenmeyer, de 250 mL de capacidade, contendo 180 mL de água peptonada estéril (0,1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,03%  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ). A mistura foi então homogeneizada em Stomacher e diluições decimais foram preparadas para realização das análises microbiológicas. As análises físico-químicas foram realizadas com as amostras homogeneizadas em Stomacher, sem emprego de diluições decimais.

#### **4.4 Análises microbiológicas**

A enumeração de micro-organismos foi realizada utilizando seis diferentes meios de cultura. Plate count agar (PCA) para o total de bactérias mesófilas, e MYGP ágar (0,3% extrato levedura, 0,3% extrato de malte, 0,5%

peptona, 1,0% de glicose, 2,0% agar adicionado de 100 mg de cloranfenicol e 50 mg de clortetraciclina por 1000 ml para inibir o crescimento bacteriano) para contagem de leveduras, BDA (batata 2,0%, glicose 2,0%; ágar 1,5%) para o crescimento de fungos filamentosos e MRS ágar para bactérias lácticas. Após o espalhamento, as placas foram incubadas a 28 ° C por 48h para bactérias e 5 dias para fungos filamentosos e leveduras, para avaliação do crescimento.

#### **4.5 Caracterização físico-química**

Acidez, pH, amido e conteúdo protéico foram determinados no Laboratório do Departamento de Ciência dos Alimentos (UFLA), de acordo com a metodologia proposta pela Association of Official Agricultural Chemists - AOAC (1992).

Etanol, ácidos orgânicos (ácido acético e ácido láctico) e o perfil de carboidratos (maltose, glicose, sacarose e frutose) foram analisados no Laboratório do Departamento de Biologia - Microbiologia Agrícola (UFLA), durante a fermentação (Schwan et al., 2001). As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, modelo LC-10Ai, Shimadzu Corp, Japão), equipado com duplo sistema de detecção constituído por detector UV e detector por índice de refração (SPD-10Ai, RID - 10). A coluna (Shimadzu, Shim-pack SCR-101H, de exclusão iônica) foi operada a temperatura de 40 °C, para atingir separação cromatográfica. Ácidos, açúcares (maltose, frutose, glicose e sacarose), e etanol foram eluídos com ácido perclórico 100 mM a um fluxo de 0,8 mL/ min. Os ácidos foram detectados tanto por absorvância UV (210 nm), quanto por índice de refração, enquanto açúcares e etanol foram detectados apenas pelo detector de índice de refração. Açúcares, ácidos e etanol foram identificados e suas concentrações foram determinadas por comparação com os tempos de retenção dados pelas

respectivas curvas de calibração. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O coeficiente de variação foi inferior a 5%.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Cauim cozido e fermentado**

Os índios Tapirapé utilizam a fermentação para produzir alimentos e bebidas há muitos anos, passando de geração a geração. As bebidas foram preparadas com diferentes substratos (mandioca, amendoim e semente de algodão, tendo em comum a adição de arroz e solução de batata-doce). A Tabela 1 apresenta as características de preparo dos diferentes cauims e sua utilização pelos diferentes membros da tribo em diferentes ocasiões.

TABELA 1 Características de preparo dos diferentes cauins, e sua utilização pelos membros da tribo e em diferentes ocasiões.

Bebida	Substrato	Modo de preparo	Recipientes utilizados	Inóculo	Tempo	Consumo	Armazenamento	Época de produção	Faixa etária consumidores
Cauim cozido	Milho, arroz, mandioca e outros	Pilagem; cozimento	Vasilhames de cerâmica ou alumínio	Sem inóculo	Cozimento (60 a 90 min)	Alimentação diária	Consumido no dia após o preparo	Durante todo o ano	Infantes de 4 meses a 2 anos de idade; Crianças e adultos
Cauim de mandioca com arroz	Arroz e mandioca	Pubagem; pilagem; cozimento	Vasilhames de cerâmica ou alumínio	Mastigação da batata-doce	Cozimento (60 a 90 min); Fermentação (24 horas)	Alimentação diária e nos festivais de Cauinagem e Kawió	Consumido de 24 a 48 horas	Durante todo o ano	Crianças e adultos
Cauim de amendoim com arroz	Amendoim e arroz	Pilagem; cozimento	Vasilhames de cerâmica ou alumínio	Mastigação da batata-doce	Cozimento (60 a 90 min); Fermentação (24 horas)	Alimentação diária e nos festivais de Cauinagem e Kawió	Consumido de 24 a 48 horas	Durante todo o ano	Crianças e adultos
Cauim de semente de algodão com arroz	Semente de algodão; arroz; cinzas	Pilagem (algodão); cozimento	Vasilhames de cerâmica ou alumínio	Sem inóculo	Cozimento (90 a 120 min); Fermentação (24 horas)	Alimentação diária e nos festivais de Cauinagem e Kawió	Consumido de 24 a 48 horas	De setembro a janeiro	Adultos

Esta bebida apresentou consistência líquido-pastosa, devido ao processamento dos substratos, que envolveu a pilagem e cozimento durante o preparo (Figura 4).



FIGURA 4 Cauim de mandioca com arroz

É uma bebida típica, produzida pelos índios Tapirapé, em qualquer época do ano. Embora o período de maturação da mandioca ocorra em, aproximadamente, 6 meses após o plantio, esse substrato pode ser conservado no solo por até 30 meses após o plantio. Além disso, o processamento do substrato mandioca através da pilagem e desidratação das raízes ao sol, poderá ser armazenada durante 3 ou 4 meses. Dessa forma, terão substrato disponível para o preparo da bebida cauim de mandioca, em qualquer época do ano (Tabela 1). Crianças com quatro meses de vida até os dois anos de idade são alimentadas com o leite materno e cauim (não fermentado). Demais crianças, jovens, adultos e idosos fazem uso da bebida fermentada e não fermentada diariamente,

principalmente em suas comemorações festivas ou rituais (Tabela 1).

Outro tipo de cauim produzido pelos índios Tapirapé é o de amendoim com arroz. A produção é realizada durante todo o ano, pois o substrato se encontra disponível à venda no mercado local, garantindo sua produção em qualquer época do ano. É consumido por crianças e adultos (Figura 5, Tabela 1).



FIGURA 5 Cauim de amendoim com arroz

A maior consistência do cauim de amendoim com arroz, foi provavelmente devido à quantidade de óleo contida nos frutos de amendoim. Além do mais, os grânulos presentes após o processamento desse substrato garantiram característica densa e saborosa à bebida, que a difere dos demais tipos de cauim.

O cauim de semente de algodão é o mais laborioso de todos os tipos de cauim acima descritos. A começar pela árdua tarefa de obtenção dos grãos nus e

obtenção da madeira para ser queimada. Esse tipo de bebida não é inoculado com a mastigação da batata-doce, mas pode ser deixado a fermentar por igual período e consumido somente por adultos em até 48 horas após início do processo fermentativo (Tabela 1). As crianças não são aconselhadas a tomarem esse tipo de cauim. A frequência de preparação de cauim de semente de algodão é esporádica e depende da disponibilidade do substrato nos meses de setembro a janeiro (Tabela 1).

A coloração das bebidas de cauim (cauim fermentado) variou de acordo com o substrato utilizado. O cauim de mandioca com arroz apresentou coloração branca acinzentada, em virtude do substrato e do processo de fermentação (pubagem) que antecede a fermentação da bebida (Figura 4); o cauim de amendoim com arroz apresentou coloração esbranquiçada (Figura 5), enquanto o de semente de algodão com arroz mostrou-se amarelado, coloração característica de componentes presentes na semente de algodão.

## **5.2 Cauim de mandioca com arroz**

### **5.2.1 Análises físico-químicas**

Os valores de pH variaram de 3,83 a 4,91 (Tabela 2) nas amostras coletadas após a adição do fermento (saliva). No tempo T0 (início da fermentação), os valores observados foi o mais alto (4,91). Desse período em diante, os valores de pH das amostras coletadas tenderam a diminuir.

TABELA 2 Valores de proteína total, amido, pH, °Brix, frutose, glicose, sacarose, maltose, ácido láctico e ácido acético de amostras coletadas em diferentes períodos durante preparação da bebida fermentada indígena “Cauim de mandioca com arroz”, por meio de análise físico-química e CLAE.

Mandioca										Ac.
com arroz	pH	°Brix	Amido	Proteína	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose	Ac. Láctico	Acético
Amostra			(%)	(%)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
SF	4,19±0,06	6,15±0,34	11,77±0,94	3,33±0,25	0,68±0,06	1,11±0,19	0,07±0,00	2,38±0,28	3,36±0,20	0,33±0,03
T0	4,91±1,16	7,58±0,67	1,69±0,07	3,46±0,30	0,41±0,03	1,02±0,31	0,07±0,00	2,29±0,18	3,83±0,20	0,75±0,03
T12	4,04±0,27	7,83±0,96	1,81±0,17	3,16±0,20	0,54±0,03	1,35±0,24	0,06±0,00	3,04±0,21	3,91±0,11	0,51±0,04
T24	3,94±0,50	6,43±3,09	1,66±0,11	3,24±0,30	0,35±0,03	1,02±0,09	0,09±0,01	2,65±0,28	3,73±0,20	0,41±0,02
T36	3,90±0,43	5,92±1,80	1,96±0,27	3,37±0,17	0,32±0,03	1,26±0,23	0,23±0,03	4,58±0,41	4,73±0,11	0,65±0,08
T48	3,83±0,55	7,43±0,56	1,60±0,19	3,33±0,20	0,25±0,02	0,85±0,03	0,27±0,05	2,57±0,14	7,36±0,53	0,86±0,04

SF – Sem Fermentação; T0 - zero hora de fermentação; T12 - 12 horas de fermentação; T24 - 24 horas de fermentação; T36 - 36 horas de fermentação e T48 - 48 horas de fermentação. Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

O processo de obtenção do fermento envolveu a mastigação da batata-doce crua, que juntamente com os componentes da saliva foram adicionados ao recipiente de preparação contendo os substratos para fermentação. A adição do fermento promoveu aumento no valor de pH, o que pode ser constatado quando se compararam os valores observados em T0 e SF (Tabela 2).

Os valores observados na determinação do °Brix, durante a fermentação podem ser observados na Tabela 2. Em geral, observou-se ligeira tendência de aumento do valor do Brix até 12 h de fermentação, entretanto após esse período foi observado decréscimo até 36 h. No período de 36 a 48 horas, novo acréscimo do °Brix foi observado. Esses resultados mostraram que, em dois pontos, durante o processo de fermentação ocorreu a liberação de açúcares, possivelmente em decorrência da degradação do amido. Os valores de proteína bruta variaram entre 3,16% (T12) a 3,46% (T0) (Tabela 2), apresentando média geral 3,3%.

Observaram-se diferenças no conteúdo de amido nos diferentes períodos de avaliação das amostras analisadas. A média geral no teor de amido das amostras foi de 3,41%, variando de 1,60% (T48) a 11,77% (SF), durante o processo de preparação e fermentação da bebida cauim (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças entre as amostras referentes ao teor de frutose nas análises feitas com CLAE, para a bebida fermentada indígena cauim de mandioca com arroz (Tabela 2). Os valores variaram entre 0,25g/L na amostra T48 e 0,68g/L na amostra SF (Tabela 2). Houve tendência na redução dos teores de frutose em função do tempo de fermentação, conforme dados da Tabela 2.

Foram observadas diferenças nas concentrações de glicose nas diferentes amostras avaliadas por CLAE (Tabela 2). Os valores variaram entre 1,02g/L na amostra T0 e 1,35g/L na amostra T12 (Tabela 2). Com exceção da amostra T12, em que houve aumento no teor de glicose, houve tendência de redução nos teores desse açúcar com o tempo de fermentação, o que também pode ser

observado nos teores de frutose. A concentração de sacarose nas amostras do cauim variou entre 0,06g/L na amostra T12 e 0,25g/L na amostra T36 (Tabela 2).

A concentração de maltose apresentou maiores valores absolutos em relação aos teores dos demais açúcares avaliados durante a fermentação. Esse carboidrato esteve presente durante todo o processo, apresentando variação de 2,29g/L (T0) a 4,58g/L (T36) (Tabela 2).

Houve diferenças para os teores de ácido láctico nas amostras analisadas. Com o decorrer do processo fermentativo, observou-se aumento nas concentrações de ácido láctico. A média geral de ácido láctico foi de 4,48g/L, com valores variando entre 3,36g/L, na amostra SF, e 7,36g/L, na amostra T48 (Tabela 2). Detectou-se também a presença de ácido láctico em análise físico-química de acidez total realizada com as amostras coletadas, confirmando os resultados encontrados acima descritos. Em ambas as análises, a quantidade de ácido, principalmente o láctico durante o desenvolvimento do processo fermentativo, aumenta em volume com o tempo de fermentação, chegando a atingir maior concentração na amostra T48 (tempo final de fermentação).

Os valores de ácido acético tenderam a aumentar de acordo com o período de fermentação (Tabela 2). A concentração máxima de ácido acético foi de 0,86g/L na amostra T48 (Tabela 2). A concentração de ácido acético foi inferior a de ácido láctico em todo o processo fermentativo.

### **5.2.2 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de mandioca com arroz**

A evolução dos grupos microbianos foi examinada em toda a fermentação da mandioca e arroz para produzir cauim. A contagem da população microbiana em diferentes meios de cultura durante a fermentação do cauim de mandioca é apresentada na Figura 6. A contagem total variou de 5,8 a

10,2 log UFC / mL. As bactérias do ácido lático (LAB) foram quantitativamente o grupo dominante, não apresentando variações expressivas durante as 48 horas de fermentação.

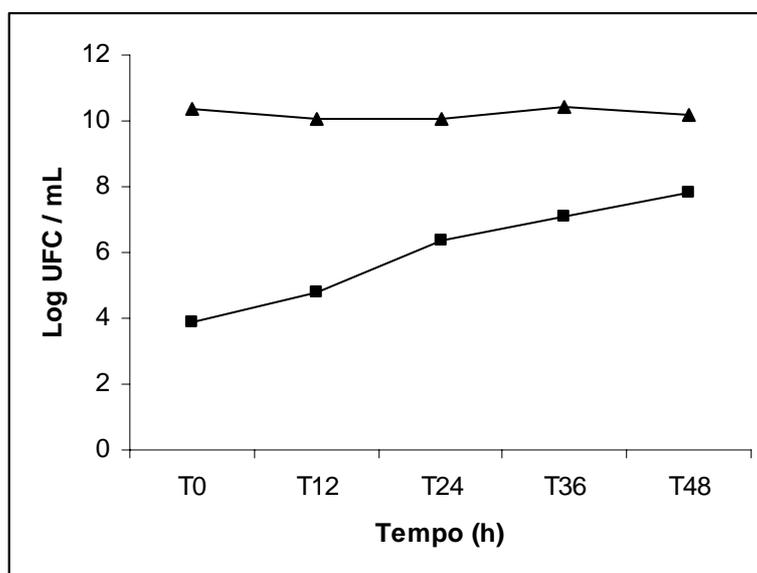


FIGURA 6 População (log UFC / mL) de bactéria do ácido láctico (■) e leveduras (▲) durante a fermentação de cauim de mandioca com arroz.

### 5.3 Cauim de amendoim com arroz

#### 5.3.1 Análises físico-químicas

Os valores de pH apresentaram média de 4,53g/L, variando entre 5,56 na amostra SF e 4,0 na amostra T48. Durante o processo fermentativo ocorreu diminuição nos valores de pH de acordo com o tempo de fermentação, atingindo menor valor no final do processo (Tabela 3). A tendência também foi observada para as demais bebidas analisadas neste trabalho.

TABELA 3 Valores de pH, °Brix, acidez total, amido, proteína total, frutose, glicose, sacarose e maltose de amostras coletadas em diferentes períodos durante preparação da bebida fermentada indígena cauim de amendoim com arroz, determinados por análise físico-química e CLAE.

Amendoim com arroz	pH	°Brix	AT	Amido	Proteína	Frutose	Glicose	Sacarose	Maltose
Amostra			(%)	(%)	(%)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
SF	5,56±0,00	6,45±0,07	0,25±0,00	4,84±0,08	4,91±0,11	ND	0,18±0,00	05,30±0,00	ND
T0	5,07±0,00	7,00±0,00	0,43±0,00	3,70±0,03	5,37±0,24	0,11±0,00	0,59±0,02	48,39±0,08	47,12±0,03
T8	4,54±0,00	6,85±0,07	0,49±0,03	2,99±0,05	5,61±2,16	0,10±0,00	1,88±0,00	49,06±0,00	50,14±0,22
T16	4,37±0,00	7,00±0,00	0,58±0,00	2,86±0,04	3,08±0,88	0,07±0,00	1,12±0,01	50,52±0,07	50,36±0,05
T24	4,36±0,01	6,90±0,00	0,59±0,03	2,58±0,05	4,32±0,09	0,05±0,00	0,64±0,00	46,30±0,01	49,13±0,18
T32	4,29±0,00	7,05±0,07	0,59±0,03	2,11±0,04	4,39±0,17	0,04±0,00	0,73±0,02	45,01±0,03	44,57±0,01
T40	4,10±0,01	6,85±0,07	0,65±0,00	1,78±0,08	4,41±0,14	0,02±0,00	0,47±0,02	41,19±0,00	44,27±0,19
T48	4,00±0,01	6,80±0,00	0,72±0,00	0,81±0,18	3,94±0,20	0,02±0,00	0,66±0,01	46,23±0,04	45,29±0,06

SF – Sem Fermentação; T0 - zero hora de fermentação; T12 - 12 horas de fermentação; T24 - 24 horas de fermentação; T36 - 36 horas de fermentação e T48 - 48 horas de fermentação. ND – não detectado. Os resultados expressam a média ± desvio padrão.

Os valores de °Brix variaram de 6,45g/L na amostra SF a 7,05g/L na amostra T32, apresentando média de 6,86g/L (Tabela 3). Os teores de amido nas amostras analisadas apresentaram variação entre 4,84% na amostra SF e 0,81% na amostra T48, demonstrando diminuição nos valores de amido de acordo com o tempo de fermentação (Tabela 3). O teor de proteínas variou entre 3,08% na amostra T16 e 5,61% na amostra T8 (Tabela 3).

Para os valores de glicose a média foi de 0,78g/L, variando de 1,88g/L na amostra T8 a 0,47g/L na amostra T40 (Tabela 3). Houve aumento nos teores desse açúcar a partir da amostra T0 até a amostra T8, sendo o maior valor apresentado, com ligeira tendência em reduzir os valores com o tempo de fermentação até a amostra T48 (Tabela 3).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, observou-se diferença entre os valores de sacarose nas amostras SF (5,3g/L) e T0 (48,39g/L). Para as demais amostras, foi observado ligeiro aumento até a amostra T16, com 50,52g/L, e no final do processo a concentração de sacarose foi de 46,23g/L (Tabela 3).

Concentrações crescentes de etanol, mas inferiores a 0,31g/L, foram detectadas nas amostras a partir das primeiras 24 horas de fermentação (Tabela 4).

A média geral para ácido oxálico nas amostras analisadas foi de 1,23g/L, variando de 2,17g/L na amostra T0 a 0,9g/L na amostra T24. No início da fermentação, observou-se aumento na concentração de ácido oxálico logo após a inoculação da bebida, na amostra T0 (0,9g/L), tendendo a diminuir os valores até a amostra T24 (0,9g/L), voltando a aumentar os valores até o final da fermentação, 1,13g/L, na amostra T48 (Tabela 4).

TABELA 4 Teores de frutose, glicose, sacarose, maltose e etanol determinados em amostras coletadas em diferentes períodos durante a preparação da bebida fermentada indígena cauim de amendoim com arroz por CLAE.

Amendoim	Etanol	Oxálico	Cítrico	Tartárico	Málico	Lático	Acético
Amostra	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
SF	0,03±0,00	1,29±0,04	04,65±0,30	ND	09,17±0,55	ND	ND
T0	0,01±0,00	2,17±0,09	07,87±0,23	ND	12,99±0,18	26,90±0,69	5,58±0,09
T8	0,02±0,00	1,13±0,01	05,30±0,10	30,61±0,33	10,12±0,22	37,83±0,73	1,64±0,05
T16	0,01±0,00	1,11±0,03	07,89±0,58	31,99±0,24	09,22±0,31	46,17±0,98	2,45±0,25
T24	0,17±0,00	0,91±0,02	03,86±0,02	30,45±0,34	06,73±0,16	41,49±0,47	1,07±0,04
T32	0,15±0,00	0,97±0,02	01,08±0,01	28,46±0,33	06,47±0,27	50,53±0,61	1,93±0,09
T40	0,21±0,00	1,19±0,03	ND	36,02±0,55	09,28±0,36	59,34±1,09	5,26±0,48
T48	0,31±0,00	1,13±0,01	ND	34,17±0,14	08,77±0,09	64,83±0,85	3,53±0,27

SF – Sem Fermentação; T0 - 0 hora de fermentação; T12 - 12 horas de fermentação; T24 - 24 horas de fermentação; T36 - 36 horas de fermentação; T48 - 48 horas de fermentação. Os resultados expressam a média ± desvio padrão. ND – não detectado.

Ácido tartárico, diferentemente do ácido cítrico, não foi encontrado no início da fermentação nas amostras SF e T0 (Tabela 4), tendo sido detectado em concentrações superiores a 30g/L a partir de 16 horas após inoculação (Tabela 4). As concentrações de ácido málico oscilaram durante o período de fermentação entre valores próximos a 9 g/L.

Houve diferenças para os teores de ácido láctico nas amostras analisadas durante o processo fermentativo. A média geral foi de 40,88g/L, sendo que não foi encontrado na amostra SF. Na amostra T0 o valor apresentado foi de 26,9g/L, aumentando de acordo com o tempo de fermentação e chegando a 64,82g/L na amostra T48, no final do processo fermentativo (Tabela 4). Assim como observado para o ácido láctico, teores de ácido acético não foram detectados na amostra SF. Na amostra T0 foi detectada a maior concentração de ácido acético (5,58g/L). Diferentemente dos demais ácidos analisados, o ácido acético tendeu a aumentar em três fases durante o processo fermentativo nas amostras analisadas. Além do maior valor descrito em T0, apresentou aumento na amostra T16 (2,45g/L) e na amostra T40 (5,26 g/L) (Tabela 4).

### **5.3.2 População microbiana (log UFC / mL) de “cauim de amendoim com arroz**

As contagens das populações microbianas nos diferentes tipos de meios de cultivo para cauim de amendoim com arroz são apresentadas na Figura 7. A contagem total atingiu maior valor (7,44 log UFC / mL) no final do processo fermentativo, com 48 horas de fermentação. Os micro-organismos amostrados apresentaram significativo aumento da população logo no início do processo fermentativo, principalmente para bactérias mesófilas e bactérias do ácido láctico, que apresentaram crescimento de 6,40 e 6,41 log UFC / mL, respectivamente, na amostra T0. Esses dois grupos bacterianos persistiram durante todo o processo, com pequena variação para bactéria mesófila ao final do processo na amostra

T40 (5,56 log UFC / mL). A população leveduriforme, com 3,04 log UFC / mL na amostra T0, tendeu a aumentar de acordo com o tempo de fermentação, chegando a 5,61 log UFC / mL na amostra T48.

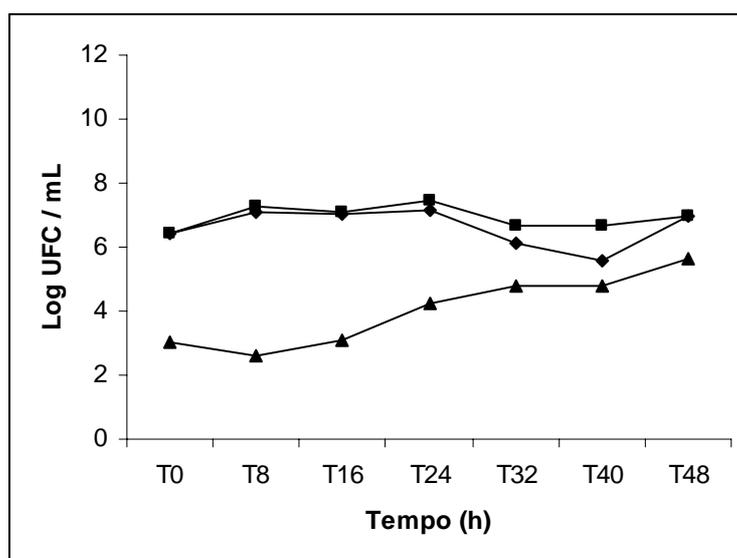


FIGURA 7 População (log UFC / mL) de bactéria mesófila total (◆), bactéria do ácido láctico (■), e leveduras (▲) durante fermentação de cauim de amendoim com arroz.

## 5.4 Cauim de semente de algodão com arroz

### 5.4.1 Análises físico-químicas

Os valores de pH variaram de 6,92 na amostra T0 a 4,76 na amostra T48, apresentando média de 5,55 (Tabela 5). Resultados semelhantes foram obtidos em amostras analisadas de cauins de mandioca com arroz e de amendoim com arroz, nos quais os valores de pH tenderam a diminuir de acordo com o tempo de fermentação.

Os valores de °Brix nas amostras analisadas não apresentaram muita

variação, situando-se entre 6,4% na amostra T8 e 6,05% na amostra T32 (Tabela 5).

A acidez total variou de 0,48% na amostra T0 a 0,18% na amostra T8 (Tabela 5). Nas amostras subsequentes, os valores tenderam a aumentar, chegando a 0,42% na amostra T48.

Os valores de amido para cauim de semente de algodão com arroz variaram de 2,72g/L na amostra T8 a 0,99g/L na amostra T48. Como observado nos tempos T0 e T8, para ter havido fase de adaptação ao meio durante as 8 primeiras horas de fermentação. A partir da amostra T12 houve diminuição nos valores de amido, de acordo com o aumento do tempo de fermentação (Tabela 5). Os valores de proteínas apresentaram média geral de 3,62%, ocorrendo aumento e diminuição nesses valores durante o processo fermentativo. Na amostra T0 o valor apresentado é de 4,01%, aumentando para 4,84% na amostra T16, sendo o maior valor observado (Tabela 5).

TABELA 5 Valores de pH, °Brix, acidez total, amido, proteína total, frutose, glicose, sacarose e maltose de amostras coletadas em diferentes períodos durante preparação da bebida fermentada indígena cauim de semente de algodão com arroz.

Algodão com arroz	pH	°Brix	AT	Amido	Proteína	Frutose	Glicose	Sacarose
Amostra			(%)	(%)	(%)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
T0	6,92±0,03	6,35±0,07	0,48±0,00	2,67±0,08	4,01±1,00	0,0048	0,12±0,00	1,11±0,00
T8	5,79±0,01	6,40±0,00	0,18±0,00	2,72±0,06	4,20±0,42	0,1152	0,88±0,00	3,55±0,00
T16	5,31±0,00	6,30±0,00	0,24±0,00	2,28±0,04	4,84±0,26	0,0244	0,35±0,00	0,97±0,00
T24	5,58±0,03	6,30±0,00	0,24±0,00	1,85±0,04	3,50±0,91	0,0037	0,08±0,00	0,59±0,00
T32	5,35±0,00	6,05±0,07	0,27±0,00	1,77±0,11	2,44±0,29	0,0041	0,09±0,00	0,64±0,00
T40	5,17±0,02	6,35±0,07	0,32±0,02	1,31±0,11	2,49±0,23	0,0095	0,33±0,00	1,56±0,00
T48	4,76±0,00	6,30±0,00	0,42±0,00	0,99±0,05	3,90±0,14	ND	0,50±0,00	1,78±0,00

SF – Sem Fermentação; T0 - 0 hora de fermentação; T12 - 12 horas de fermentação; T24 - 24 horas de fermentação. Os resultados expressam a média ± desvio padrão. ND - não detectato

A média geral para glicose nas amostras analisadas foi de 0,32g/L, variando de 0,87g/L na amostra T8 e 0,07g/L na amostra T24. Embora os valores de glicose determinados sejam relativamente baixos, ocorreu aumento logo no início do processo fermentativo atingindo seu maior índice na amostra T8. Depois, decréscimo até a amostra T24, voltando a aumentar de acordo com o tempo de fermentação, atingindo 0,5g/L na amostra T48 (Tabela 5). Uma possível explicação para o aumento de glicose pode ser devido à degradação das dextrinas do amido e da maltose.

O teor de sacarose variou de 3,54g/L na amostra T8 a 0,58g/L na amostra T24, apresentando média de 1,44g/L. Houve um aumento considerável de sacarose logo no início da fermentação, passando de 1,1g/L na amostra T0 para 3,5g/L na amostra T8 (Tabela 5).

A presença de etanol no início do processo fermentativo não foi detectada, somente apareceu a partir da amostra T16 com o menor valor apresentado de 0,01g/L. De acordo com o tempo de fermentação, a presença de etanol nas amostras analisadas aumentou até atingir o valor de 0,76g/L na amostra T32. A partir daí, ocorreu redução para 0,32g/L na amostra T40 e manteve-se praticamente estável até o final do processo fermentativo (Tabela 6).

TABELA 6 Valores de etanol, ácidos: oxálico, cítrico, tartárico, málico, láctico e acético determinados em amostras coletadas em diferentes períodos, durante a preparação da bebida fermentada indígena cauim de semente de algodão com arroz por CLAE.

Algodão com arroz	Etanol	Oxálico	Cítrico	Tartárico	Málico	Láctico	Acético
Amostra	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
T0	ND	1,50±0,01	ND	36,34±0,50	12,54±0,24	ND	ND
T8	ND	2,11±0,08	12,27±0,09	38,07±0,16	13,66±0,19	ND	ND
T16	0,01±0,00	1,23±0,00	ND	35,46±0,38	11,03±0,32	ND	05,71±0,33
T24	0,32±0,00	1,25±0,02	ND	37,32±0,15	11,19±0,32	ND	04,33±0,35
T32	0,76±0,01	0,98±0,05	33,88±0,21	37,30±0,35	08,71±0,63	ND	06,35±0,35
T40	0,32±0,00	1,08±0,03	53,20±0,57	38,39±0,33	09,58±0,34	15,93±0,23	06,62±0,19
T48	0,37±0,00	1,03±0,00	64,71±0,47	40,32±0,13	12,74±0,18	23,96±0,26	10,69±0,06

SF – Sem Fermentação; T0 - 0 hora de fermentação; T12 - 12 horas de fermentação; T24 - 24 horas de fermentação; T36 - 36 horas de fermentação; T48 - 48 horas de fermentação. Copiar da Tabela 1. ND = não detectado.

A Tabela 6 apresenta os resultados de ácidos analisados em todas as amostras do cauim de semente de algodão com arroz. Para o ácido oxálico, a média apresentada foi de 1,3g/L, variando de 2,11g/L na amostra T8 a 0,98g/L na amostra T32. Observou-se aumento na presença desse ácido no início da fermentação, passando de 1,49g/L na amostra T0 para 2,11g/L na amostra T8. Depois, houve redução desse valor para 1,22g/L na amostra T16, mantendo-se estável até o tempo de 32h, após o qual apresentou decréscimo, estabilizando em valores próximos a 0,98g/L (Tabela 6).

O ácido cítrico não foi encontrado nos tempos 0, 16 e 24 horas de fermentação. No tempo T8 havia 12,26g/L, aumentando em 6 vezes até o final da fermentação (Tabela 6).

O ácido tartárico foi detectado em elevadas concentrações, em relação aos demais ácidos analisados, durante todo o processo fermentativo. A média geral foi de 37,59g/L, variando de 35,45g/L na amostra T16 e 40,32g/L na amostra T48 (Tabela 6).

O teor de ácido málico tendeu a diminuir na maioria das amostras de acordo com o tempo de fermentação. No início, houve aumento de 12,5g/L na amostra T0 para 13,66g/L na amostra T8. Nas amostras seguintes o teor desse ácido diminuiu para 8,7g/L (T32), voltando a aumentar a partir desse tempo, chegando à concentração de 12,74g/L na última amostra analisada (Tabela 6).

Não foram encontrados valores de ácido láctico nas cinco primeiras amostras analisadas para cauim de semente de algodão com arroz (Tabela 6). Somente a partir da amostra T40 foi possível detectar a presença desse ácido, com concentração de 15,93g/L, aumentando para 23,95g/L no final do processo fermentativo na amostra T48.

Não foi possível determinar os valores de ácido acético no início do processo fermentativo. De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, notou-se a presença de ácido acético a partir da amostra T16 (5,71g/L),

mantendo-se praticamente estável até a amostra T40 (6,6g/L) e aumentando em mais de 60% de sua concentração, em relação T40, na amostra T48 (Tabela 6).

#### **5.4.2 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de semente de algodão com arroz**

A Figura 8 apresenta a contagem da população microbiana nos diferentes tipos de meios de cultivo para cauim de semente de algodão com arroz. No final do processo fermentativo, a população microbiana atingiu máxima população (8,47 log UFC / mL). A população de bactérias mesófilas apresentou-se mais consistente no processo, aumentando para 5,36 log UFC / mL na amostra T8, atingindo seu maior nível na amostra seguinte (T16) com 7,51 log UFC / mL, mantendo-se praticamente estável até o final do processo fermentativo. A população de bactérias do ácido láctico apresentou crescimento a partir da amostra T8 para T16, atingindo seu maior valor nessa amostra (8,47 log UFC / mL), diminuindo no final do processo fermentativo na amostra T48 (6,78 log UFC / mL).

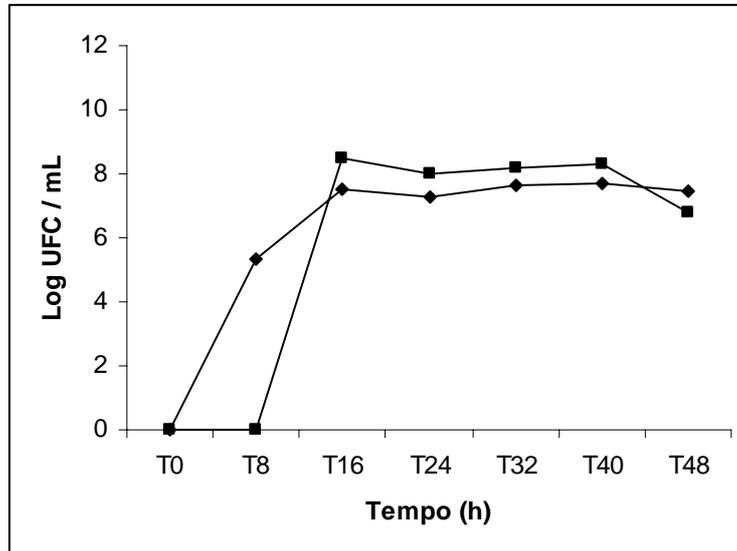


FIGURA 8 População (log UFC / mL) de bactéria mesófila total (◆) e bactéria do ácido láctico (■) durante fermentação de caim de semente de algodão com arroz.

TABELA 7 Tabela geral do tempo final de fermentação (48 h) das bebidas (dados resumidos das Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6).

	Mandioca com arroz	Amendoim com arroz	Semente de algodão com arroz
pH	3,83±0,55	4,00±0,01	4,76±0,00
°Brix	7,43±0,56	6,80±0,00	6,30±0,00
Amido (%)	1,60±0,19	0,81±0,18	0,99±0,05
Proteína (%)	3,33±0,20	3,94±0,20	3,90±0,14
Frutose (g/L)	0,25±0,02	0,02±0,00	ND
Glicose (g/L)	0,85±0,03	0,66±0,01	0,50±0,00
Sacarose (g/L)	0,27±0,05	46,23±0,04	1,78±0,00
Maltose (g/L)	2,57±0,14	45,29±0,06	ND
Ácido láctico (g/L)	7,36±0,53	64,83±0,85	23,96±0,26
Ácido acético (g/L)	0,86±0,04	3,53±0,27	10,69±0,06

## 6 DISCUSSÃO

A fermentação do cauim, assim como observado nos diferentes tipos de bebidas e alimentos fermentados indígenas ou tradicionais (Almeida et al., 2007; Schwan et al., 2007), apresentou complexa associação entre bactérias lácticas, outras bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Blandino et al., 2003; Jespersen, 2003).

Os resultados indicaram que houve preponderância de LAB, como também observado em outros estudos sobre fermentação de mandioca (Amoa-Awua et al., 1996; Kimaryo et al., 2000; Coulin et al., 2006). Fungos filamentosos não foram detectados nas amostras avaliadas.

Para cauim de semente de algodão com arroz, a população de bactérias do ácido láctico apresentou crescimento a partir da amostra T8 para T16, atingindo seu maior valor nessa amostra (8,47 log UFC / mL), diminuindo no final do processo fermentativo na amostra T48 (6,78 log UFC / mL). Essa bebida não é inoculada com saliva da mastigação de batata-doce, o que provavelmente explica esse comportamento, quando se comparam os resultados obtidos nas demais bebidas analisadas que obtiveram inoculação. A presença e crescimento dessas bactérias como consta na Figura 8 confirma sua atividade, durante o processo fermentativo de cauim de semente de algodão com arroz.

A adição de saliva a partir da mastigação da batata-doce no recipiente de preparação pode agir degradando o amido contido nos substratos, o que pode ser devido à presença da amilase salivar. Trabalhos com subprodutos da mandioca obtidos via fermentação têm demonstrado que ocorre degradação do amido por amilases produzidas pelos micro-organismos presentes nos substratos (Demiate et al., 2000) e várias alterações ocorrem no amido durante a fermentação, devido ao desenvolvimento de uma gama de micro-organismos (Cereda & Giaj-Levra,

1987). Durante o processo de obtenção de cauim, têm sido encontradas bactérias do ácido lático e leveduras (Almeida et al., 2007; Schwan et al., 2007).

De acordo com Omemu et al. (2007) a capacidade amilolítica de algumas leveduras, em especial *Candida*, é importante para dar início ao processo, realizando a quebra dos açúcares complexos e liberando açúcares simples que podem ser usados por outros organismos fermentadores. Processo semelhante pode ter ocorrido durante as etapas de fermentação para obtenção de cuins fermentados.

Os valores médios e o decréscimo do pH durante o processo fermentativo das bebidas avaliadas neste trabalho (Tabelas 2, 3 e 5) estão de acordo com dados de literatura sobre alimentos e bebidas fermentadas empregando fontes amiláceas, em especial, mandioca (Baleia et al., 2004; Moorthy et al., 1993). Resultados semelhantes também foram encontrados em amostras de fufu inoculadas com leveduras, com os valores de pH decrescendo de 4,3 para 3,7 no final do processo fermentativo na obtenção de *attoukpou* (Fagbemi & Ijah, 2006) e Nevry et al. (2007).

Durante a fermentação de substâncias amiláceas o conteúdo de amilose diminuiu nos primeiros dias, possivelmente devido à hidrólise por enzimas amilolíticas. Posteriormente, o grânulo de amido passa por novos rearranjos, seguido por possíveis ações da enzima sobre a amilopectina, quebrando as ramificações dessa e promovendo o aumento no teor de amilose (George et al., 1995). Isso pode ser uma possível explicação para os dois maiores valores observados para o °Brix em cauim de mandioca com arroz, nos tempos 12 e 48 horas (Tabela 2). Para os cauins de amendoim com arroz e cauim de semente de algodão com arroz não ocorreram variações nos valores de °Brix, mantendo-se praticamente estáveis durante o processo fermentativo (Tabelas 3 e 5). Possivelmente, essa diferença pode estar relacionada com o substrato mandioca ausente nos demais tipos de cauins. Contudo em subprodutos da mandioca,

obtidos via fermentação tem ocorrido degradação do amido por amilases produzidas pelos micro-organismos presentes nos substratos (Demiate et al., 2000).

Os valores de proteínas nas amostras analisadas são considerados baixos quando comparados com outras fontes de proteínas de origem vegetal, como, por exemplo, a soja, que possui aproximadamente 40% de proteína bruta. Essa tendência já era esperada, pois de acordo com Fagbemi & Ijah (2006), alimentos ricos em carboidratos como cereais, inhame e mandioca, em geral são pobres em proteínas. Segundo esses mesmos autores, o conteúdo de proteína em mandioca crua é de 0,4%, enquanto que o de carboidratos é de cerca 86%. E, possivelmente o valor superior (3,9%) para cauim de mandioca com arroz seja o resultado do aumento no número de bactérias e leveduras que crescem no meio de fermentação. No preparo de fufu, a adição de 0,5g de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, separadamente e juntas, elevou o teor de proteína de 0,4% (massa crua) para 7,90%, 6,34% e 10,0%, quando inoculadas juntas em 96 horas de fermentação (Fagbemi & Ijah, 2006).

Tem sido observado na literatura que não há incremento no conteúdo de proteína bruta em decorrência do processo de fermentação, principalmente nas fermentações de origem amilácea. Resultados semelhantes foram encontrados para os tipos de cauim analisados em que os valores observados para proteínas foram relativamente baixos. Além disso, em estudo da determinação da composição química de subprodutos da mandioca, Cereda & Fioretto (1983) verificaram altas quantidades de amido (69,76%) e o valor de proteína encontrado foi de 1,51%.

Os micro-organismos fermentativos normalmente obtêm alguns ou todos os seus aminoácidos a partir do ambiente de fermentação. Dependendo de suas propriedades biossintéticas, os micro-organismos podem ou não ser capazes de converter os aminoácidos presentes nesses substratos em compostos protéicos.

Bactérias ácido-láticas normalmente predominam na fermentação do amido, essas por sua vez não são capazes de sintetizarem e incrementarem o conteúdo de proteína, nesses produtos da fermentação (Oliveira et al., 2001).

Os resultados aqui obtidos concordam com os resultados da literatura quanto ao teor de proteína bruta em subprodutos da fermentação ácido-lática (Cereda & Fioretto, 1983). Devido a isso, alimentos e bebidas fermentadas indígenas normalmente são consumidos juntamente com fonte de proteína de origem animal, como peixe, tartaruga e animais silvestres.

Apesar do baixo conteúdo protéico, alimentos ricos em amido e outros carboidratos podem ser utilizados como fonte de substrato para o desenvolvimento microbiano, em que o nitrogênio não protéico pode ser transformado em proteína microbiana.

Várias alterações ocorrem no amido durante a fermentação devido ao desenvolvimento dos micro-organismos (Cereda & Giaj-Levra, 1987). Durante o processo de obtenção do cauí de mandioca e arroz, foram identificadas diferentes espécies de bactérias e leveduras (Almeida et al., 2007; Schwan et al., 2007).

As modificações do amido durante o processo de fermentação normalmente levam à produção de açúcares simples (Cereda, 1983). Em geral, o processo de fermentação do amido nos alimentos e bebidas fermentadas, altera entre fases aeróbicas e anaeróbicas (Cereda & Lima, 1985). Essa característica possivelmente seja o motivo das oscilações observadas nos teores de açúcares avaliados nesse estudo.

Alterações nas propriedades físico-químicas em decorrência da degradação do amido foram relatadas por outros autores. Essas alterações modificam o sabor e o odor do produto. As leveduras podem estar consumindo os ácidos orgânicos, formando compostos aromáticos que, em conjunto com os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, são responsáveis por definir

as características acima citadas (Cereda, 1987). Esse talvez seja um dos motivos da preferência pela bebida fermentada indígena cauim, após processo de fermentação.

A redução no teor de açúcares simples, em especial a glicose, está de acordo com o observado na literatura para o processo de fermentação de alimentos e bebidas (Silveira, 2001).

Conforme comentado anteriormente, as modificações ocorridas durante o processo de fermentação, normalmente levam à produção de açúcares mais simples, entre eles a frutose. Esses açúcares são utilizados durante o processo de fermentação como fonte de energia pelos micro-organismos. Esse processo, possivelmente é o responsável pelas alterações no sabor e aroma dos produtos obtidos da fermentação (Silveira et al., 2000).

O aumento da concentração de maltose no decorrer do processo de fermentação da bebida cauim de mandioca com arroz pode ser resultado da degradação do amido e suas dextrinas por ação da presença da amilase salivar ou devido à presença de leveduras (Omemu et al., 2007), durante o processo fermentativo.

A presença de frutose em cauim de semente de algodão foi inferior à quantidade determinada para os demais tipos de cauim analisados (Tabelas 2, 3 e 5). As modificações do amido durante o processo de fermentação normalmente levam a produção de açúcares simples (Cereda et al., 1983), essa, possivelmente, pode ser a explicação para valores inferiores apresentados para cauim de semente de algodão. Visto que os substratos utilizados proporcionam menor quantidade de amido para ser fermentado durante o processo de obtenção da bebida.

A sacarose, possivelmente pode ter surgido da inulina, de fruto-oligossacarídeos hidrolisados ou terem sido liberadas como frutose citosólica

pela degradação do tecido vegetal.

De acordo com os resultados encontrados tanto para ácido lático como para ácido acético, pode-se inferir que os açúcares contidos no substrato em fermentação estavam sendo transformados nesses ácidos, definindo as características organolépticas desejáveis para a bebida. A produção desses ácidos no meio de fermentação propicia o enriquecimento da dieta desses povos através de uma diversidade de sabores, texturas e aromas, provenientes das transformações desses ácidos ou açúcares através do próprio micro-organismo ou por ação de suas enzimas. Esse aumento pode ter sido proporcionado pelas bactérias do ácido lático que encontravam-se presentes em todas as amostras de cauim analisadas.

Os ácidos, lático e acético, bem como alguns álcoois e fermentações alcalinas, vão atuar na preservação dos substratos a serem fermentados (Caplice & Fitzgerald, 1999; Blandino et al., 2003), prolongando a vida útil do alimento ou o tempo de utilização dessas matérias-primas.

A produção de alimentos e bebidas fermentadas na comunidade indígena Tapirapé se faz presente historicamente. Desde os primeiros contatos estabelecidos e os registros do SPI (Sistema de Proteção ao Índio) feitos por funcionários e pesquisadores no início e meados do século XX, confirmam o uso dessas técnicas empíricas e rudimentares para a produção de alimentos e bebidas no seu cotidiano, comemorações festivas e rituais. Segundo Wagley (1988), nenhum Tapirapé comia carne de peixe sem a farinha de puba, o que acontece até os dias atuais.

Os pais de infantes devem seguir a dieta pós-parto. O pai pode tentar ingerir alimentação normal. Se o bebê estiver saudável, poderá continuar. A mãe tem que seguir rigorosamente a dieta comendo cauim cozido sem açúcar, nos primeiros 30 dias da dieta e não tomar água fria. Após 30 dias, a mãe poderá inserir peixe ou outra fonte protéica por mais 30 dias. Dos 60 aos 90 dias se

alimentará de cauim cozido e duas fontes protéicas. Após os 90 dias de dieta poderá tentar ingerir alimentação normal. Se o bebê continuar saudável tudo bem, caso contrário, deverá reiniciar toda a dieta.

As crianças são alimentadas com cauim cozido sem açúcar após os quatro meses de vida e continuam até os dois anos de idade, acompanhado do leite materno.

O cauim fermentado preparado a partir da inoculação do cauim cozido, geralmente é utilizado, quando não pode ser consumido todo no mesmo dia, ou durante os festivais, por exemplo, a cauinagem, onde uma grande quantidade de cauim deve ser preparada para que seja servido durante os três a cinco dias de festas. Nesse tipo de cauim, a inoculação ou fermento desencadeia o processo fermentativo, pois a saliva contém a enzima amilase que age sobre os componentes do amido, principal componente do substrato. A amilase age quebrando esses açúcares complexos, liberando açúcares simples que são utilizados pelos micro-organismos iniciadores do processo fermentativo. Embora, para os Tapirapé, a utilização da batata-doce como fermento após a mastigação, seja um mecanismo para tornar a bebida um pouco adocicada e mais saborosa. Essa bebida deve ser consumida, no máximo, até 48 horas após o início da fermentação.

Muitos povos indígenas, assim como os Tapirapé, utilizam a fermentação para produzir alimentos e bebidas e o fazem com o intuito de prolongar o tempo de consumo ou a duração desses produtos. Possibilitando dessa forma, consumi-los após horas, dias, ou até mesmo meses após seu preparo. As tarefas atribuídas quanto ao cultivo de matéria-prima utilizada como substrato, usado no preparo dos alimentos e bebidas pelos índios Tapirapé, fica a cargo dos homens, desde o cultivo e cuidado da roça até a colheita dos produtos, enquanto que o preparo das bebidas e alimentos são tarefas atribuídas às mulheres. Os homens não devem se envolver nas tarefas de preparo desses

alimentos ou bebidas, nem mesmo para pilar os substratos.

O cauim tem sido produzido durante anos pela fermentação natural dos substratos e os micro-organismos envolvidos no processo são possivelmente provenientes dos utensílios (pilão), substratos e manipulação (inoculação com batata-doce). Do mesmo modo como ocorria com os processos de produção de vinho em que as leveduras da própria uva ou os equipamentos serviam como inóculo para iniciar o processo fermentativo (Maro et al., 2007).

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 146-151, Nov. 2007.
- AMOA-AWUA, W. K.; APPOH, F. E.; JAKOBSEN, M. Lactic acid fermentation of cassava into agbelima. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 1/3, p. 87-98, Aug. 1996.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Agricultural Chemists**. 12. ed. Washington, 1992.
- BALEIA, A.; YAMASHITA, F.; MORAES, S. R.; SILVEIRA, C. A.; MIRANDA, L. A. Textural changes during cooking of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 14, p. 1975-1978, Nov. 2004.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M. E.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Barking, v. 36, n. 6, p. 527-543, 2003.
- CAPLICE, E.; FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, p. 131-149, 1999.
- CEREDA, M. P. Avaliação da qualidade de duas amostras de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 305-320, mar. 1983.
- CEREDA, M. P. Tecnologia e qualidade do polvilho azedo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 13, n. 145, p. 63-68, jan. 1987.
- CEREDA, M. P.; FIORETO, A. M. C. Potencial de utilização de águas de fecularia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 2., 1983. Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas: [s.n.], 1983.

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

CEREDA, M. P.; LIMA, U. A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca: III determinação dos ácidos orgânicos. **Turrialba**: revista interamericana de ciencias agrícolas, San Jose, v. 35, n. 1, p. 19-24, 1985.

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

DEMIATE, I. M.; DUPUY, N.; HUVENNE, J. P.; CEREDA, M. P.; WOSIACKI, G. Relationship between baking behavior of modified cassava starches and starch chemical structure determined by FTIR spectroscopy. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 42, p. 149-158, 2000.

FAGBEMI, A. O.; IJAH, U. J. J. Microbial population and biochemical changes during production of protein-enriched fufu. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 635-640, 2006.

GASSEM, M. A. A. A microbiological study of Sobia: a fermented beverage in the Western province of Saudi Arabia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, p.173-177, 2002.

GEORGE, M.; MOORTHY, S. N.; PADMAJA, G. Biochemical changes in cassava tuber during fermentation and its effect on extracted starch and residue. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 69, n. 3, p. 367-371, 1995.

JESPERSEN, L. Occurrence and taxonomic characteristics of strains of *Saccharomyces cerevisiae* predominant in African indigenous fermented foods and beverages. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 3, p. 191-200, 2003.

KIMARYO, V. M.; MASSAWE, G. A.; OLASUPO, N. A.; HOZAPFEL, W. H. The use of a starter culture on the fermentation of cassava for the production of “kivumde”, a traditional Tanzanian food product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, p. 179-190, 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**, Amsterdam, v. 89, n. 1, p. 41-50, Dec. 2003.

MARO, E. D.; ERCOLINI, D.; COPPOLA, S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 117, p. 201-210, 2007.

MIRANDA, L.; AMORIM, L. **Atlas geográfico**. Cuiabá: Entrelinhas, 2000. 40 p.

MOORTHY, S. N.; GEORGE, M.; PADMAJA, G. Functional properties of the starchy flour extracted from cassava on fermentation with a mixed culture inoculums. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 61, n. 4, p. 443-447, 1993.

NEVRY, R. K.; KOUSSEMON, M.; ABOUA, F. Chemical and organoleptic properties of Attoukpou made from two cassava (*Manihot esculenta* Crantz) varieties, Bonoua and IAC. **Journal of Food Technology**, Oxford, v. 5, p. 300-304, 2007.

OLIVEIRA, A. J. de; ALCARDE, V. E. do; CANOILAS, L. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Cultivo de microrganismos em mandioca e subprodutos da industrialização. In: CEREDA, M. P. (Ed.). **Manejo uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. p. 269-279. (Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas, v. 4).

OMEMU, A. M.; OYEWOLE, O. B.; BANKOLE, M. O. Significance of yeasts in the fermentation of maize for *ogi* production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 571-576, 2007.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 966-972, Sept. 2007.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA JUNIOR, J. J.; RODRIGUES, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Delft, v. 79, p. 89-96, 2001.

SHIMADZU. **Application data book**. Japan, 1998. 104 p.

SILVEIRA, I. A. **Isolamento, caracterização e diversidade de bactérias envolvidas na fermentação natural do polvilho azedo**. 2001. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SILVEIRA, I. A.; CARVALHO, E. P. de; PILON, L.; SCHWAN, R. F. Aspectos gerais e microbiológicos da fermentação da fécula de mandioca para produção de polvilho azedo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 68/69, p. 26-31, 2000.

TRAIPI, N.; GRIFFTH, M. **O abuso do álcool e de outras substâncias pelos povos indígenas**. Disponível em: <<http://www.pabo.org/portuguese/ad/indign-v1e1-por.pdf>>. Acesso em: 28 fev. 2006.

WAGLEY, C. **Lágrimas de boas vindas**: os índios Tapirapé do Brasil Central. Belo Horizonte: Itatiaia, 1988. 304 p.

## **CAPÍTULO 3**

### **IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PRESENTES EM FERMENTAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO E ARROZ POR MÉTODOS DEPENDENTES E INDEPENDENTES DE CULTIVO**

## 1 RESUMO

Amostras de cauim produzido a partir de semente de algodão e arroz foram coletadas a cada 8 h de fermentação, para análise da microbiota presente na bebida, no período de 48 h de fermentação. As bactérias foram agrupadas em Gram-negativas (12,96%), Gram-positivas catalase positiva (58,15%) e Gram-positivas catalase negativa (41,84). Dentre as bactérias Gram-positivas, as espécies *Lactobacillus sp* (13,47%), *Bacillus sp* (12,76%), *Lactobacillus plantarum* (11,34%), *Corynebacterium amycolatum* (10,63%), e *Lactobacillus agilis* (9,92%) foram as mais frequentes. O gênero *Lactobacillus* (Lb.), compreendeu o maior número de isolados, sendo identificadas 15 espécies nas amostras analisadas de cauim fermentado de semente de algodão com arroz. Não houve crescimento de leveduras e fungos filamentosos em nenhuma das amostras analisadas. A população bacteriana alcançou valores em torno de 8,0 log UFC / mL. Um total de 162 estirpes de bactéria compreendendo 33 morfotipos foram isoladas e identificadas. Análises de DGGE foram realizadas com o intuito de observar a dinâmica das comunidades de bactérias e fungos, sendo possível observar que não houve predomínio de uma ou mais bandas durante todo o processo fermentativo de cauim de sementes de algodão com arroz. É um indicativo de que os resultados obtidos estão de acordo com os da identificação pelo método tradicional, confirmando os resultados apresentados neste estudo.

**Palavras-chave:** Bactérias, Gram-positivas e Gram-negativas, cauim, *Lactobacillus*.

## 2 ABSTRACT

Samples of cauim produced from seed cotton and rice were collected every 8 h of fermentation for analysis of the microbiota present during 48 h of fermentation. The bacteria were grouped into Gram-negative (12.96%), Gram-positive catalase positive (58.15%) and Gram-positive catalase negative (41.84). Among the Gram-positive species *Lactobacillus* sp (13.47%), *Bacillus* sp (12.76%), *Lactobacillus plantarum* (11.34%), *Corynebacterium amycolatum* (10.63%), and *Lactobacillus agilis* (9.92%) were the most frequent microorganisms. The genus *Lactobacillus* (Lb.), comprised the largest number of isolates. It was identified 15 different species in the samples of cauim fermented cotton seed with rice. There was no growth of yeasts and filamentous fungi in any of the samples analyzed. The bacterial population reached values around 8.0 log CFU / mL. A total of 162 strains of bacteria consisting of 33 morphotypes were isolated and identified. DGGE analysis were performed in order to observe the dynamics of communities of bacteria and fungi, revealing that there was a predominance of one or more bands throughout the fermentation of cauim cotton seed with rice. It is an indication that the results are in agreement with the identification by the traditional method, confirming the results presented in this study.

**Keywords:** Bacteria, Gram-positive and Gram-negative, cauim, *Lactobacillus*.

### 3 INTRODUÇÃO

Várias nações, tribos e aldeias utilizam as técnicas fermentativas tradicionais e/ou rudimentares para produzirem seus alimentos e bebidas. Estima-se que o homem começou a utilizar as bebidas fermentadas há cerca de 30 mil anos. A produção de cerveja deve ter iniciado por volta de 8.000 a.C., ocorrendo paralelamente aos processos de fermentação de cereais que se difundiram lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevada, nas antigas sociedades estáveis (Venturini Filho & Cereda, 2001). Na literatura existem informações que bebidas fermentadas já eram produzidas na Babilônia (Irã) há mais de 7.000 anos, há 5.000 anos no Egito, há 4.000 anos no México, há 3.500 anos no Sudão (Pedersen, 1979).

Relata-se que a utilização dessa técnica teve seu início na China, sendo difundida para outras nações como Coreia, Japão e outros países orientais. Além desses, hoje outros países como Estados Unidos, México, Indonésia e Brasil, utilizam a fermentação para produzir vários tipos de alimentos e bebidas fermentadas (Gotcheva et al., 2000; Oyewole, 2001).

Alimentos fermentados têm um papel vital na história do desenvolvimento do homem, oferecendo grande variedade de sabores, aromas e texturas que enriquecem sua nutrição. Acredita-se que a importância desses alimentos será ainda maior quando a população mundial alcançar de 8 a 12 bilhões de habitantes já no século XXI. De modo geral, fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos de produzir e preservar alimentos. Produzidos com alto valor nutricional e distribuídos a um baixo custo, fornecendo proteínas, vitaminas e minerais à maioria dos consumidores (Steinkraus, 1996).

Atualmente, alguns alimentos fermentados são industrializados e fazem parte da dieta da população de quase todo o globo, como por exemplo: pão,

queijos, iogurtes, vinagre, bebidas fermentadas (cerveja, vinho) e fermento-destilada (uísque, cachaça, tequila).

Povos oriundos de várias partes do mundo contribuíram para o aperfeiçoamento e utilização das técnicas fermentativas a partir de erros e acertos, em tantas tentativas, não havendo conhecimento da necessidade da presença de micro-organismos para desencadear os processos fermentativos (Gotcheva et al., 2000). Muitos alimentos de origem indígena ou nativa da Ásia e África são produzidos por processos fermentativos espontâneos que, na maioria das vezes, podem envolver a mistura de culturas de bactérias, leveduras e/ ou fungos filamentosos. Muitos dos microrganismos encontrados nesses alimentos fermentados podem ser consumidos pelo homem. Esses micro-organismos produzem várias enzimas como amilases, proteases, lipases, pectinases, entre outras que permitem que outros grupos microbianos colonizem os mais diversos substratos e modifiquem o sabor, preservando o alimento (Gotcheva et al., 2000; Steinkraus, 1996).

Os métodos tradicionais de plaqueamento são parcialmente seletivos e excluem parte da comunidade microbiana existente na amostra analisada (Chen et al., 2008). A técnica de DGGE é uma ferramenta viável para detecção de organismos viáveis não cultiváveis, o que lhe confere certa vantagem em relação às demais técnicas moleculares (Muyzer & Smalla, 1998; Kurtzman & Robnett, 1998; Scorzetti et al., 2002; Giraffa & Neviani, 2001). Assim, o PCR-DGGE tem surgido como uma das técnicas moleculares mais promissoras para estudo do perfil da ecologia microbiana de habitats naturais, tendo se expandido para estudo de alimentos e bebidas (Muyzer & Smalla, 1998).

Processos fermentativos espontâneos e tradicionais envolvendo bactérias, leveduras e fungos são conhecidos em países asiáticos e no continente africano. Almeida et al. (2007) e Schwan et al. (2007) realizaram estudos sobre a bebida cauim de mandioca com arroz, produzida pelos índios Tapirapé. Porém,

ainda não existem informações disponíveis sobre os micro-organismos que estão envolvidos nos processos de fermentação da maioria dos povos indígenas, principalmente do Brasil. Objetivou-se caracterizar a dinâmica populacional da microbiota envolvida no processo fermentativo de cauim de semente de algodão com arroz, produzida pelos índios Tapirapé.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Preparo do cauim ou da bebida

A bebida foi preparada pelos índios Tapirapé da aldeia Tapi'itãwa, localizada próximo à cidade de Confresa, na região oeste do estado de Mato Grosso, Brasil.

As sementes de algodão desfiadas foram colocadas de molho por três a quatro horas para encharcar. Enquanto isto, madeira foi queimada para obtenção de brasas e cinzas (garapa (*Apuleia sp*) ou amarelim (*Chlorophora tinctoria*) ou angico (*Piptadenia sp*)). As mesmas foram transferidas incandescentes para recipiente de preparo contendo, aproximadamente, 10 L de água. A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 30 a 40 minutos. Após esse período, transferiu-se a água de cinzas para o recipiente de cozimento dos substratos. Durante cozimento dos substratos, adicionou-se a água de cinzas quantas vezes foram necessárias para obter o amolecimento dos grânulos.

Após o período de umedecimento, as sementes foram piladas, e lavadas em água de cinza sequencialmente em uma peneira até que toda a polpa do interior da semente fosse dissolvida na água. Em seguida, o recipiente de preparo foi transferido para um fogão rudimentar para fazer o cozimento dos substratos, durante 90 a 120 minutos. A semente de algodão constitui-se de polpa amarela característica que dará a cor predominante da bebida antes e após o cozimento.

Utilizou-se arroz limpo (3 kg) umedecido por aproximadamente 10 minutos. Após esse período, o arroz foi lavado e adicionado no recipiente de cozimento anteriormente descrito. Os substratos foram homogeneizados durante todo o cozimento. Após cozimento, o recipiente foi retirado do fogo, deixando esfriar à temperatura ambiente para ser servido com adição de açúcar ou mel a gosto. Esse tipo de cauim, diferente dos demais tipos de cauim produzidos, não é

inoculado com batata-doce. Poderá ser consumido após esfriamento ou deixado a fermentar por 24 horas à temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) e consumido em até 48 horas após o início da fermentação.

#### **4.2 Coleta das amostras**

Foram coletadas amostras de cauim cozido (testemunha) nos mesmos tempos em que foram coletadas amostras do cauim cozido submetido à fermentação, ou seja, 0h, 8h, 16h, 24h, 32h, 40h e 48h. Em cada tempo, 20 mL das amostras foram coletadas e transferidas para frascos Erlenmeyer, de 250 mL de capacidade, contendo 180 mL de água peptonada estéril (0,1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,03%  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ). A mistura foi então homogeneizada em Stomacher e diluições decimais foram preparadas para realização das análises microbiológicas. As análises físico-químicas foram realizadas com as amostras homogeneizadas em Stomacher, sem emprego de diluições decimais.

Para cada amostra foi coletado 20 mL do substrato cozido que foi adicionado a um frasco contendo 180 mL de solução salina peptonada (0.1% de peptona, 0.5% de NaCl, 0.03%  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ). As amostras foram homogeneizadas durante 60s em stomacher e diluições decimais foram preparadas para posterior plaqueamento.

#### **4.3 População de bactérias mesófilas aeróbias, bactérias Gram-negativas, bactérias do ácido láctico (BAL).**

A contagem dos micro-organismos foi realizada em todos os tempos de fermentação. Foram utilizados cinco meios de cultivo: Plate Count agar (PCA, Merck) foi usado como meio geral para população de bactérias mesófilas viáveis; Macconkey agar (Oxoid, Hampshire, England) para coliformes totais e Eosyn Methylene Blue agar (Oxoid) para Enterobacteriaceas, MYGP agar (0.3% extrato de levedura (Merck), 0.3% extrato de malte (Merck); 0.5% peptona

(Himedia), 1.0% glicose (Merck), 2.0% agar (Merck) adicionado para 1000 mL contendo 100 mg cloranfenicol (Sigma, St. Louis, USA); 50 mg clorotetraciclina (Sigma) para inibir o crescimento de bactérias para contagem de leveduras; MRS (De Man Rogosa Sharpe, Merck) agar, contendo 0.1% cisteína\_HCl para obter condições anaeróbicas durante incubação para o crescimento de bactérias do ácido láctico. Placas de MRS foram incubadas em jarra anaeróbica de acrílico. Após plaqueamento, as placas foram incubadas a 28°C por 48h para bactérias e 5 dias para o crescimento de leveduras.

#### **4.4 Identificação de bactérias**

As bactérias Gram-negativas foram identificadas usando os kits Bac-Tray I, II e III (Difco), seguindo as instruções do fabricante.

As bactérias Gram-positivas foram subdivididas em formadoras de esporos e não formadoras de esporos por teste de esporulação (80 °C por 10 min). A identificação subsequente foi realizada por testes de catalase e bioquímicos, como recomendado pelo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994) e The Prokaryotes (Hammes et al., 1991). Os lactobacilos foram contados em agar MRS, e os isolados, examinados pela aparência da colônia e célula, atividade da enzima catalase, coloração de Gram, motilidade e produção de CO<sub>2</sub> a partir de glicose em caldo MRS contendo um tubo de Durham. A caracterização bioquímica dos isolados foi realizada utilizando-se API ID 32 para lactococcus e enterococcus e API 50 CHL (BioMerieux) para lactobacilos e leuconostoc. *Lactobacillus* foram identificados como Gram-positivos, catalase-negativa, oxidase-negativa e bastonetes regulares. E, agrupados como homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos facultativos e heterofermentativos obrigatórios por sua habilidade de produzir gás (CO<sub>2</sub>) a partir de glicose e gluconato.

As bactérias Gram-positivas, catalase positiva foram agrupadas como formadoras de esporos (*Bacillus*) e não formadoras de esporos (*Corynebacterium*), seguidas de testes bioquímicos como recomendado pelo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994) e The Prokaryotes (Hammes et al., 1991), para a identificação dos isolados.

#### **4.5 Extração do DNA**

O DNA total foi extraído das amostras coletadas em diferentes tempos de fermentação usando protocolo descrito por Ampe & Miambi (2000), com pequenas modificações. 1.5 mL de cada amostra foram centrifugadas 13000 rpm, por 5 min por cinco vezes. O precipitado foi ressuscitado em 400 µl de tampão TES (50 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA; 8.56% (w/v) sacarose). Um volume de 20 µl de lisozima (20 µg/µl) foi adicionado em cada tubo e incubados a 37 °C durante 30 min. 5 µl de proteinase K (10 mg/mL) foi adicionado e incubado a 50°C por 1 h, e depois, a 65°C por 10 min. Então, 200 µl de tampão (0.2 M NaCl, 0,1 M Tris-HCL pH 8, 2% SDS) a 65°C foram adicionados aos tubos e incubados por 30 min a 65°C. Após a incubação, 200 µl de NaCl 5 M foi adicionado e incubado a 4°C por 10 min. Durante incubação, os tubos foram centrifugados a 13000 rpm por 15 min a 4°C. A mistura foi transferida para um novo tubo e 400 µl de isopropanol e incubado a -20°C durante 2 h, e centrifugado por 30 min a 13000 rpm a 4°C. Durante lavagem com etanol 70%, o pellet de DNA foi ressuscitado em 500 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA pH 8). 500 µl de fenol-clorofórmio (1:1) foram adicionados e homogeneizados. A mistura foi centrifugada durante 10 min a 13000 rpm, à temperatura ambiente (essa etapa foi repetida por três vezes). Uma extração final foi realizada com 500 µl de clorofórmio. A fase aquosa foi coletada e precipitada com 1000 µl de isopropanol. Durante lavagem com etanol 70%, o pellet de DNA

foi seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µl de água estéril. As amostras de DNA foram checadas em gel de agarose 1%.

#### 4.6 Análise de PCR

O DNA da comunidade bacteriana foi amplificado com os primers 338fgc (5'- CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3') (O grampo GC está sublinhado) e 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') estendendo-se sobre a região V3 do gene 16S rDNA (Ovreas et al., 1997). O DNA da comunidade de leveduras foi amplificado com os primers NS3, GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC (553 a 573 pares de bases de *Saccharomyces cerevisiae*) e YM951r, TTGGCAAATGCTTTCGC (951 a 935 pares de bases de *Sacharomyces cerevisiae*). O grampo GC do primer NS3 na seqüência 5' é: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG (Haruta et al., 2006). O mistura de PCR (25µl) continha: 0.625 U *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA), 2.5 µl de tampão 10x, 0.1 mM dNTP, 0.2 µM de cada primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 µl do DNA extraído. A amplificação ocorreu da seguinte forma: O DNA foi desnaturado por 5 min a 95 °C seguido por 30 ciclos: desnaturação a 92 °C por 60 s, anelamento a 55 °C por 60 s e a extensão a 72°C por 60 s. Os tubos foram então incubados por 10 min a 72 °C para extensão final. Aliquotas (2µl) do produto de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel com 1% de agarose e depois utilizadas para o DGGE.

#### 4.7 Análise de DGGE

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) usando Bio-Rad DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Richmond, CA, USA). As amostras foram aplicadas

em gel de poliacrilamida 8% (w/v) em  $0.5\times$  TAE. Uma ótima separação foi obtida com variação do gradiente desnaturante de uréia-formamida de 15~55% para a comunidade bacteriana e de 12~50% para a comunidade de leveduras (100% corresponde a 7 M uréia e 40% [v/v] de formamida). A corrida dos géis foi realizada a 200 V por 3 h a 60°C, e depois corados com SYBR-Green I (Molecular Probes, Eugene, UK) (1:10.000 v/v) por 30 min. O gel foi fotografado com densitômetro laser FluorImager e o programa Fragment Analysis (Amersham Biosciences, Sweden).

Amostras de DNA de representantes de cada espécie isolada e tradicionalmente identificada foram submetidas ao sequenciamento e análise de DGGE para identificação dos fragmentos.

A similaridade da composição das comunidades microbianas nas diferentes horas de fermentação foi determinada com base na presença ou na ausência de amplicons detectados por DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database para determinação da riqueza de amplicons (Sa). O agrupamento hierárquico foi realizado através do programa Systat 8.0, com base em matrizes de similaridade geradas pelo método de concordância simples (“simple matching”), utilizando-se o algoritmo de Ward e a distância euclidiana como unidade de medida.

#### **4.8 Análise das sequências**

O DNA de culturas puras de bactérias foi extraído de acordo com Wang et al. (2006). O sequenciamento dos fragmentos do gene 16S rDNA foram usados para identificação das espécies. Para amplificação do gene 16S rDNA, os primers 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1512r (5'-CGGCTACCTTGTTACGACT - 3') foram usados. A reação de PCR foi realizada de acordo com Wang et al. (2006) e os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 0.5% e corrido a 60-65 V em

0.5x TAE for 1h. As amostras foram analisadas em sequenciador de DNA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Pesquisas foram realizadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para fazer o alinhamento das sequências obtidas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 População microbiana (log UFC / mL) de cauim de semente de algodão com arroz

A Tabela 1 apresenta a contagem da população microbiana para cauim de semente de algodão com arroz. No final do processo fermentativo, a população microbiana atingiu seu maior nível, chegando a 8,47 log UFC / mL. A população de bactéria mesófila apresentou-se mais consistente no processo, aumentando logo no início da fermentação para 5,36 log UFC / mL na amostra T8 e atingindo a maior população na amostra seguinte (T16) com 7,51 log UFC / mL, mantendo-se praticamente estável até o final do processo fermentativo. A população de bactérias do ácido lático apresentou crescimento a partir da amostra T8 para T16, atingindo seu maior valor nesta amostra (8,47 log UFC / mL), tendendo a diminuir no final do processo fermentativo na amostra T48 (6,78 log UFC / mL) (Tabela 1).

TABELA 1 População (log UFC / mL) de bactéria mesófila total e bactéria do ácido lático durante fermentação de cauim de semente de algodão com arroz.

Cauim de semente de algodão com arroz	Bactéria mesófila total	Bactéria do ácido lático
T0	0,00	0,00
T8	5,36	0,00
T16	7,51	8,47
T24	7,27	8,01
T32	7,67	8,18
T40	7,68	8,31
T48	7,47	6,78

T0= 0 h, T8= 8 h, T16= 16 h, T24= 24 h, T32= 32 h, T40= 40 h, T48= 48 h de fermentação

Alimentos e bebidas fermentadas tradicionais ou rudimentares, principalmente aquelas preparadas a partir de substratos ricos em carboidratos fermentescíveis, como a mandioca, o amendoim e cereais, apresentam elevado número de micro-organismos durante seu processo fermentativo (Almeida et al., 2007). Estes micro-organismos são responsáveis pelas alterações físico-químicas desses produtos. No caso da bebida fermentada indígena cauim de semente de algodão com arroz, também foram isolados um grande número de micro-organismos embora maioria bactérias.

Um total de 162 isolados, compreendendo 33 diferentes morfotipos foram identificados quanto a gênero e espécie (Tabela 2). Todos os morfotipos isolados foram classificados como sendo bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos. Dos micro-organismos identificados, a população de bactérias Gram-positivas foi de 141 isolados (87,03%) e de bactérias Gram-negativas, 21 isolados (12,96%).

TABELA 2 Espécies de bactérias isoladas das amostras coletadas de cauim fermentado de semente de algodão com arroz, durante 48 h. 0= 0 h, 8= 8 h, 16= 16 h, 24= 24 h, 32= 32 h, 40= 40 h, 48= 48 h de fermentação.

<b>Identificação Tradicional</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>Número de acesso</b>
<i>Lb. fermentum</i>	0	3,33	7,81	6,24	0	0	0	GI: 168208511
<i>Lb. plantarum</i>	0	13,34	3,12	18,75	10	20	50	
<i>Lb. paracasei</i>	0	3,33	7,81	6,24	0	0	0	
<i>Lb. brevis</i>	0	0	0	0	10	0	0	
<i>Lb. agilis</i>	4,54	6,67	6,25	12,5	10	0	40	
<i>Lb. paracasei ssp paracasei</i>	0	3,33	1,55	0	0	0	0	
<i>Lb. viridescens</i>	0	0	10,93	0	0	0	0	
<i>Lb. celobiosus</i>	0	0	1,55	0	0	0	0	
<i>Lb. kefir</i>	0	0	1,55	0	0	10	0	
<i>Lb. confusus</i>	0	3,33	10,93	31,25	20	30	10	
<i>Lb. acidophilus</i>	0	0	1,55	0	0	0	0	
<i>Lb. hansteri</i>	0	0	1,55	0	0	0	0	

“TABELA 2, Cont.”

<b>Identificação Tradicional</b>	<b>0</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>Número de acesso</b>
<i>Lb. mirinus</i>	0	0	1,55	0	0	0	0	
<i>Lb. hilgardii</i>	0	0	1,55	0	0	0	0	
<i>Lb. sake</i>	0	0	0	6,24	0	0	0	
<i>Leuconostoc lactis</i>	0	3,33	0	0	0	0	0	GI: 255983840
<i>Corynebacterium</i> sp	13,63	3,33	7,81	6,24	30	10	0	
<i>C. striatum</i>	27,28	0	4,75	0	10	10	0	
<i>C. amycolatium</i>	27,28	16,67	3,12	6,24	10	0	0	
<i>C. vitarumem</i>	0	3,33	0	0	0	0	0	
<i>Bacillus</i> sp.	6.7	7.9	13	14.8	13.6	6.3	0	GI: 182406810
<i>Enterobacter</i> sp.	4,54	6,67	21,87	12,5	0	20	0	GI: 154814588

### 5.1.2 Identificação convencional

A maior parte dos isolados Gram-positivos foram identificados como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (58,15%), seguido pelo gênero *Corynebacterium* (29,08%) e gênero *Bacillus* (12,76%) (Tabela 2).

Entre as bactérias Gram-positivas, as espécies *Lactobacillus* sp (13,47%), *Bacillus* sp (12,76%), *Lactobacillus plantarum* (11,34%), *Corynebacterium amycolatum* (10,63%), e *Lactobacillus agilis* (9,92%) foram as mais frequentes, sendo isoladas em vários tempos de fermentação da bebida. Portanto, não houve predomínio de uma espécie durante a fermentação da mesma (Tabela 2).

O gênero *Lactobacillus* (*Lb.*), compreendeu o maior número de isolados, sendo identificadas 15 espécies nas amostras analisadas de cauim fermentado de semente de algodão com arroz. Dentre as espécies, citam-se: *Lb. plantarum* (19,75%), *Lb. agilis* (17,28%), *Lb. fermentum*, *Lb. viridescens* e *Lb. paracasei* (8,64% cada), *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* e *Lb. kefir* (2,46% cada), *Lb. celobiosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. hansteri*, *Lb. brevis*, *Lb. mirinus*, *Lb. hilgardii* e *Lb. sake* (1,24% cada), e *Lactobacillus* sp. (23,45%) (Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta os isolados representantes pertencentes ao gênero *Lactobacillus* (*Lb.*), que foram agrupados de acordo com os resultados de fermentação de carboidratos. Os isolados identificados como *Lb. plantarum* foram capazes de fermentar ribose, melibiose, manose e não fermentaram arabinose e rafinose (Tabela 3). Apresentaram crescimento a 15° C e não cresceram a 45° C (dados não mostrados), produzindo gás (CO<sub>2</sub>) a partir de glicose. Considerando a fermentação de melibiose positiva, a identificação desse grupo foi confirmada com 98,7% de confiabilidade nos resultados obtidos. Quando os resultados foram avaliados considerando-se melibiose negativa o grupo passou a ser identificado como *Lb. paracasei* ssp *paracasei*, com apenas 91,8% de confiabilidade. Assim, optou-se por considerar o resultado de maior

confiabilidade para identificação do grupo.

TABELA 3 Agrupamento por perfil de fermentação de carboidratos de *Lactobacillus* isolados durante fermentação de caum de semente de algodão com arroz

Nº	cel	gal	lac	mal	mani	mano	meli	raf	sal	sac	tre	ara	esc	mele	rib	sor	xil	
UFLAIF 48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. paracasei</i>
UFLAIF 49	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+/-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 59	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 61	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 64	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 67	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 84	-	-	-	+	-	+	+	+	+/-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 90	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 106	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+/-	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 108	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 125	+/-	+	-	+	-	+/-	+	+	+	+	-	-	+/-	-	-	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 181	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 188	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 192	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 217	+/-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. ssp</i>
UFLAIF 62	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. Mirinus</i>
UFLAIF 71	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i>
UFLAIF 75	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	<i>Lb. plantarum</i>
UFLAIF 102	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Lb. plantarum</i>

cel = celobiose, Gal = galactose, lac = lactose, mal = maltose, mani = manitol, mano = manose, meli = melibiose, raf = rafinose, sal = salicina, sac = sacarose, ter = trealose, ara = arabinose, esc = esculina, mele = mesezitose, rib = ribose, sor = sorbitol, xil = xilose

...Continua...

“TABELA 3, Cont.”

Nº	Cel	gal	lac	mal	mani	mano	meli	raf	sal	sac	tre	ara	esc	mele	rib	sor	xil	
UFLAIF 81	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	<i>Lb. paracasei</i>
UFLAIF 87	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. fermentum</i>
UFLAIF 201	+/-	+	-	+	-	+	+	+	+/-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. fermentum</i>
UFLAIF 227	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. fermentum</i>
UFLAIF 189	+/-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. fermentum</i>
UFLAIF 151	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+/-	+	<i>Lb. acidophilus</i>
UFLAIF 158	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+/-	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. hansteri</i>
UFLAIF 159	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lc. Lactis</i>
UFLAIF 167	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	<i>Lb. kefir</i>
UFLAIF 170	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. viridescens</i>
UFLAIF 228	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. viridescens</i>
UFLAIF 257	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. viridescens</i>
UFLAIF 171	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	<i>Lb. celobiosus</i>
UFLAIF 163	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. celobiosus</i>
UFLAIF 209	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	<i>Lb. sake</i>
UFLAIF 261	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	<i>Lb. hilgardii</i>
UFLAIF 182	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	<i>Lb. agilis</i>

cel = celobiose, Gal = galactose, lac = lactose, mal = maltose, mani = manitol, mano = manose, meli = melibiose,  
 af = rafinose, sal = salicina, sac = sacarose, ter = trealose, ara = arabinose, esc = esculina, mele = mesezitose, rib = ribose,  
 sor = sorbitol, xil = xilose

O terceiro grupo com maior número de isolados foi identificado como *Lb. agilis*. Os mesmos foram hábeis em fermentar lactose, maltose, manose, melibiose, esculina e não fermentaram trealose, arabinose, melezitose e xilose (Tabela 3). Não apresentaram crescimento a 15 e 45°C, mas produziram gás (CO<sub>2</sub>) a partir de glicose (dados não mostrados).

O grupo de *Lb. fermentum* fermentou glicose, sacarose, ribose, melibiose, maltose, rafinose e não fermentou melezitose, manitol, arabinose, lactose, celobiose e salicina (Tabela 3). Apresentou crescimento a 15° C, não cresceu a 45° C e produziu gás (CO<sub>2</sub>) a partir de glicose (dados não mostrados). O mesmo foi identificado considerando os resultados de celobiose e salicina como negativo, visto que, em alguns exemplares, esses carboidratos não foram tão expressivos (+/-) ou fracos (Tabela 3). Quando se consideram esses resultados positivos o grupo passa a ser identificado como *Lb. brevis* e a confiabilidade diminui de 97,4% para 92,3%. De igual maneira como descrito anteriormente optou-se pelo de maior confiabilidade.

O maior número de isolados foi agrupado como *Lactobacillus* sp (Tabela 2), devido às variações nos resultados de fermentação de carboidratos e índice de confiabilidade muito baixo ou identificação confusa. Visto que os mesmos deverão ser submetidos ao sequenciamento do gene 16 S rRNA, para confirmação das espécies.

A presença de *L. plantarum* tem sido descrita em bebidas fermentadas a partir de cereais, mandioca e milho, tais como Ogi, Uji, Boza, Gari, Agbelina, polpa fermentada de masau e cauim (Gotcheva et al., 2000; Muyanja et al., 2003; Almeida et al., 2007; Amoa-Awua et al., 1996; Fagbemi & Ijah, 2006; Sanii, 1993). Além disso, efeito probiótico vem sendo descrito para as espécies de *L. fermentum*, *L. cellobiosus*, *L. plantarum* e *L. brevis* (Blandino et al., 2003).

Quarenta e um isolados foram obtidos e identificados como pertencentes ao gênero *Corynebacterium* (C.). Esses isolados foram identificados como *C. amycolatum* (36,58%), *C. striatum* (26,83%), *C. vitarumen* (2,44%) e *Corynebacterium* sp. (34,15%) (Tabela 2).

*Corynebacterium amycolatum* e *C. vitarumen* também foram descritos por Almeida et al. (2007) em bebida fermentada usando mandioca e arroz como substrato.

As bactérias Gram-negativas foram classificadas como pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Dentre as espécies identificadas citam-se: *Hafnia alvei* (42,85%), *Klebsiella ozaenae* (33,33%), *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella rhinoschleromatis* (9,53% cada) e *Yokenella regensburge* I (4,76%). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, observou-se que a presença dessas bactérias esteve relacionada com o início do processo fermentativo até as 16 h (horas). A partir daí, a população de enterobacteriaceas ficou restrita a dois isolados na amostra 24 h e dois na amostra 40 h de fermentação. *Klebsiella pneumoniae* também foi isolada e identificada de amostras de Lafun por Padonou et al. (2009). Além dessa, *Pantoea agglomerans* também foi identificada como Gram-negativa pelos mesmos autores. Esses resultados confirmam a presença de bactérias Gram-negativas em alimentos e bebidas fermentadas estando de acordo com os resultados apresentados (Padonou et al., 2009).

No decorrer do processo fermentativo, observou-se aumento das bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* sp, nos resultados apresentados na Tabela 2. Essas bactérias produzem ácido lático como principal componente de seu metabolismo, o que pode ter levado à diminuição das *Enterobacteriaceae* na bebida, devido à suscetibilidade a ácidos (Steinkraus, 1996). Resultado semelhante foi observado durante a produção de *kenkey*, em que se observou rápido declínio no número de *Enterobacteriaceae* (Nche et al., 1994). Além da produção do ácido lático, valores de pH em torno de 3,5 a 4,0 e outras substâncias antimicrobianas produzidas por bactérias do ácido lático podem também contribuir para a diminuição de *Enterobacteriaceae* e outras bactérias Gram-negativas presentes em alimentos e bebidas fermentadas (Nche et al., 1994; Nout & Sarkar, 1999; Steinkraus, 1996; Helander et al., 1997).

Bactérias da família Enterobacteriaceae são facilmente encontradas no solo, na água e nas mãos dos manipuladores de alimentos. Almeida et al. (2007) em estudos de bebidas desta tribo Tapirapé, isolaram e identificaram espécies do gênero *Enterobacter* em amostras de cauim de mandioca com arroz. *Klebsiella* spp também foram isoladas e identificadas em fufu por Fagbemi & Ijah (2006).

## **5.2 Dinâmica da população microbiana utilizando eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)**

O DNA total das amostras obtidas de cauim foi usado como molde nas reações de PCR. Os produtos de PCR foram obtidos com, aproximadamente, 180 pb usando *primers* específicos para a comunidade bacteriana e, aproximadamente, 390 pb usando *primers* específicos para a comunidade fúngica.

Os resultados de DGGE permitiram analisar a dinâmica das comunidades microbianas (bactérias e fungos) durante a fermentação da bebida de semente de algodão com arroz. Foi possível notar alterações relevantes da população bacteriana durante a fermentação da bebida, enquanto que para a população fúngica não foram observadas grandes alterações (Fig. 1 e 2). A técnica de DGGE foi capaz de detectar a presença de fungos, o que não pode ser observado pela técnica tradicional de acordo com metodologia utilizada. Tal fato pode ser relacionado com a dificuldade do método tradicional utilizado e a grande sensibilidade da técnica de DGGE, que é capaz de detectar a presença do micro-organismo, mesmo com quantidades mínimas de DNA.

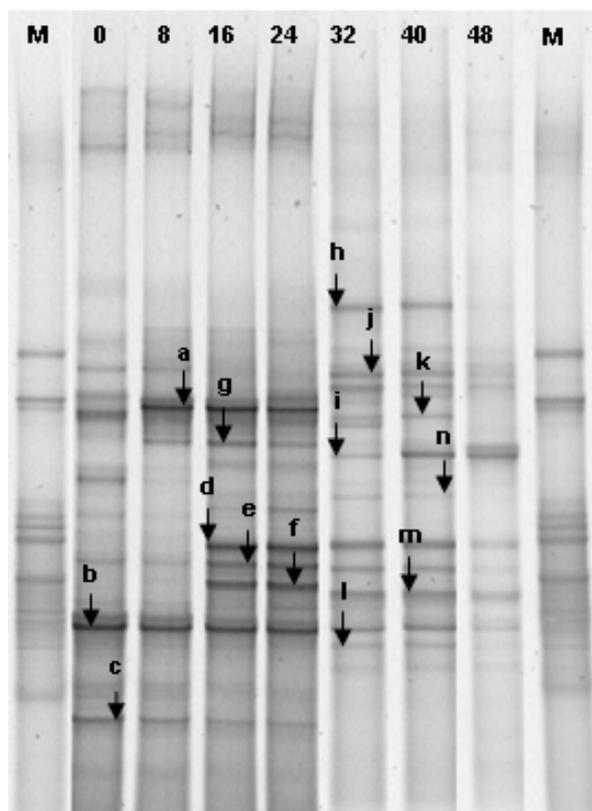


FIGURA 1 Gel de poliacrilamida de DGGE dos fragmentos de DNA do gene 16S rDNA amplificados com *primer* específico para a comunidade bacteriana das amostras do cauim fermentado de semente de algodão com arroz, durante 48 h. M= marcador 0= 0 h, 8= 8 h, 16= 16 h, 24= 24 h, 32= 32 h, 40= 40 h, 48= 48 h de fermentação.

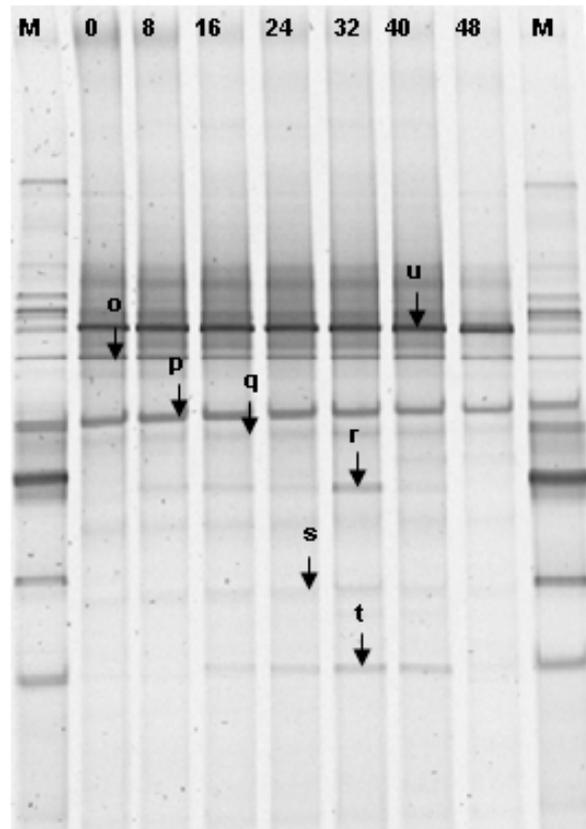


FIGURA 2 Gel de poliacrilamida de DGGE dos fragmentos de DNA da região ITS do 18S rDNA amplificados com *primer* específico para a comunidade fúngica das amostras de cauim fermentado de semente de algodão com arroz, durante 48 h. M= marcador 0= 0 h, 8= 8 h, 16= 16 h, 24= 24 h, 32= 32 h, 40= 40 h, 48= 48 h de fermentação.

A Figura 1 apresenta o gel de DGGE apresentando o perfil de fragmentos amplificados do gene 16S rRNA da comunidade bacteriana presentes durante a fermentação de semente de algodão com arroz. De acordo com os resultados apresentados, observou-se a distribuição dos isolados em dois grandes grupos (Figura 1 e 3). O primeiro, representado pelas bandas (a, b, c, d, e, f, g) surgem no início do processo fermentativo e são dominantes até as 24 h de fermentação. E um segundo, representado pelas bandas (h, i, j, k, l, m, n) surgem depois de 24 h de fermentação e continuam no processo até 40 ou 48 h de fermentação. As bandas (a, b, c) surgiram a partir do início do processo em até 8 h de fermentação, enquanto que as bandas (d, e, f) surgiram depois de 8 h de fermentação (Figura 1 e 3). Foi possível também observar a presença de outras bandas na amostra 0 h de fermentação. Essas bandas provavelmente estavam contaminando os substratos, mas não sobreviveram à competição com as mais resistentes condições de fermentação, já que não foram mais observadas na amostra 8 h de fermentação (Figura 1). O segundo grupo, também apresentou subdivisão em que as bandas (h, k, n) não mais apareceram na amostra 48 h de fermentação (Figura 1 e 3).

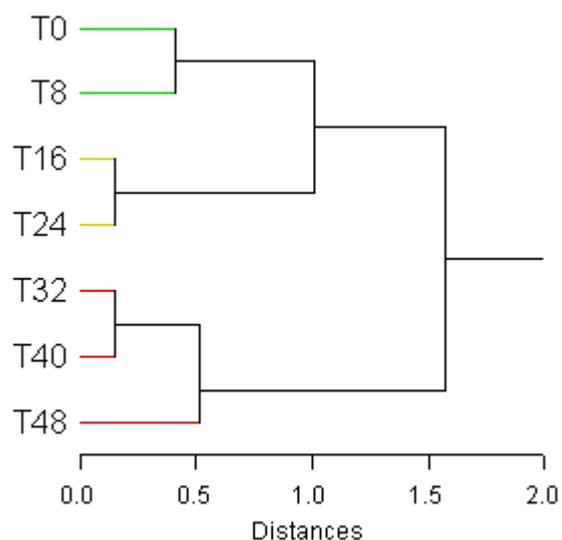


FIGURA 3 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de bactérias presente nas 48 h de fermentação de cauim de semente de algodão com arroz. T0= 0 h, T8= 8 h, T16= 16 h, T24= 24 h, T32= 32 h, T40= 40 h, T48= 48 h de fermentação

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de DGGE de procariotos, verificou-se que não houve predomínio de uma ou mais bandas durante todo o processo fermentativo de cauim de algodão com arroz. É um indicativo de que os resultados obtidos estão de acordo com os da identificação pelo método tradicional (figura 1).

A Figura 2 apresenta o perfil de fragmentos amplificados do gene 18S rRNA da comunidade fúngica presente em cauim fermentado de semente de algodão com arroz.

As bandas foram identificadas com as letras o, p, q, r, s, t, u (Figura 2). Ao comparar os resultados de DGGE de bactérias e fungos, fica claro que a presença de espécies de bactérias foi maior que a dos fungos na fermentação da bebida; esse fato pode ser concluído pela análise do número de bandas detectadas nos géis (Fig. 1 e 2).

Os resultados observados indicaram um agrupamento de todas as amostras, com exceção apenas da amostra 48 h (Figura 2 e 4). As bandas (o,

p, u) foram dominantes e se mantiveram constantes em todas as amostras analisadas, prevalecendo desde o início do processo fermentativo. Porém, essas possíveis espécies não foram isoladas no método usado para o experimento, nos moldes que foram utilizados. Possivelmente, a população fúngica da bebida fermentada cauim de semente de algodão com arroz constitui uma pequena fração de leveduras durante o processo fermentativo que não seja possível sua detecção usando método tradicional, de acordo com metodologia utilizada. Nielsen et al. (2005) trabalhando com cacau sugeriram que espécies que constituem valores menores que 4% da população de leveduras não são isoladas no método tradicional. Os mesmos autores relataram que *Hanseniaspora guilhermondii* só foi detectada no início do processo fermentativo. Além disso, o nível de detecção da técnica DGGE é de 1% da microbiota de leveduras (Prakitchaiwattana et al., 2004) o que pode ser uma possível explicação para os resultados obtidos pelo método tradicional para a comunidade fúngica.

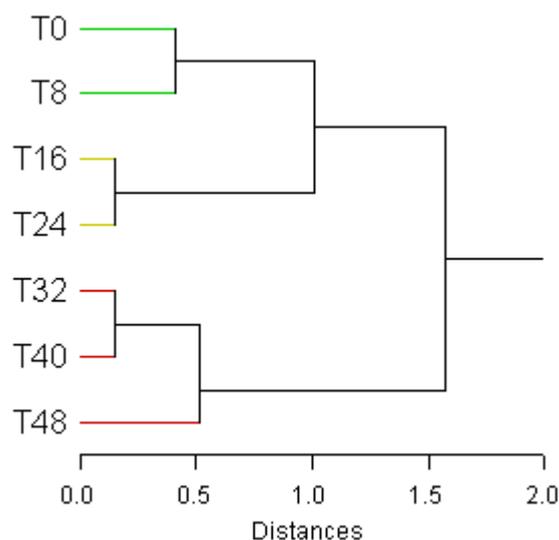


FIGURA 4 Agrupamento hierárquico de amplicons de região ITS do 18S rDNA de fungos presente nas 48 h de fermentação de cauim de semente de algodão com arroz. T0= 0 h, T8= 8 h, T16= 16 h, T24= 24 h, T32= 32 h, T40= 40 h, T48= 48 h de fermentação

Bandas fortes ou fracas no gel de DGGE não são quantitativas da população presente na amostra analisada. Assim, uma forte ou fraca intensidade da banda não está relacionada com a microbiota presente na bebida e sim a eficiência dos *primers* para amplificar a região de interesse de acordo com cada gênero ou espécie (Nielsen et al., 2005). Portanto, a definição da região a ser amplificada e a escolha dos *primers* é de extrema importância quando se trabalha com um tipo de bebida tradicional e rudimentar em que a microbiota é totalmente desconhecida, como é o caso da bebida fermentada de algodão com arroz produzida pelos índios Tapirapé. Talvez, essa seja a explicação para as bandas de maior e menor intensidade apresentada no gel de DGGE (Figura 2). O mix de isolados puros e identificados, *Trichosporon asahii* apresentou pequena amplificação do gene 26 S rRNA comparado com os demais isolados investigados quando observado em gel de DGGE (Nielsen et al., 2005).

A literatura tem sugerido que, em alguns habitats naturais, 90 a 99% da microbiota podem ser compostas de população viável não cultivável (PVNC) em meio de cultivo por método tradicional (Amann et al., 1995; Ercolini et al., 2001). Por exemplo, *Candida zemplinina* tem sido proposta como PVNC durante fermentação de vinho (Mills et al., 2002) e fermentação de cacau (Nielsen et al., 2005). Isso pode explicar a dificuldade de identificação de leveduras em meio YEPG durante processo fermentativo de cauim de semente de algodão com arroz e a amplificação de bandas do gene rRNA18 S pela técnica DGGE (Figura 2).

O método tradicional possui algumas desvantagens devido à dificuldade no isolamento e cultivo de micro-organismos presentes e são parcialmente seletivos e excluem parte da comunidade microbiana existente na amostra a ser analisada (Chen et al., 2008). Foi estimado que menos de 1% das bactérias naturais do ambientes são cultivadas (Amann et al., 1995). O DGGE oferece uma alternativa rápida para o estudo de micro-organismos em diversos ambientes incluindo alimentos e bebidas. PCR-DGGE tem sido aplicado com sucesso não apenas para caracterizar a microbiota, mas também para monitorar o desenvolvimento e sua composição durante a fermentação. Nos últimos anos, a técnica de DGGE vem sendo empregada para estudo da dinâmica de micro-organismos em diversos produtos, como alimentos e bebidas (Muyzer & Smalla, 1998).

#### 4 CONCLUSÃO

A população de bactérias Gram-positivas (58,15%) foi maior que a população de Gram-negativas (12,96%). Dentre todos os isolados identificados, predominaram as Gram-positivas catalase positiva (58,15%) e as espécies mais frequentes foram *Lactobacillus* sp (13,47%), *Bacillus* sp (12,76%), *Lactobacillus plantarum* (11,34%), *Corynebacterium amycolatum* (10,63%) e *Lactobacillus agilis* (9,92%). A técnica de DGGE permitiu observar a presença de leveduras na bebida o que não tinha sido detectado pela técnica tradicional. Estudos de sequenciamento dos fragmentos de DGGE devem ser realizados para identificação dos mesmos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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**, Amsterdam, v. 120, n. 1/2, p. 146-151, Nov. 2007.
- AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Review**, Washington, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.
- AMOA-AWUA, W. K.; APPOH, F. E.; JAKOBSEN, M. Lactic acid fermentation of cassava into agbelima. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 31, n. 1/3, p. 87-98, Aug. 1996.
- AMPE, F.; MIAMBI, E. Cluster analysis, richness and biodiversity indexes derived from denaturing gradient gel electrophoresis fingerprints of bacterial communities demonstrate that traditional maize fermentations are driven by the transformation process. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 1, p. 91-97, Sept. 2000.
- BLANDINO, A.; AL-ASSIERI, M. E.; PANDINELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research Internacional**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p. 527-543, 2003.
- CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, n. 25, p. 492-501, Jan. 2008.
- ERCOLINI, D. G.; MOSCHETTI, G.; BLAIOTTA, G.; COPPOLA, S. The potencial of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 24, p. 610-617, 2001.
- FAGBEMI, A. O.; IJAH, U. J. J. Microbial population and biochemical changes during production of protein-enriched fufu. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 635-640, 2006.
- GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 67, n. 1/2, p.19-34, July 2001.

GOTCHEVA, V.; PANDIELLA, S. S.; ANGELOV, A.; ROSHKOVA, Z. G.; WEBB, C. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. **Process Biochemistry**, Toronto, v. 36, n. 1, p. 127-130, Sept. 2000.

HAMMES, N. W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera lactobacillus and carnobacterium. In: BALLOWS, A.; TRUPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. H.; SCHLEIFER, K. D. (Ed.). **The prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v. 2, p. 1535-1594.

HARUTA, S.; UENO, S.; EGAWA, I.; HASHIGUCHI, K.; FUJII, A.; NAGANO, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Sucession of bacterial and fungal communities during a traditional pot fermentation of rice vinegar assessed by PCR-mediated denaturing gradient gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 1/2, p. 79-87, May 2006.

HELANDER, I. M.; VONWRIGHT, A.; MATTILASANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria. **Biotechnology and Food Research**, Oxford, v. 8, n. 5, p. 146-150, 1997.

HOLT, J. C.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large-subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 331-371, 1998.

MILLS, D. A.; JOHANNSEN, E.; COCOLIN, L. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4884-4893, Oct. 2002.

MUYANJA, C. M. B. K.; NARVHUS, J. A.; TREIMO, J.; TANGSRUD, T. Isolation, characterization and identification acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 80, n. 3, p. 201-210, Feb. 2003.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, p. 127-141, 1998.

NCHE, P. F.; ODAMTTENT, G. T.; NOUT, M. J. R.; ROMBOUTS, F. M. Dry milling and accelerated fermentation of maize for industrial production of kenkey, a Ghanaian cereal food. **Journal of Cereal Science**, London, v. 20, p. 291-298, 1994.

NIELSEN, D. S.; HONHOLT, S.; TANO-DEBRAH, K.; JESPERSEN, L. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations investigated using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 271-284, Mar. 2005.

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

OVREAS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelenvannet, as determined by denaturing gradient electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Stuttgart, v. 63, n. 9, p. 3367-3355, Sept. 1997.

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

- PADONOU, W.; NIELSEN, D. S.; HOUNHOUIGAN, J. D.; THORSEN, L.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. The microbiota of Lafun, African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1/2, p. 22-30, July 2009.
- PEDERSEN, C. S. **Microbiology of food fermentations**. Westport: AVI, 1979. 778 p.
- PRAKITCHAIWATTANA, C. J.; FLEET, G. H.; HEARD, G. M. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyze the yeast ecology of wine grapes. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 4, n. 8, p. 865-877, Sept. 2004.
- SANNI, A. I. The need for process optimization of African fermented foods and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, Copenhagen, v. 18, n. 2, p. 85-95, Apr. 1993.
- SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice-cassava fermentations produced by the indigenous Tapirapé people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Oxford, v. 7, n. 6, p. 966-972, Sept. 2007.
- SCORZETTI, G.; FELL, J. W.; FONSECA, A.; STATZELL-TALLMAN, A. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large-subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **FEMS Yeast Research**, Oxford, n. 2, p. 495-517, 2002.
- STEINKRAUS, K. H. **Handbook of indigenous fermented foods**. 2. ed. New York: M. Dekker, 1996. 792 p.
- VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. de A. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: E. Blücher, 2001. v. 4, cap. 4., p. 91-144.
- WANG, X.; HARUTA, S.; WANG, P.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; CUI, Z. Diversity stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 106-115, Mar. 2006.