

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA E  
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA  
BEBIDA FERMENTADA *CAXIRI*  
PRODUZIDA PELO POVO JURUNA (YUDJÁ),  
MATO GROSSO, BRASIL**

**CLAUDIA CRISTINA AULER DO AMARAL  
SANTOS**

**2010**

**CLAUDIA CRISTINA AULER DO AMARAL SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA DA BEBIDA FERMENTADA *CAXIRI* PRODUZIDA PELO  
POVO JURUNA (YUDJÁ), MATO GROSSO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientadora

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010

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

Santos, Claudia Cristina Auler do Amaral.

Identificação da microbiota e caracterização físico-química da  
bebida fermentada *caxiri* produzida pelo povo Juruna (Yudjá), Mato  
Grosso, Brasil / Claudia Cristina Auler do Amaral Santos. – Lavras :  
UFLA, 2010.

95 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Mandioca. 2. Fermentação. 3. ARDRA. 4. PCR-DGGE. 5.  
Bebida indígena. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 576.163

**CLAUDIA CRISTINA AULER DO AMARAL SANTOS**

**IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-  
QUÍMICA DA BEBIDA FERMENTADA *CAXIRI* PRODUZIDA PELO  
POVO JURUNA (YUDJÁ), MATO GROSSO, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2010

Prof. Dr. Disney Ribeiro Dias                      UNILAVRAS

Profª. Dra. Cristina Ferreira Silva e Batista      UFLA

Profª. Dra. Solange Cristina Carreiro              UFT

Profª. Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*Aos meus pais, Claudio Adalberto do Amaral Santos e Isabel Cristina Auler  
Pereira, pelos ensinamentos e pelo incentivo.  
Ao meu amigo e companheiro Paulo Abdala Bittar, pelo amor e  
companheirismo e ao meu irmão, Renato Cesar pela amizade.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar saúde, sabedoria e fé para a concretização de meus objetivos.

Aos meus pais, Claudio e Isabel, pelo incentivo, pela educação que me proporcionaram e pelos princípios que me ensinaram.

Ao meu amigo e noivo, Paulo Abdala Bittar, por sempre me apoiar e me dar forças para continuar, mesmo não estando por perto, além de ser paciente e me impulsionar a sempre crescer, nunca desanimar e a atingir meus objetivos.

Ao meu irmão, Renato, por fazer parte da minha vida, sempre me apoiando.

À professora Rosane Freitas Schwan, por todos os ensinamentos, pela palavra amiga, pelos conselhos, enfim pelo aprendizado a cada dia.

A todos os professores dos programas de pós-graduação da UFLA. Em Especial, ao professor Eustáquio Souza Dias e à professora Cristina Ferreira Silva e Batista, pelos ensinamentos prestados durante a minha caminhada.

À Ivani, que dividiu comigo a execução do experimento.

Aos meus colegas de laboratório, que me auxiliaram na execução do experimento, Gilberto, Euziclei, Gabriela, Cintia e Danielle.

À Universidade Federal de Lavras, por proporcionar a minha formação e pelo espaço físico.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realizar o mestrado.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida e pelo financiamento do projeto.

Aos amigos que conquistei, Euziclei, Cintia, Gabi, Dani, Gilberto, Bia e Thiago, pessoas especiais que levarei por toda a vida!

Aos meus colegas de convívio diário no laboratório, Carla, Lílian, Whasley, Cássia, Sarita, Mari, Leandro e Francesca, pelo companheirismo e momentos de descontração.

A Ivani, Magda e Cidinha, pela paciência e bom humor em atender aos meus pedidos.

A todos que torcem por mim, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO GERAL.....	i
GENERAL ABSTRACT.....	iii
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução.....	01
2 Referencial Teórico.....	03
2.1 População indígena no Brasil.....	03
2.2 O povo Juruna (Yudjá).....	03
2.3 O <i>cauim</i> de mandioca dos Juruna (Yudjá): <i>cauim dubia</i> ou <i>caxiri</i> ..	05
2.4 <i>Caxiri</i> : classificação e processos de produção.....	09
2.5 Alimentos e bebidas fermentados por povos indígenas.....	14
2.6 Biologia molecular para a avaliação de comunidades microbianas.	20
2.6.1 Estudo da diversidade microbiana por meio da análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA).....	21
2.6.2 Avaliação de comunidades microbianas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).....	23
3 Referências Bibliográficas .....	26
CAPÍTULO 2: Caracterização da microbiota e mudanças físico- químicas da bebida fermentada <i>caxiri</i> produzida pelo povo Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brasil.....	35
1 Resumo.....	36
2 Abstract.....	37
3 Introdução.....	38
4 Materiais e Métodos.....	41
4.1 Área de estudo.....	41
4.2 Preparo da bebida.....	41

4.3 Amostragem .....	43
4.4 Análises microbiológicas.....	43
4.4.1 Enumeração dos microrganismos (bactérias aeróbias mesofílicas, Gram-negativas, bactérias ácido-láticas (BAL), leveduras e fungos filamentosos).....	43
4.5 Identificação da microbiota.....	44
4.5.1 Contagem e classificação morfológica das colônias e isolamento dos morfotipos.....	44
4.5.2 Identificação de bactérias.....	45
4.5.2.1 Análise dos isolados bacterianos pela técnica ARDRA da região intergênica 16S-23S do rDNA.....	45
4.5.2.2 Sequenciamento da região intergênica 16S-23S do rDNA para identificação dos isolados bacterianos.....	47
4.5.3 Identificação de leveduras.....	47
4.5.3.1 Análise dos isolados leveduriformes pela técnica ARDRA da região intergênica ITS1-5.8S do rDNA.....	48
4.5.3.2 Sequenciamento da região ITS1-5.8S rDNA para identificação dos isolados leveduriformes.....	49
4.6 Avaliação da comunidade microbiana presente nas amostras por PCR-DGGE.....	49
4.6.1 Extração do DNA microbiano das amostras.....	49
4.6.2 Amplificação por PCR.....	50
4.6.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)...	51
4.6.3.1 Análises estatísticas.....	51
4.7 Caracterização físico-química.....	52

4.7.1 Determinação dos açúcares solúveis totais (AST).....	52
4.7.2 Determinação da proteína bruta (PB).....	52
4.7.3 Determinação do amido.....	52
4.7.4 Determinação da acidez total titulável (ATT), pH e °Brix.....	53
4.7.5 Substratos e metabólitos.....	53
5 Resultados e Discussões.....	55
5.1 Enumeração dos microrganismos e identificação das espécies envolvidas na fermentação do <i>caxiri</i> .....	55
5.1.1 Bactérias e leveduras envolvidas na fermentação do <i>caxiri</i> .....	57
5.2 Sucessão microbiana durante a fermentação do <i>caxiri</i> .....	66
5.3 PCR-DGGE.....	70
5.4 Caracterização físico-química do <i>caxiri</i> .....	75
6 Conclusões.....	82
7 Considerações Finais.....	83
8 Referências Bibliográfica.....	84

## RESUMO GERAL

SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral. **Identificação da microbiota e caracterização físico-química da bebida fermentada *caxiri* produzida pelo povo Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brasil.** 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

O *caxiri* é uma tradicional bebida alcoólica fermentada indígena produzida pelos índios (Juruna) Yudjá, habitantes do Parque Indígena do Xingu, localizado no estado do Mato Grosso. Essa bebida é preparada à base de mandioca e batata-doce, e é originalmente fermentada por microrganismos que estão presentes nas matérias-primas utilizadas para a sua produção. Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a microbiota presente, por métodos convencionais e moleculares, bem como caracterizar físico-quimicamente a bebida *caxiri*. A população bacteriana variou de 3,05 log UFC/mL a 5,33 log UFC/mL. Foram isoladas 343 bactérias. Dentre estas, 51% foram identificadas como gram-positivas esporulantes, pertencentes ao gênero *Bacillus*, sendo o principal grupo entre os isolados bacterianos. A população de leveduras encontrada no início da fermentação era de 3,27 log UFC/mL, aumentando para 7,34 log UFC/ml, dominando o processo fermentativo a partir de 48 horas. De acordo com os resultados de testes bioquímicos e dos perfis gerados pelo ARDRA, os isolados microbianos foram identificados pelo sequenciamento da região 16S-23S rDNA (bactérias) e ITS1-5.8S rDNA (leveduras). As bactérias dominantes durante a fermentação do *caxiri* foram *Bacillus pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Sphingomonas* sp. e *Pediococcus acidilactici*. Outras espécies menos frequentes foram *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. simplex*, *Thalassobacillus devorans*, *Lactobacillus plantarum* e *Enterobacter* sp. As leveduras dominantes foram *Saccharomyces cerevisiae*, mas também foram encontrados representantes das espécies *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *P. guilliermondii* e *Cryptococcus luteolus*. Análises de DGGE foram realizadas, sendo possível observar que houve pouca alteração das comunidades microbianas durante o processo fermentativo, indicando que os microrganismos presentes durante a fermentação eram provenientes, possivelmente, do inóculo, do ambiente e de utensílios utilizados na preparação da bebida. Observando-se as alterações físico-químicas durante a fermentação, pode-se notar uma progressiva acidificação do meio, apresentando variação de pH de 4,76 para 3,15.

---

\* Orientadora: Rosane Freitas Schwan – UFLA

O etanol foi o metabólito da fermentação produzido em maior quantidade, apresentando concentração, ao final do processo fermentativo, de  $83,9 \text{ g L}^{-1}$  da bebida. O ácido láctico também foi produzido durante a fermentação, atingindo  $27,89 \text{ g L}^{-1}$  ao final do processo. Foi observada redução nos teores de açúcares totais, que variaram de 32,81 para  $15,26 \text{ g/100g}$  da amostra. O teor médio de amido encontrado na bebida também reduziu gradativamente, variando de 11,3% até 6,8%, no final da fermentação. O teor de proteína na matéria integral foi de 1,3%, em média. O estudo das alterações físico-químicas do *caxiri* auxiliou no entendimento do papel dos diferentes microrganismos durante a fermentação. A caracterização das comunidades microbianas presentes no *caxiri* deve gerar um banco de microrganismos cujas características fisiológicas podem ter efetiva aplicação biotecnológica, principalmente na seleção de possíveis microrganismos para a produção de culturas iniciadoras.

## GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Claudia Cristina Auler do Amaral. **Microbial identification and physico-chemical characterization of fermented beverage *caxiri* produced by the people Juruna (Yudjá), Mato Grosso, Brazil.** 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.\*

*Caxiri* is a traditional alcoholic fermented beverage produced by Juruna (Yudjá) Indians inhabitants of Xingu Park, located in the Mato Grosso State. This beverage is prepared with cassava and sweet potato, and is originally fermented by microorganisms presented on the raw materials used in its production. The objective of this study was to identify the microbial population, by conventional and molecular methods, as well characterize physical-chemical the *caxiri*. The bacterial population found ranged from 3.05 log CFU/ml and 5.33 log CFU/ml. It was isolated 343 bacteria, and among them 51% was classified as Gram positive spore forming, belonging to the *Bacillus* genus, being the main group among the bacteria isolated. The yeast population found in the beginning of fermentation was 3.27 log CFU/ml, increasing to 7.34 log CFU/ml, showing that the yeasts dominated the fermentation process after 48 hours. According to the biochemical tests results and ARDRA profiles, the microbial isolated were grouped in order to do the identification of the species by sequencing of the region 16S-23S rDNA (bacteria) and ITS1-5.8S rDNA (yeast). The dominant bacteria presented during *caxiri* fermentation were *Bacillus pumilus*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *Sphingomonas sp.* and *Pediococcus acidilactici*. Other species less frequently reported were *B. megaterium*, *B. amyloliquefaciens*, *B. simplex*, *Thalassobacillus devorans*, *Lactobacillus plantarum* and *Enterobacter sp.*. The dominant yeasts were *Saccharomyces cerevisiae*, but *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia membranifaciens*, *P. guilliermondii* and *Cryptococcus luteolus* species were also found. DGGE analysis was performed revealing that there was little change in the microbial communities during the fermentation process, indicating that the microorganisms present during fermentation had come possibly from the inoculum, the ambient or the utensils used during the beverage preparation. Observing physical and chemical changes during fermentation was possible to notice that a progressive acidification of the medium with the variation of pH 4.76 to 3.15. Ethanol was the microbial metabolite produced in larger quantities, showing higher concentration at the end of fermentative process of 83.9 g l<sup>-1</sup>.

---

\* Adviser: Rosane Freitas Schwan

Lactic acid was also produced during fermentation, reached  $27.89 \text{ g L}^{-1}$  at the end of the process. Reduction in the total sugar content was observed, which ranged from 32.81 to 15.26 g/100g of the sample. The starch content found in the beverage also decreased slowly, ranging from 11.3 until 6.8% at time 120 hours. The protein content was 1.3% on average. The study of physical-chemical changes of *caxiri* helped in understanding the role of different microorganisms during fermentation. The characterization of the microbial communities present in *caxiri* should generate a group of microorganisms whose physiological characteristics may have an effective biotechnological application, mainly to the selection of microorganisms in the production of starter cultures.

## CAPITULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A elaboração de alimentos e bebidas fermentados é um dos mais antigos processos que acompanham a civilização. Métodos de fermentação de leite, carne e vegetais foram descritos em registros datados de 6000 a.C. (Fox, 1993). Esses processos eram artesanais *in natura* e, obviamente, não apresentavam análises sobre o papel dos microrganismos (Caplice, 1999). Provavelmente, nenhum outro processo teve tamanho impacto nos hábitos nutricionais e na cultura dos alimentos para a humanidade. Além de preservar, a fermentação melhora a qualidade, a aceitabilidade sensorial de muitos alimentos e contribui para a redução de fatores antinutricionais e de componentes tóxicos ou indesejáveis presentes nas matérias-primas fermentescíveis.

Bebidas alcoólicas fermentadas são produzidas e consumidas, geralmente, em ocasiões comemorativas, por diferentes povos indígenas. Dependendo da região e da etnia, há variações nas matérias-primas e no tempo de fermentação (Andrade et al., 2003). O *caxiri*, ou *cauim dubia*, produzido pelo povo Yudjá, ou Juruna, é uma bebida alcoólica fermentada à base de mandioca e de batata-doce e é fermentada por microrganismos que estão presentes nas matérias-primas utilizadas para a sua produção. O *caxiri*, em particular, é tradicionalmente relacionado com rituais sagrados e profanos dos índios e é bebido ritualmente durante as festas indígenas, mutirões ou trabalhos coletivos, como na derrubada ou no plantio das roças.

Praticamente não há dados na literatura brasileira acerca dos microrganismos envolvidos nessas fermentações. Entretanto, diversos trabalhos realizados, principalmente em países africanos e asiáticos, já foram publicados. Os dados desses trabalhos mostraram que há expressiva população de bactérias e leveduras associadas à produção desses alimentos e bebidas fermentados, que

podem representar uma fonte potencial para estudos da biodiversidade das comunidades de microrganismos envolvidas. A inexistência de dados na literatura torna essa uma emergente linha de pesquisa.

A partir desse conhecimento, despertou o interesse de estudar os substratos e as técnicas de produção utilizadas pelo povo Juruna (Yudjá) na preparação desta bebida fermentada, com o isolamento e a identificação dos microrganismos presentes. Além da inquestionável importância para os estudos da biodiversidade, o isolamento e a caracterização dessas comunidades devem gerar um banco de microrganismos cujas características fisiológicas podem ter efetiva aplicação biotecnológica.

Por ser o *caxiri* uma bebida fermentada ainda não estudada, os métodos dependentes de cultivo foram combinados com métodos independentes de cultivo para conhecimento da diversidade microbiana. Métodos independentes de cultivo, como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), foram desenvolvidos para a caracterização de isolados de comunidades microbianas complexas (Muyzer et al., 1993; Masoud et al., 2004).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de isolar e identificar a microbiota presente na fermentação do *caxiri* por métodos convencionais e moleculares. Além disso, buscou-se avaliar a dinâmica da população microbiana presente pela técnica de DGGE, bem como caracterizar físico-quimicamente a bebida, durante o processo fermentativo.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 População indígena no Brasil**

Atualmente, encontram-se, no território brasileiro, 227 povos (ou etnias) falantes de mais de 180 línguas diferentes. A maior parte dessa população distribui-se por diversas aldeias, situadas no interior de 593 terras indígenas, de norte a sul do território nacional, (aproximadamente 12% do território brasileiro) (Instituto Sócioambiental, 2007).

Na Amazônia Legal, que é composta pelos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e parte oeste do Maranhão, vive 60% da população indígena. Segundo o Instituto Sócioambiental (2007), a população indígena no Brasil atual está estimada em 600 mil indivíduos, dos quais cerca de 480.000 vivem em terras indígenas e em regiões urbanas vizinhas, enquanto outros 120.000 residem em diversas capitais do país.

### **2.2 O povo Juruna (Yudjá)**

Os Juruna ou Yudjá representam uma civilização de navegadores e produtores de bebidas fermentadas. Suas aldeias estão localizadas na parte norte da terra indígena, entre a BR-80 e o Posto Indígena Diauarum. Neste eixo, as terras da margem ocidental do rio Xingu pertencem ao município de Marcelândia, e as da margem oriental, a São José do Xingu. A partir de uma perspectiva linguística e cultural, os Yudjá ali possuem algumas aldeias, entre as quais estão Pequizal, Pakisamba, Tubatuba e Pakaya, a mais nova delas, à beira do rio Xingu e da rodovia MT-80 (Figura 1) (Instituto Sócioambiental, 2007).

Atualmente, vivem nessa região, segundo dados coletados em 1º de julho de 2009, pela Fundação Nacional da Saúde (Funasa), 346 índios Yudjá, dos quais 161 mulheres são e 185 homens, inseridos em 41 famílias.



parece mais próprio à vida moderna que esse povo tem adotado desde meados do século XX (Lima, 2005).

O etnônimo Juruna (Yuruna, Jurúna, Juruúna, Juruhuna, Geruna) é de origem estrangeira e significa “boca preta”, em língua geral. Teria sido motivado por uma tatuagem que, segundo consta em registros do século XVII, este povo usava quando o seu território no baixo Xingu foi invadido, alguns anos depois da fundação de Belém (1615). Sua autodenominação é Yudjá [Yudya; em escrita fonêmica: Iuja], entretanto, Juruna apenas é utilizado como autorreferência, como prevalecia antes da introdução de escolas nas aldeias, em meados dos anos 1990. A partir de então, passou a ser considerado incorreto (Lima, 2005).

Seus hábitos alimentares incluem o consumo de pratos feitos à base de peixes e quelônios aquáticos e de mandioca, arroz, batata-doce, batata, cará, banana, farinha de mandioca, mel e o *caxiri*. O *caxiri* é uma bebida fermentada indígena, um tipo de cerveja, à base de mandioca. A bebida é também descrita, por Cunningham (2007), como parte de hábitos da tribo Juruna (Yudjá) do Baixo Xingu. Segundo observações do pesquisador, o *caxiri* é um tipo de mingau alcoólico fermentado. É preparado em grandes quantidades durante as festas indígenas, mutirões, trabalhos coletivos e na derrubada ou no plantio das roças (Museu do Índio, 1999).

### **2.3 O *cauim* de mandioca dos Juruna (Yudjá): *cauim dubia* ou *caxiri***

*Chicha*, *caxiri*, *cauim* e *kurai* são alguns dos codinomes atribuídos pelas populações amazônicas a este fermentado de mandioca (que em muitos lugares aparece como fermentado de milho). Dentre as muitas bebidas fermentadas que produzem, destacam-se, por sua importância na dieta e seu simbolismo, dois *cauims* de mandioca, o *dubia* e o *yakupa* (Lima, 2005).

Entre os Yudjá, as mulheres produzem diversas bebidas (*awari*), em sua maioria, fermentadas (*yakoha*) e consideram-nas a principal fonte nutritiva.

Essas últimas podem ser divididas em dois grupos: os cauims refrescantes, feitos em pequena quantidade, de 20 a 60 litros, para matar a sede da família e os cauims embriagantes (*yakoha*, propriamente ditos), feitos para se beber ritualmente. No primeiro grupo, destaca-se um cauim da puba seca de mandioca, o *yakupa*, que se consome o ano inteiro, diariamente. Os outros são feitos em seu lugar e dependem da estação: cauim de inhame, cará, batata, macaxeira, abóbora, pequi, palmito de irajá e, finalmente, milho verde. A característica básica desse grupo é que a fermentação, além de baixa, é um fim subordinado à conservação. Todos estão prontos para o consumo no momento em que se acaba de prepará-los, quando então são definidos como “doce”, e vão fermentando com o passar dos dias (Lima, 2005).

As bebidas do segundo grupo são encabeçadas pelo *cauim dubia* ou *caxiri*, feito com a puba fresca da mandioca. É produzido o ano inteiro e sua receita é à base de outros *cauims* embriagantes obtidos com a adição de um segundo produto: a mandioca brava adocicada (o *wāwaru*) ou o milho seco. No primeiro caso, tem-se o *cauim ŕaka*: a massa já fermentada do *cauim dubia* é dissolvida em mingau quente de *wāwaru* – que poderia ser usado como veneno, deixando-se mal cozido o mingau. No segundo caso, tem-se o *cauim awawia* ou o *pāwi* (*dubia* temperado com um cauim de milho seco, cujo teor alcoólico é o mais alto de todos). Há, ainda, o *katɣupa*, cuja receita não é conhecida (Lima, 2005).

A produção do *cauim yakupa*, *cauim* refrescante, é subordinada à produção do *dubia*, ou seja, o *yakupa* é um subproduto do *dubia*. A mandioca é posta a pubar (em canoas de navegação ou em cercados na beira do rio ou de igarapés), até o ponto em que se torna pastosa, momento em que é absolutamente necessário interromper o processo de puba. A continuação azedaria a mandioca e o pressuposto básico é o de que a mandioca azeda não dá *cauim* embriagante. Esse processo de puba apresenta três fases consecutivas: a

fermentação, que leva ao amadurecimento e evolui para o azedamento (ou apodrecimento) (Lima, 2005).

O processo deve ser interrompido no momento em que a mandioca está ao mesmo tempo “madura” e “insípida”, quer dizer, não azeda. Ela indica também que se “extraí o intestino” da mandioca madura e se põe a secar ao ar livre, ou em canoas velhas suspensas, ao lado das casas. O *tipiti*, artefato que funciona como uma prensa artesanal de palha para a retirada de água das raízes, também costuma ser utilizado durante esta etapa. Os fragmentos (acrescidos de outros que se descobrem mais tarde, durante a transformação da puba fresca, em farinha) são secos ao sol por alguns dias ou torrados em tacho de ferro com fogo de lenha para acelerar o processo. Essa puba seca é então socada em pilão, dissolvida em água e peneirada. Para liquefazer o mingau grosso e escuro, acrescenta-se uma porção de batata-doce crua ralada. Após dois ou três dias, a bebida está fermentada. Na Figura 2 observam-se algumas das etapas da preparação do *caxiri* pelo povo Yudjá. Essa bebida apresenta um sabor entre picante e azedo, muito agradável (Lima, 2005).

Atribui-se aos Kayabi a invenção, datada de 1989, de uma nova cerveja, baseada na combinação de duas receitas Yudjá: a do *cauim* refrescante de macaxeira e a do *cauim dubia*; as mulheres passaram a produzir um *cauim* embriagante de macaxeira (Lima, 2005).

Todo *cauim* embriagante é necessariamente feito em quantidade superior à das bebidas refrescantes. O ideal é possuir panelas grandes e pequenas destinadas a cada grupo de bebidas, panelas que jamais serão utilizadas para cozinhar peixe ou carne (Lima, 2005). O *cauim*, cujo consumo serve de fundamento para a sociabilidade ritual, é produzido estritamente pelas mulheres, a partir da mandioca, produto que é (nesse contexto) atribuído aos homens, ainda que efetivamente as mulheres tenham um papel muito ativo no plantio. Assim, o *cauim* tem como donos uma mulher e um homem, o seu marido (Lima, 2005).



FIGURA 2 Etapas na preparação do *caxiri*: mandioca após pubagem (A); descasque e retirada de partes indesejadas (B); retirada da água de puba na prensa “*tipiti*” (C); peneiragem (D); torração (E); dissolução dos grãos (F) e (G); bebida pronta (H).

A cauinagem, ocasião de preparo e consumo da bebida, tem um significado profundo para os indígenas. A abertura do *cauim* dá-se na alvorada, sendo a duração (um dia e uma noite) uma exigência para que as fases que completam uma cauinagem se desenvolvam. Envolve um ritual. Ao alvorecer, o dono, *iwa*, vai à casa do *cauim* constatar que a cerveja está no ponto. Ele apanha a trompa *kāmahu* e toca, por alguns minutos, do alto do barranco da aldeia, com o olhar voltado para o rio, aguardando a chegada dos convidados. A cada homem, serve uma cuia. Bebe-se lenta e ininterruptamente e devolve-se a cuia vazia. O serviço do *cauim* consiste em deixar-se embriagar por outrem e embriagar os outros, com gestos de surpreendimentos recíprocos (Lima, 2005).

#### **2.4 Caxiri: classificação e processos de produção**

O *caxiri*, conhecido como “cerveja”, “vinho” ou bebida fermentada da raiz da mandioca, pode ser classificado como “cerveja insalivada”, obtida por meio da utilização de microrganismos selvagens com atividade amilolítica. Considerando sua graduação alcoólica de 10° a 11°GL (próxima dos teores alcoólicos de fermentados de frutas) e seu processamento com adição de bebidas destiladas e de sucos de frutas, o *caxiri* pode ser admitido na classe “Outras bebidas fermentadas”, conforme o Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009 (Brasil, 2009).

Diferentemente das cervejas maltadas, em que as amilases endógenas dos grãos germinados convertem o amido em açúcares simples para posterior fermentação, e das bebidas orientais fermentadas de arroz, em que a quebra do amido é proporcionada pela ação de fungos, as “cervejas” insalivadas usam enzimas salivares no processo de sacarificação (Fernandes, 2004).

Segundo Vidal (1999), o *caxiri*<sup>1</sup> está intimamente relacionado à mandioca e ao *tipiti*<sup>2</sup>, artefato que sempre acompanha o pote de cerâmica no qual se fermenta a bebida, e é indispensável em qualquer negociação com os espíritos do outro mundo e para agradar e festejar os *karuãnas*<sup>3</sup>, os seres do fundo, que são chamados para as sessões de cura e convidados para os festejos do *turé*<sup>4</sup>. Tanto é assim, que Deus não poderia deixar de reconhecer a relação insubstituível entre índio e *caxiri* e, dessa forma, os teria criado juntos e, ao mesmo tempo, indissociáveis para assegurar a vida, a sociabilidade e a reprodução dos índios.

Fernandes (2004) descreveu a produção do *caxiri* da seguinte forma: as raízes da mandioca eram fervidas por um tempo prolongado em grandes recipientes. Posteriormente, a massa formada era transferida para outros potes e, quando esfriada, era mastigada pelas índias e cuspidas em outra vasilha. Esse procedimento, no entanto, foi inibido com a chegada dos brancos europeus, que repudiavam essa conduta. A massa mastigada voltava para os grandes potes, que eram completados com água e, depois de bem misturados, novamente aquecidos. Colocava-se, a seguir, a massa reaquecida, em vasilhas especiais, decoradas com figuras místicas e desenhos geométricos, de inspiração artística, enterradas até a metade, e tampava-se até que a bebida fermentasse (Orico, 1972). O líquido

---

<sup>1</sup> No pensamento Juruna, a fermentação associa-se à morte como forma de apodrecimento do corpo. De fato, embriagar-se de cauim, para os Juruna, é o mesmo que morrer um pouco, depois de ficar alegre. Tempesta (2004).

<sup>2</sup> Do tupi “tipi”, espremer, e “ti”, suco, líquido; espécie de cesto para espremer a massa de mandioca.

<sup>3</sup> Fundo é como os karipunas chamam o mundo invisível, assim como o fundo das águas, o fundo da terra, o que há sob o sol, o habitat dos karuãnas.

<sup>4</sup> Entre os arauaques do Oiapoque, Amapá, seres sobrenaturais invisíveis (espíritos) habitantes de rios, lagos, mares, montanhas, com formas de coisas, animais e plantas e vistos como seres humanos apenas pelos pajés, a quem protegem e ajudam no trânsito dos mundos visível e invisível.

forte, denso e nutritivo permanecia no tonel por dois dias para, depois, ser consumido até a embriaguez.

Todavia, desde sua origem ameríndia, a produção de *caxiri* sofreu algumas adaptações para sua inserção nos hábitos de consumo do homem branco, a partir de sua fixação em áreas próximas às reservas indígenas e do contato de militares e estudiosos com as tribos na região amazônica. Assim, da mastigação da massa de mandioca aos processos biotecnológicos modernos, podem ser considerados, pelo menos, dois tipos de processamento da bebida, além de outros, segundo as sucessivas modificações da técnica.

De acordo com Assis (2001), a fabricação do *caxiri* pelos povos amazônicos é bastante semelhante ao atual processo utilizado pelos povos do Alto Rio Negro (Figura 3). A mandioca colhida é lavada, descascada e, a seguir, ralada ou cortada. A massa da mandioca é diluída em água e deixada em cozimento. De acordo com Cereda (2005), o cozimento da massa da mandioca promove a geleificação do amido, o que facilita a ação das enzimas amilolíticas. O cozimento resulta num tipo de caldo grosso, ao qual se adiciona mais água e a mistura é depositada em coxos feitos de troncos de árvore, em grandes panelas de barro ou em potes. Além de se usar a mandioca como base do *caxiri*, pode-se misturar à massa a batata-doce, o cará ou a garapa feita da cana-de-açúcar (Fundação Nacional do Índio - Funai, 2007).

Após o cozimento, a massa de mandioca é mastigada. Tecnicamente, a mastigação tem como principal objetivo o início da digestão. A mistura que ocorre na boca promove a interação entre a massa e a ptialina, responsável por iniciar a hidrólise do amido. Maltose e dextrina são os produtos dessa reação, que provoca ainda a sacarificação, resultante da ação dos ácidos orgânicos sobre os oligossacarídeos (Mahan, 2005). Alternativamente, pode-se juntar à massa o beiju torrado em pedaços, o que provoca a necessária fermentação (Assis, 2001).

A adição do beiju, cujo amido já está geleificado, também favorece a ação das amilases de origem autóctone (Cereda, 2005).

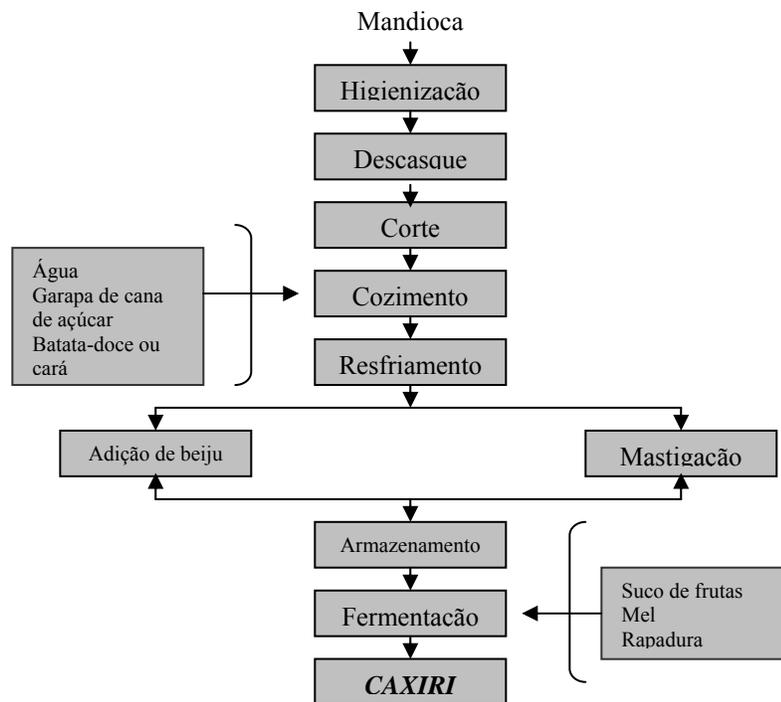


FIGURA 3 Fluxograma da produção tradicional do *caxiri* pelos povos ameríndios com indicação de etapas ou ingredientes alternativos, de acordo com as diferentes tribos da região amazônica, devido à incorporação de cana-de-açúcar (Pinelli et al., 2009).

Outra variação do processo é relatada pela Funai (2007), na descrição dos rituais dos povos do Oiapoque. Na preparação de um ritual, um grupo de mulheres prepara no forno um grande beiju de mandioca ralada e prensada. Isso se chama *pataje kasab* e é colocado com água em um pote grande, adicionando-se açúcar ou mel e, às vezes, um xarope de abacaxi. Antes de ser deixado para descansar e fermentar, as mulheres, ao redor do pote, cantam cantos xamânicos e

colocam, no fundo do pote, emborcada, uma pequena cuia com folhas de abacaxi. Quando a bebida fermenta, a cuia sobe à superfície, significando que ela está pronta para ser consumida.

A produção artesanal do *caxiri*, registrada nas regiões centro-oeste e norte do Brasil tem como ingredientes principais a massa de mandioca cozida e peneirada, a cachaça (aguardente de cana), ou a *tiquira* (aguardente de mandioca) e uma calda feita com açúcar e sucos de frutas ácidas, como o maracujá ou o abacaxi (Figura 4). Usualmente, os próprios índios misturam à bebida fermentada as destiladas, como a *tiquira*, fabricada por eles mesmos, ou outra aguardente, com vistas a aumentar a velocidade da embriaguez (Assis, 2001).

Após a lavagem e a sanitização das raízes, a mandioca é cortada em pedaços e cozida por dez minutos sob pressão, imersa em água. À água de cozimento pode ser adicionado sal, que atuará como realçador de sabor. A mandioca cozida é amassada e passada em peneira para a remoção das fibras. À massa é misturada calda de maracujá ou abacaxi, obtida por fervura da polpa ou suco das frutas, água, açúcar e bebida destilada (aguardente de cana ou *tiquira*). A calda e a massa de mandioca são misturadas em liquidificador industrial e peneiradas para ser envasada imediatamente em frascos esterilizados (Pinelli et al., 2009).

A adequação do processamento do *caxiri* às operações unitárias industriais é possível por meio da adaptação do fluxograma da produção da *tiquira*, bebida destilada de mandioca. Nesse processo, pode-se obter uma bebida fermentada de mandioca com suco de frutas, com graduação alcoólica em torno de 10°GL. A sacarificação do amido de mandioca, originalmente promovida pela ptialina após mastigação das raízes, agora ocorre por ação de amilases industriais (Pinelli et al., 2009).

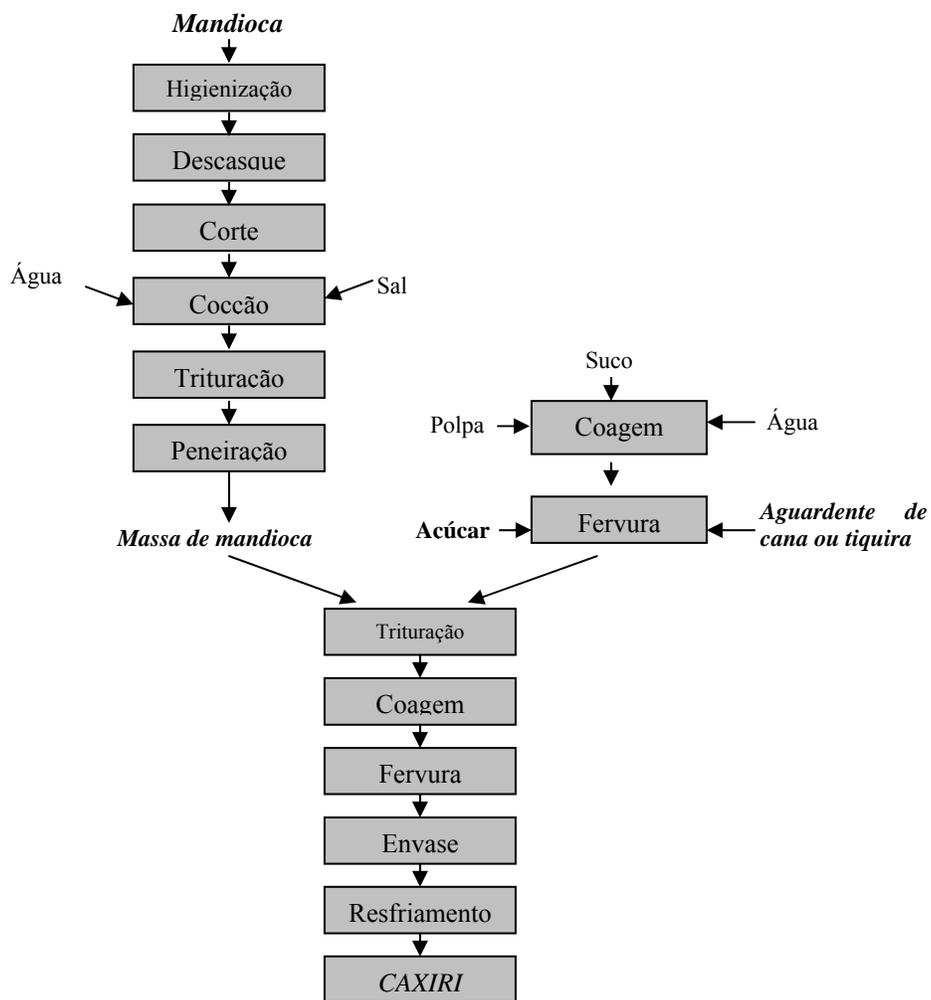


FIGURA 4 Fluxograma da produção do *caxiri* adaptada pelo homem branco (Pinelli et al., 2009).

### 2.5 Alimentos e bebidas fermentados por povos indígenas

Alimentos e bebidas fermentados têm papel fundamental na dieta de diferentes populações indígenas. A fabricação de bebidas fermentadas se iniciou com a própria humanidade e com a criação da vida ritualizada. Os ingredientes,

o modo de preparar e a maneira de tomar variam entre cada grupo étnico. Entre os índios do sul da América, o uso ritual e social das bebidas fermentadas é ligado ao sagrado, ao divertimento e, em certos, casos à política. O rito de beber pode fazer parte da expressão da própria sociedade, de sua manifestação frente ao divino e à consciência coletiva (Langdon, 2006).

Muitas bebidas foram obtidas pelos povos primitivos a partir de sucos de frutas fermentadas, em sua maioria, desenvolvidas de forma acidental, e, a partir dessa descoberta, as técnicas de produção têm sido aperfeiçoadas, buscando-se melhorar a produtividade. Alimentos e bebidas tradicionais ou indígenas são normalmente produzidos por processos naturais, sendo preparados de forma artesanal e empírica, sem conhecimento da presença de microrganismos para desencadear os processos fermentativos (Steinkraus, 1996; Gotcheva et al., 2000).

As bebidas alcoólicas fermentadas são produzidas e consumidas, geralmente, em ocasiões comemorativas, por diferentes povos indígenas. Dependendo da região e da etnia, há variações nas matérias-primas e no tempo de fermentação, porém, em muitos casos, a hidrólise do amido pela incorporação da ptialina salivar, durante a mastigação prévia da matéria-prima, é um procedimento comum (Andrade et al., 2003).

Os mais variados substratos são utilizados pelas sociedades indígenas, destacando-se, principalmente, a mandioca, o milho e o arroz ou, ainda, mel, pinhão, palmito e outros produtos e frutos nativos de cada região (Kimaryo et al., 2000). Pouco se sabe, porém, acerca das características microbiológicas dos processos fermentativos utilizados para a produção desses alimentos e bebidas pelos índios brasileiros, o que torna esses estudos de grande importância para o conhecimento básico desses processos.

Beuchat (1997) relacionou 65 bebidas e alimentos fermentados indígenas, produzidos em diferentes países, principalmente países asiáticos e

africanos. A produção destes alimentos se dá tanto em pequena escala, em casas de produção, como podem ser largamente industrializados, feitos a partir dos mais diversos substratos e microrganismos. No Brasil são produzidos alguns desses alimentos, mas há poucos estudos referentes à sua microbiota, dinâmica populacional e características físico-químicas.

Alguns exemplos de bebidas fermentadas produzidas por comunidades indígenas brasileiras são *tarubá*, *mocororó* ou *makururu*, *tiquira*, *caxiri* ou *caxiry*, *aluá*, *cayssuma*, *pajauarú*, *kiki* e o *cauim*. O modo de preparo varia desde a fermentação natural direta do substrato até um processo que envolve a mastigação prévia do substrato e o posterior regurgito para a fermentação.

O *caxiri* é a bebida feita de bulbos, tubérculos ou frutos da flora amazônica. Desde sua origem ameríndia aos dias atuais, a produção de *caxiri* sofreu diversas adaptações que oscilam da simples mastigação da massa de mandioca aos processos biotecnológicos modernos. O *caxiri* pode ser preparado de várias maneiras, por vários povos, sendo comercializado no estado de Goiás e na capital Federal (Pinelli et al., 2010).

O *tarubá* é feito com uma grande quantidade de beijus de mandioca, postos em água, envoltos em folhas de bananeira. O *mocororó*, ou *makururu*, é uma bebida feita de arroz cozido ou de mandioca, que se deixa fermentar em vasilhames durante tempos que variam de dois a vários dias (Orico, 1972; Azevedo, 2002; IBC, 2006; Londrina, 2006).

O *pajauaru* é feito à base de mandioca e o *cauim*, à base de mandioca, arroz, milho ou frutas, que são mastigados e regurgitados em recipientes nos quais se espera ocorrer a fermentação. Almeida et al. (2007) descrevem a produção de *cauim*, denominada *cauinagem*, nas seguintes etapas: umedecimento do arroz, pubagem (processo de fermentação) da mandioca e trituração. Em seguida, os ingredientes são misturados e cozidos, obtendo-se

assim o *cauim* cozido. Quando frio, adiciona-se o fermento, que é o líquido da batata-doce mastigada por uma mulher indígena.

Praticamente não há dados na literatura brasileira acerca dos microrganismos envolvidos nessas fermentações naturais. Almeida et al. (2007) isolaram e identificaram a microbiota de bactérias presente no *cauim* produzido pelos índios Tapirapé da tribo Tapi'itãwa (Confresa, MT). Dentre os isolados bacterianos houve grande predomínio de bactérias gram-positivas do gênero *Lactobacillus*, mas ocorreram também os gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Paenibacillus*. Schwan et al. (2007) encontraram, em fermentado de arroz e mandioca, a predominância das leveduras *Candida tropicalis*, *Candida intermedia*, *Candida parapsilosis*, *Pichia guilliermondii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Trichosporon asahii*.

Bactérias, leveduras e bolores foram encontrados, por Almeida (1992), no líquido de fermentação da mandioca, observando que os ácidos acético, butírico e láctico predominavam na fermentação, que se inicia a partir de 48 horas e se completa quando a atividade amilolítica é máxima. Segundo o autor, durante a pubagem, a microbiota se altera. Enterobactérias e corinebactérias iniciam o processo e são, aos poucos, substituídas por bactérias lácticas e bactérias esporuladas. Em seguida, os fungos *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium* e *Aspergillus* passam a predominar. Menezes et al. (1998) relataram que, entre as bactérias, diversas linhagens são amilolíticas ou pectinolíticas.

Na Tabela 1 estão listados alimentos e bebidas fermentados feitos a partir de mandioca e a microbiota presente. Esses alimentos e bebidas são, em sua maioria, produzidos em países africanos e foram previamente estudados.

TABELA 1 Exemplos de alimentos e bebidas fermentados naturais à base mandioca em diferentes partes do mundo.

<b>Produto</b>	<b>Substratos</b>	<b>Gêneros microbianos encontrados</b>	<b>Utilização</b>	<b>Região</b>	<b>Fonte</b>
<i>Gari</i>	Mandioca	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Weissella, Staphylococcus</i> e <i>Candida</i> .	Farinha	Nigéria e Oeste da África	Oguntoyinbo, 2008; Kostinek et al., 2007; Oguntoyinbo e Dodd, 2010.
<i>Agbelima</i>	Mandioca	<i>Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Bacillus</i> e <i>Corynebacterium</i> .	Massa tipo pão	Gana, Togo, Benin	Amoa- Awua & Feglo, 2005
Polvilho azedo	Mandioca	<i>Bifidobacterium, Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Bacillus, coliformes, Galactomyces, Issatchenkia</i> e <i>Candida</i> .	Produção de alimentos, assim como dos pães de queijo e outros alimentos tradicionais.	Brasil e Colômbia	Ampe et al., 2001; Lacerda et al., 2005.
<i>Cauim</i>	Arroz e mandioca	<i>Lactobacillus, Corynebacterium, Bacillus, Paenibacillus, Candida, Pichia, Saccharomyces, Trichosporon, Kluyveromyces</i> e <i>Rhodospiridium</i> .	Bebida consumida por infantes de até dois anos, crianças e adultos.	Brasil	Almeida et al., 2007; Schwan, 2007, Ramos et al., 2010.
<i>Fufu ou fofoo</i>	Mandioca	<i>Streptococcus, Geotrichum, Corynebacterium, Lactobacillus, Leuconostoc, Candida, Pichia, Saccharomyces</i> e <i>Zygosaccharomyces</i> .	Pasta	Nigéria, Congo	Oyewole, 2001

TABELA 1 Exemplos de alimentos e bebidas fermentados naturais à base mandioca (continuação)

<b>Produto</b>	<b>Substratos</b>	<b>Gêneros microbianos encontrados</b>	<b>Utilização</b>	<b>Região</b>	<b>Fonte</b>
<i>Attiéké ou akyeke</i>	Mandioca	<i>Bacillus, Candida, Zygosacchomyces, Leuconostoc, Lactobacillus, Enterobacter e Klebsiella.</i>	Alimento pronto para ser consumido	Oeste da África, especialmente na Costa do Marfim	Obilie et al., 2003; Coulin et al., 2006
<i>Lafun</i>	Mandioca	<i>Bacillus, Klebsiella, Pantoea, Lactobacillus, Weissella, Saccharomyces, Pichia, Kluyveromyces, Hanseniaspora, Candida e Trichosporon.</i>	Alimento diário	Benin e Nigéria	Padonou et al., 2009
Massa de mandioca ( <i>sour dough</i> )	Mandioca	<i>Lactobacillus, Pediococcus, Weissella, Clostridium, Propionibacterium, Bacillus, Candida e Saccharomyces.</i>	Massa base para preparo de outros alimentos	Brasil	Miambi et al., 2003; Iacumin et al., 2009
<i>Tape ketan</i>	Arroz ou mandioca	<i>Saccharomyces, Hansenula, Rhizopus, Chlamydomucor, Mucor e Endomycopsis.</i>	Suave, base sólida alcoólica	Indonésia	Blandino et al., 2003
<i>Togwa</i>	Mandioca, milho e sorgo	<i>Lactobacillus, Pediococcus, Candida, Issatchenkia e Saccharomyces.</i>	Alimento de desmame ou diluído para uso como refresco	Tanzânia	Mugula et al., 2003
<i>Kivunde</i>	Mandioca	<i>Lactobacillus plantarum, Enterobacteriaceae, Enterococci, bolores e leveduras.</i>	Massa base para preparo de outros alimentos	Tanzânia	Kimaryo, et al., 2000

Além de *Aspergillus niger* e *Neurospora sitophila*, Venturini Filho & Mendes (2003) relataram a presença também de *Aspergillus oryzae* na composição da microbiota predominante em beijos. São características desse fungo a alta atividade amilolítica, a capacidade de multiplicação submerso em água e a não produção de aflatoxinas ou substâncias potencialmente carcinogênicas (Tung et al., 2004).

Os dados da Tabela 1 mostram que há uma expressiva população de bactérias e leveduras associadas ao processo de produção destes alimentos fermentados, podendo representar uma fonte potencial para estudos da biodiversidade das comunidades de microrganismos envolvidas em processos fermentativos naturais. A inexistência de dados na literatura torna essa uma emergente linha de pesquisa em microbiologia de fermentações naturais.

## **2.6 Biologia molecular para a avaliação de comunidades microbianas**

O estudo da biodiversidade microbiana associada a diferentes substratos envolve o isolamento, a quantificação e a identificação dos isolados, de forma a se avaliar, quantitativa e qualitativamente, essas comunidades, sendo de fundamental importância para o conhecimento e registro das espécies. A correta identificação de espécies que compõem dada comunidade é importante para o seu conhecimento (Valente et al., 1999).

Com a constante investigação de novos habitats e substratos e o consequente aparecimento de espécies distintas, é cada vez maior a necessidade de aprimoramento das técnicas de identificação. O problema prático da definição de espécies está no seu reconhecimento que é, muitas vezes, conseguido depois da observação fenotípica e da comparação com organismos padrões, o que pode levar a uma identificação equivocada, sendo necessárias maneiras mais precisas de reconhecimento. A taxonomia convencional baseada em características morfológicas e fisiológicas é incompleta e pode levar a erros (Valente et al.,

1999). Além de serem laboriosos, muitas vezes, os resultados são ambíguos, devido a variações que ocorrem dentro de uma espécie e a similaridades metabólicas entre espécies diferentes (Kurtzman, 1998; Kurtzman & Robnett, 1998; Kurtzman & Fell, 1998).

Com o advento da biologia molecular e sua utilização como ferramenta da taxonomia, tem-se a oportunidade de determinar a segurança desses métodos padrões para a resolução de gêneros e espécies (Kurtzman, 1998). Apesar de suas limitações filogenéticas, a taxonomia convencional é essencial ao reconhecimento e à descrição das espécies e para comparações com as espécies já existentes. Assim, taxonomia convencional e a molecular não precisam ser exclusivas, mas devem complementar uma a outra, num processo chamado taxonomia polifásica (Valente et al., 1999).

### **2.6.1 Estudo da diversidade microbiana por meio da análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA)**

Atualmente, para estudo da diversidade microbiana, várias técnicas moleculares têm sido empregadas para auxiliar na identificação de microrganismos com maior rapidez e segurança. A técnica conhecida como ARDRA, do inglês *amplified ribosomal DNA restriction analysis*, explora o uso de oligonucleotídeos iniciadores universais para amplificar as sequências do rDNA de microrganismos, seguida pela digestão com enzimas de corte frequente para determinar a diversidade e para identificar/classificar os isolados até gênero e, algumas vezes, até a espécie. ARDRA utiliza as características do RNA ribossômico e tem como base padrões de restrição enzimática, valendo-se de enzimas selecionadas com base na sua habilidade de revelar polimorfismo nos fragmentos de DNA analisados e no grau de conservação dos sítios de restrição do rRNA que reflete padrões filogenéticos (Reis Júnior et al., 2004).

O valor desse método está na sua rapidez e na habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, efetuando análises em vários níveis de classificação, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (Jorgensen & Cluster, 1989).

É recomendado cuidado na escolha do fragmento de rDNA a ser amplificado e analisado por esse método. No caso da análise da microdiversidade em procariotos, que apresenta grupos de indivíduos com elevada afinidade genética, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S rDNA. Essa região intergênica apresenta maior variabilidade, não só na sua composição de bases, como também no seu tamanho, ao ser comparada às regiões gênicas 16S ou 23S. Quando o estudo em questão tratar da diversidade entre isolados distantes filogeneticamente, os fragmentos amplificados podem ser o 16S ou 23S rDNA. Esses genes geram padrões de bandeamentos mais simples, dependendo das enzimas de restrição utilizadas (Rosado et al., 1999.)

A unidade de DNA ribossomal (rDNA) nuclear em eucariotos consiste de uma série repetitiva (tandem) de três regiões gênicas (18S, 5.8S e 28S) e duas regiões espaçadoras intergênicas (ITS e IGS). Recentemente, a análise dessas regiões espaçadoras do rDNA e estudos comparativos de sequências de nucleotídeos de genes do rDNA, por meio da técnica ARDRA, têm sido utilizados. Entre os vários pares de *primers* existentes para a identificação de leveduras no nível de espécie, destaca-se o ITS1–ITS4 (Clemente-Jimenez et al., 2004; Deak et al., 2000; Esteve-Zarzoso et al., 1999; Pina et al., 2005; Sipiczki, 2004; Liberal et al., 2005; Bockhelmann et al., 2008).

A técnica ARDRA vem sendo empregada em diversos trabalhos com diferentes propósitos, como para determinar alterações nas estruturas de comunidades de bactérias de solos contaminados com cobre (Smit, 1997) e para análise de bibliotecas de clones de rDNA para a estimativa da diversidade. Além

disso, essa técnica tem sido empregada na caracterização de isolados de microrganismos, já que cada espécie apresenta um padrão de restrição típico. Jeyaram et al. (2008) utilizaram ARDRA no intuito de agrupar filogeneticamente isolados bacterianos obtidos a partir de um alimento fermentado tradicional da Índia e Bockelmann et al. (2008) também utilizaram essa técnica para classificar espécies de leveduras do setor de laticínios. ARDRA também foi utilizada para caracterizar espécies de leveduras não *Saccharomyces* originárias de vinho, no intuito de construir um protocolo de rápida identificação dessas espécies durante o processo fermentativo (Capece et al., 2003).

### **2.6.2 Avaliação de comunidades microbianas por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)**

Técnicas de biologia molecular são frequentemente utilizadas para explorar diversidade e estrutura das comunidades microbianas, e microrganismos são identificados utilizando-se determinados marcadores moleculares, como o rDNA 16S e o 26S. Em particular, o estudo da ecologia microbiana foi beneficiado grandemente a partir da introdução da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), que forneceu uma técnica molecular de *fingerprinting* para o estudo da estrutura da comunidade (Yeates et al., 1998).

Na técnica de DGGE, fragmentos de DNA de mesmo tamanho e sequências nucleotídicas diferentes podem ser separados em géis de poliacrilamida por agentes desnaturantes, como ureia e formamida. Essa separação se baseia no princípio físico de que a mobilidade eletroforética do DNA em um gel de poliacrilamida é sensível à estrutura secundária da molécula, com respeito à sua conformação (helicoidal, parcialmente desnaturada, e em fita simples). As bandas do DNA podem ser visualizadas após coloração com brometo de etídio, com o corante SYBR Green I ou pela prata (Rosado et al., 1997).

A extração e a purificação do DNA total das amostras ambientais são etapas importantes no DGGE. A quantidade e a qualidade do DNA são essenciais para a amplificação bem sucedida. Assim, a aplicação de um protocolo apropriado da extração do DNA é crucial (Miambi et al., 2003).

Nos últimos anos, esta técnica vem sendo empregada para conhecer os microrganismos em diferentes comunidades, bem como para monitorar a dinâmica da população em uma comunidade. Esse método foi utilizado também para investigar a diversidade do fermento nos alimentos e bebidas, tais como vinho (Cocolin et al., 2000), salsichas (Rantsiou et al., 2005), fermento de panificação (Meroth et al., 2003), café (Masoud et al., 2004), cacau (Nielsen et al., 2007), massa de mandioca fermentada (Miambi et al., 2003), *gari* (Oguntoyinbo & Dodd, 2010), *cauim* de amendoim e arroz (Ramos et al., 2010).

Miambi et al. (2003), utilizando a técnica de DGGE para avaliar a comunidade bacteriana presente durante a fermentação de mandioca, verificaram a ocorrência de 10 diferentes bandas, porém, após o sequenciamento das mesmas através do rDNA 16S, mostrou a ocorrência de 5 diferentes espécies (*Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii*, *Bacillus cereus* e *Clostridium acetobutylicum*).

Oguntoyinbo & Dodd (2010), analisando a fermentação da massa de mandioca para a produção de *gari*, utilizaram a técnica de DGGE para entender a dinâmica populacional dos diferentes grupos de bactérias, utilizando a região V3 do 16S rDNA. Eles encontraram 6 bandas, as quais foram sequenciadas e essa técnica foi capaz de diferenciar espécies muito próximas de *Lactobacillus plantarum*, *L. fermentum* e *L. pentosus*, além de *L. acidophilus* e *L. casei*. Dentre essas bandas, somente uma não pode ser identificada.

O desenvolvimento das ferramentas da biologia molecular contribuiu não só para a detecção e a quantificação, como também para a identificação das comunidades microbianas. Clonagem e sequenciamento de fragmentos dos

genes rDNA 16S e 26S fornecem informações sobre a filogenia dos microrganismos. Combinando-se técnicas de DGGE e sequenciamento têm-se ferramentas apropriadas à análise das mudanças das populações microbianas durante o processo de fermentação.

Portanto, neste trabalho foi utilizada a técnica de DGGE para caracterizar a microbiota presente no *caxiri*, uma vez que ela permite avaliar a diversidade microbiana presente nos mais variados substratos, bem como detectar a presença de determinados grupos de microrganismos, que são indetectáveis por técnicas convencionais, devido ao fato de os mesmos não serem cultiváveis ou por estarem presentes em um número muito pequeno nas amostras. O sequenciamento das regiões rDNA 16S-23S para bactérias e ITS para leveduras representativas foi realizado, a fim de se confirmar a identificação das espécies pelo método convencional (dependente de cultivo) dos microrganismos.

### 3 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.

ALMEIDA, P. F. de. **Processamento e caracterização da puba**. 1992. 115p. Tese (Doutorado em Ciências do Alimento) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

AMOA-AWUA, W. K.; FEGLO, M. O. P. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 6/7, p. 1201-1207, Oct. 2005.

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

ANDRADE, J. S.; PANTOJA, L.; MAEDA, R. N. Melhoria do rendimento e do processo de obtenção da bebida alcoólica de pupunha (*Bactris gasipae* Kunth). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 34-38, dez. 2003. Suplemento.

ASSIS, L. P. S. **Do caxiri à cachaça: mudanças nos hábitos de beber do povo Daw no Alto Rio Negro**. 2001. 86 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Plena em Filosofia) - Universidade Federal do Amazonas, São Gabriel da Cachoeira.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE COLETIVA. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: <<http://www.abrasco.org.br>>. Acesso em: 5 fev. 2010.

AZEVEDO, L. Çairé (PA): espaço e reinterpretação pela mídia. In: CONGRESSO ANUAL EM CIÊNCIA DA COMUNICAÇÃO, 25., 2002, Salvador. **Anais Eletrônicos...** Salvador: Intercom, 2002. Disponível em: <[http://reposcom.portcom.intercom.org.br/bitstream/1904/19121/1/2002\\_NP17AZEVEDO.pdf](http://reposcom.portcom.intercom.org.br/bitstream/1904/19121/1/2002_NP17AZEVEDO.pdf)>. Acesso em: 6 jul. 2008.

BEUCHAT, L. R. Traditional fermented foods. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J. **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, 1997. cap. 34, p. 629-648.

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.

BOCKELMANN, W.; HELLER, M.; HELLE, K. J. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 10/11, p. 1066-1071, Oct./Nov. 2008.

BRASIL. Decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei 8.918, de 14 de Julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 5 jun. 2009.

CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 33-39, July 2003.

CAPLICE, E.; FITZGERLD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, n.1/2, p. 131-149, Sept. 1999.

CEREDA, M. P. Tiquira e outras bebidas de mandioca. In: VENTURINI FILHO, W. **Tecnologia de bebidas**. São Paulo: Blucher, 2005. cap. 21, p. 525-550.

CLEMENTE-JIMENEZ, J.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, S.; HERAS-VAZQUEZ, F.; RODRIGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 2, p. 149-155, Apr. 2004.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 131-136, Feb. 2006.

CUNNINGHAM, P. **Projeto Xingu**: no coração do Brasil. 2007. Disponível em: <[http://www.bbc.co.uk/portuguese/forum/story/2007/05/printable/070525\\_projetoxingu8.shtml](http://www.bbc.co.uk/portuguese/forum/story/2007/05/printable/070525_projetoxingu8.shtml)>. Acesso em: 15 jun. 2007.

DEAK, T.; CHEN, J.; BEUCHAT, L. R. Molecular characterization of *yarrowia lipolytica* and *candida zeylanoides* isolated from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4340-4344, Oct. 2000.

ERCOLINI, D.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3540-3548, June 2003.

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 Systematic Bacteriology**, Ames, v. 49, 329-337, Jan. 1999.

FERNANDES, J. A. **Selvagens bebedeiras**: álcool, embriaguez e contatos culturais no Brasil colonial. 2004. 392 p. Tese (Doutorado em História) - Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

FOX, P. F. Cheese: an overview. In: Fox, P. F. (Ed.). **Cheese**: chemistry, physics and microbiology. 2. ed. London: Chapman and Hall, 1993. v. 1, p. 1-36.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Quantitativo de pessoa**. Brasília, 2010. Disponível em:<[http://sis.funasa.gov.br/transparencia\\_publica/siasiweb/Layout/quantitativo\\_de\\_pessoas\\_2009.asp](http://sis.funasa.gov.br/transparencia_publica/siasiweb/Layout/quantitativo_de_pessoas_2009.asp)>.\_ Acesso em: 12 de Janeiro de 2010.

FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO. **Povos indígenas**. Brasília, 2010. Disponível em: <<http://www.funai.gov.br/>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

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

IACUMIN, L.; CECCHINI, F.; MANZANO, M.; OSUALDINI, M.; BOSCOLO, D.; ORLIC, S.; COMI, G. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 2, p. 128-135, Apr. 2009.

INSTITUTO DEL BIEN COMUN. **A evolução do uso dos recursos naturais na região de Tefé**. Lima, 2006. Disponível em: <<http://www.ibcperu.org/doc/public/src/00077.pdf>>. Acesso em: 4 ago. 2008.

INSTITUTO SOCIOAMBIENTAL. **Enciclopédia dos povos indígenas**. São Paulo, 2007. Disponível em: <<http://pib.socioambiental.org/pt>>. Acesso em: 12 Jan. 2010.

JEYARAM, K.; SINGH, W. M.; PREMARANI, T.; DEVII, A. R.; CHANU, K. S.; TALUKDAR, N. C.; SINGH, M. R. Molecular identification of dominant microflora associated with ‘Hawaijar’: a traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.) food of Manipur, India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 259-268, Mar. 2008.

JORGENSEN, R. A.; CLUSTER, P. D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 75, p. 1238-1247, 1989.

KIMARYO, V. M.; MASSAWE, G. A.; OLASUPO, N. A.; HOLZAPFEL, W. H. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of ‘kivunde’, a traditional Tanzanian food product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 2/3, p. 179-190, June 2000.

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

KURTZMAN, C. P. Yeast systematic: from phenotype to genotype. **Food technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 36, n. 4, p. 261-6, Oct./Dec. 1998.

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

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, n. 4, p. 331-71, May 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, n. 2, p. 213- 219, Nov. 2005.

LANGDON, E. J. O que beber, como beber e quando beber: o contexto sociocultural do alcoolismo entre as populações indígenas. In: SEMINÁRIO SOBRE ALCOOLISMO/ST/AIDS ENTRE OS POVOS INDÍGENAS, 2001, Brasília. **Anais...** Brasília: Ministério da Saúde, 2001. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/alcool\\_indios/art6.htm](http://www.aids.gov.br/alcool_indios/art6.htm)>. Acesso em: 13 dez. 2009.

LIBERAL, A. T. S.; SILVA FILHO, E.; MORAIS, J.; SIMOES, D.; MORAIS JUNIOR, M. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 19-23, Jan. 2005.

LIMA, T. S. **Um peixe olhou para mim: o povo Yudjá e a perspectiva**. São Paulo: UNESP/ ISA; Rio de Janeiro: NUTI, 2005.399 p.

LONDRINA. Prefeitura de Londrina. **Kaingang: pesquisa e intervenção sobre o uso de bebidas alcoólicas**. Londrina, 2006. Disponível em:<<http://inovando.fgvsp.br /conteudo/publicacoes/publicacao/indigena/Kaingang.pdf>>. Acesso em: 10 jul. 2008.

MAHAN, K.; STUMP, S. E. **Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia**. 11. ed. São Paulo: Roca, 2005. 1242 p.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, Davis, v. 21, n. 7, p. 549-556, May 2004.

MENEZES, T. J. B.; SARMENTO, S. B. S.; DAIUTO, E. R. Influence of macerating enzymes in the production of "Puba". **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 4, p. 380-396, 1998.

MEROTH, C. B.; HAMMES, W. P.; HERTEL, C. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 12, p. 7453-7461, Dec. 2003.

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. 111-120, June 2003.

MUGULA, J. K.; NNKO, S. A. M.; NARVHUS, J. A.; SORHAUG, T. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 187- 199, Feb. 2003.

MUSEU DO ÍNDIO. **Apresentação**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <[http://www.museudoindio.org.br/template\\_01/default.asp?ID\\_S=45](http://www.museudoindio.org.br/template_01/default.asp?ID_S=45)>. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electroforesis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 1, p. 695-700, Jan. 1993.

NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 168-186, Mar. 2007.

OBILIE, E. M.; TANO-DEBRAHA, K.; AMOA-AWUA, W. K. Microbial modification of the texture of grated cassava during fermentation into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 275-280, Dec. 2003.

OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 5, p. 465-469, May 2008.

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

ORICO, O. **Cozinha amazônica**: uma autobiografia do paladar. Belém: Universidade Federal do Pará, 1972. Disponível em: <<http://jangadabrasil.com.br/abril44/cp44040a.htm>>. Acesso em: 6 jul. 2008.

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, S. W.; NIELSEN, D. S.; HOUNHOUIGAN, J. D.; THORSEN, L.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1/2, p. 22-30, July 2009.

PINA, C.; TEIXEIRO, P.; LEITE, P.; VILLA, M.; BELLOCH, C.; BRITO, L. PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 5, p. 1107-1114, May 2005.

PINELLI, L. L. O.; GINANI, V. C.; XAVIER, R. N. Caxiri. In: VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo: E. Blucher, 2009. v. 1, p. 1-13.

RAMOS, C. L.; ALMEIDA, E. G.; PEREIRA, G. V. M.; CARDOSO, P. G.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. S. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 2010. No prelo.

RANTSIOU, K.; URSO, R.; IACUMIN, L.; CANTONI, C.; CATTANEO, P.; COMI, G.; COCOLIN, L. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1977-1986, Apr. 2005.

REIS JÚNIOR, F. B. dos.; TEIXEIRA, K. R. dos S.; REIS, V. M. **Análises de restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudos de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolado de diferentes espécies de *brachiaria***. Brasília: Embrapa Cerrados, 2004. 41 p.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 135-147, jul./set. 1997.

ROSADO, A. S.; DUARTE, G. F.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. A moderna microbiologia do solo: aplicação de técnicas de biologia molecular. In: SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; FRUTINI-NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 1999. p. 429-448.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice cassava fermentations produced by the indigenous Tapirape people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, n. 11, p. 966-972, Dec. 2007.

SIPICZKI, M. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, n. 6, p. 471-479, Dec. 2004.

SMIT, M. T. *Hanseniaspora zikes*. In: LODDER, J. (Ed.). **The yeasts: a taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science, 1997. p. 214-220.

STEINKRAUS, K. H. Introduction to indigenous fermented foods. In: \_\_\_\_\_. **Handbook of indigenous fermented foods**. 2. ed. New York: M. Dekker, 1996. p. 1-5.

TEMPESTA, G. A. **A produção continuada dos corpos: práticas de resguardo entre os Wapichana e os Macuxi em Roraima**. 2004. 146p. Dissertação (Mestrado em Etnologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

TUNG, T. Q.; MIYATA, N.; IWAHORI, K. Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch wastewater with high content of suspended starch. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 97, n. 5, p. 329 - 335, 2004.

VALENTE, P.; RAMOS, J. P.; LEONCINI, O. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 45, n. 11, p. 949-58, Nov. 1999.

VENTURINI FILHO, W. G.; MENDES, B. P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: FRANCO, C. M. F.; DAIUTO, E. R.; DEMIATE, I. M.; CARVALHO, L. J. C. B.; LEONEL, M.; CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F.; SARMENTO, S. B. S. **Tecnologias, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas latino americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003. v. 3, p. 530-575.

VIDAL, L. B. "O modelo e a marca ou o estilo dos misturados". **Revista de Antropologia**, São Paulo, v. 42, n. 1/2, p. 29-45, jan./dez. 1999.

YEATES, C.; GILLINGS, M. R.; DAVISON, A. D.; ALTAVILLA, N.; VEAL, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological Procedures Online**, Bethesda, v. 1, p. 40-47, May 1998.

## **CAPÍTULO 2**

### **CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA E MUDANÇAS FÍSICO- QUÍMICAS DA BEBIDA FERMENTADA CAXIRI, PRODUZIDA PELO POVO JURUNA (YUDJÁ), MATO GROSSO, BRASIL.**

(O Capítulo 2 será transcrito para revista “Food Microbiology”)

## 1 RESUMO

O *caxiri* é uma tradicional bebida alcoólica fermentada indígena, produzida pelo povo Juruna ou Yudjá. É preparada à base de mandioca com uma porção de batata-doce. Este trabalho foi realizado com o principal objetivo de isolar e identificar bactérias e leveduras durante a fermentação do *caxiri*. A população bacteriana variou de 3,05 a 5,33 log UFC/mL, enquanto a de leveduras variou de 3,27 a 7,34 log UFC/mL, dominando o processo fermentativo a partir de 48 horas. De acordo com os resultados de testes bioquímicos e perfis do ARDRA, os isolados microbianos foram agrupados e identificados por sequenciamento da região 16S-23S rDNA (bactérias) e ITS1-5.8S rDNA (leveduras). Entre as 343 bactérias isoladas, *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. thurigiensis*, *Sphingomonas* sp. e *Pediococcus acidilactici* foram predominantes. A levedura dominante foi *Saccharomyces cerevisiae*, mas os gêneros *Rhodotorula*, *Pichia* e *Cryptococcus* também foram encontrados. Pelas análises de PCR-DGGE foi possível observar que os microrganismos presentes na fermentação eram provenientes provavelmente do inóculo, do ambiente e de utensílios utilizados na preparação da bebida. Foi observada uma progressiva acidificação, com redução do pH de 4,76 para 3,15. O etanol foi o mais importante metabólito da fermentação, com concentração ao final do processo fermentativo de 83,9 g.L<sup>-1</sup> da bebida. O ácido láctico também foi produzido, atingindo 27,89 g L<sup>-1</sup> ao final do processo. O teor médio de amido encontrado na bebida reduziu gradativamente, variando de 11,3% até 6,8%, no final da fermentação.

Palavras-chave: *Caxiri*, microbiota, mandioca, ARDRA, PCR-DGGE.

## 2 ABSTRACT

*Caxiri* is a traditional alcoholic fermented beverage produced by Juruna or Yudjá people in Brazil. This beverage was prepared with cassava and a small amount of sweet potato, which was used as inoculum. The fermentation was accomplished and samples were collected for chemical and microbiological analysis. The bacterial population found ranged from 3.05 to 5.33 log CFU/ml, while yeast ranged from 3.27 to 7.34 log CFU/ml, dominating the fermentation process after 48 hours. According to the biochemical tests results and ARDRA profiles, the microbial isolated were grouped in order to do the identification of the species by the sequencing of the region 16S-23S rDNA (bacteria) and ITS1-5.8S rDNA (yeast). 343 bacteria were isolated, and *Bacillus pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thurigiensis*, *Sphingomonas* sp. and *Pediococcus acidilactici*, dominated all isolates among bacteria. The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* were the dominant species, but were also found representatives of *Rhodotorula*, *Pichia* and *Cryptococcus*. There were no filamentous fungi in the samples. According to the PCR-DGGE analysis was possible to note that microbial communities present during fermentation had probably came from the inoculum, the ambient or the utensils used during the beverage preparation. It was possible to observe a progressive acidification of the material and the pH decreased from 4.76 to 3.15. Ethanol was the most important fermentation metabolite, presenting at the end of fermentative process, a concentration of 83.9 g.L<sup>-1</sup> of the beverage. Lactic acid was also produced during fermentation, reaching 27.89 g L<sup>-1</sup> at the end of the process. The starch content found in *caxiri* decreased slowly, ranging from 11.3 until 6,8% at the end of fermentation.

Keywords: *Caxiri*, microbiota, cassava, ARDRA, PCR-DGGE.

### 3 INTRODUÇÃO

A mandioca é um dos substratos mais utilizados para o preparo de alimentos e bebidas fermentados. Alguns exemplos são *gari*, *agbelima*, polvilho azedo, *cauim*, *fufu*, *attiéké*, *lafun*, *sourdough*, *tape ketan*, *togwa* e *kivunde*. Em países da África, da Ásia e, mais recentemente, da América do Sul, muitos desses produtos já foram estudados e tiveram sua microbiota descrita. Estes trabalhos mostraram que, além de *Bacillus* spp., bactérias do ácido láctico dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Weissella* e leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia* foram dominantes nos diversos processos (Oguntoyinbo, 2008; Amoa-Awua & Feglo, 2005; Lacerda et al., 2005; Almeida et al., 2007; Oyewole, 2001; Coulin et al., 2006; Padonou et al., 2009; Miambi et al., 2003; Mugula et al., 2003; Kimaryo, et al., 2000).

Diferentes povos indígenas, incluindo o povo Yudjá ou Juruna, produzem e consomem bebidas alcoólicas fermentadas. O *caxiri* é uma bebida alcoólica fermentada à base de mandioca e de batata-doce, feita para ser consumida ritualmente, durante as festas indígenas, em mutirões ou trabalhos coletivos, como na derrubada ou no plantio das roças (Lima, 2005).

No método tradicional de preparo do *caxiri*, raízes de mandioca brava *Manihot esculenta* Crantz são armazenadas em sacos e deixadas para fermentar em água corrente, por 48 horas. A fermentação natural de raízes de mandioca, denominada pubagem, é uma etapa fundamental no preparo de diversos alimentos e bebidas fermentados de origem africana e brasileira, como o *fufu*, o *gari*, o *cauim* e a *puba* ou *carimã*. O processo foi descrito por Albuquerque (1969) e Gramacho (1975). Durante a fermentação, além da degradação de compostos cianogênicos e formação de substâncias aromáticas, ocorre o amolecimento das raízes, que é indispensável para a obtenção de produto de boa qualidade.

Após a pubagem as raízes são descascadas e prensadas, para retirar-se o excesso de água. A massa é peneirada e torrada. Essa etapa é de suma importância, pois é responsável pela desintoxicação das raízes, que são ricas em compostos cianogênicos. Após esse procedimento, adiciona-se água e batatas-doces são utilizadas como inóculo, sendo raladas e colocadas dentro dos tambores. A mistura é homogeneizada, tampada e deixada a fermentar por 48 horas, até a bebida estar pronta para o consumo.

Para a produção da bebida, a fermentação ocorre por microrganismos naturalmente presentes nas matérias-primas utilizadas. As interações microbianas não são conhecidas e nem controladas durante o processo fermentativo, o que causa variações na qualidade e na estabilidade do produto final. Almeida et al. (2007) isolaram bactérias de fermentações de mandioca e arroz e reportaram que as espécies *Lactobacillus pentosus* e *L. plantarum* foram as bactérias dominantes. Schwan et al. (2007) investigaram a ocorrência e a diversidade de leveduras envolvidas na elaboração de bebida indígena à base de mandioca e arroz produzida no Brasil e reportaram que *Candida tropicalis*, *Pichia guilliermondii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram as leveduras dominantes.

Técnicas moleculares independentes de cultivo provaram ser ferramentas poderosas para a criação de um inventário mais completo da diversidade microbiana em amostras de alimentos (Giraffa & Neviani, 2001). A técnica *amplified ribosomal DNA restriction analysis*, ou ARDRA, foi empregada, no intuito de agrupar filogeneticamente isolados bacterianos obtidos a partir de um alimento fermentado tradicional da Índia (Jeyaram et al., 2008). Bockelmann et al. (2008) também utilizaram essa técnica para classificar espécies de leveduras do setor de laticínios e Capece et al. (2003) caracterizaram leveduras não-*Saccharomyces* originárias de vinho.

O estudo da ecologia microbiana foi beneficiado grandemente a partir da introdução da eletroforese em gel de gradiente desnaturante (PCR-DGGE). Nos últimos anos, esta técnica tem sido aplicada extensamente para estudar a dinâmica microbiana em alimentos e bebidas, tais como vinho (Cocolin et al., 2000), mandioca fermentada (Miambi et al., 2003), *sourdough* (Iacumin et al., 2009), *gari* (Oguntoyinbo & Dodd, 2010), *cauim* de amendoim e arroz (Ramos et al., 2010).

Neste trabalho, foram utilizados métodos bioquímicos, morfológicos, ARDRA, sequenciamento e a análise de PCR-DGGE para caracterizar e identificar a microbiota presente no *caxiri*. Em paralelo, também foi realizada a caracterização físico-química da bebida, durante a fermentação.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

O estudo foi realizado junto à tribo Yudjá, na aldeia Pakaya, localizada na parte norte da terra indígena entre a BR 80 e o Posto Indígena Diauarum. Neste eixo, as terras da margem ocidental do Xingu pertencem ao município de Marcelândia e as da margem oriental, a São José do Xingu, no estado do Mato Grosso, Brasil.

Visitas foram realizadas com o objetivo de fazer o levantamento dos alimentos e bebidas fermentadas produzidos pelo povo Yudjá. Assim, observaram-se o ambiente de preparação, os recipientes utilizados, a fonte de substrato ou matéria-prima, as técnicas de preparo, o tempo de preparação e o consumo.

### 4.2 Preparo da bebida

Os substratos utilizados para a produção de *caxiri* ou *cauim dubia* foram mandioca (*Manihot esculenta* Crantz L.) e batata-doce (*Ipomoea batatas* L.).

Aproximadamente 90 kg de raízes de mandioca brava com casca foram armazenados em sacos de linhagem e deixados para fermentar, submersos em água, por 48 horas. Após a fermentação (pubagem), as raízes foram descascadas e colocadas em uma prensa artesanal de palha, chamada de *tipiti* ou *sucuri*, para retirar o excesso de água. Essa água residual é conhecida como água de puba. A massa de mandioca resultante da prensagem foi peneirada em uma peneira de palha trançada e colocada em um grande tacho de ferro, em fogo de lenha leve, para se realizar a torração. A massa foi revolvida com pás de madeira, até a farinha estar uniformemente torrada. Esse processo é muito importante no preparo da bebida, visto que a torração é uma das etapas de desintoxicação das raízes de mandioca brava. Após esse procedimento, adicionou-se água até a

completa dissolução dos grãos provenientes da massa de mandioca torrada. Aproximadamente 6 kg de batatas-doce, que serviram de inóculo, foram ralados e, então, colocados dentro dos tambores. A mistura foi homogeneizada, tampada e, finalmente, passou por uma fermentação de 120 horas. O processo de produção do *caxiri* pode ser observado na Figura 1. Aproximadamente 180 litros de *caxiri* foram produzidos.

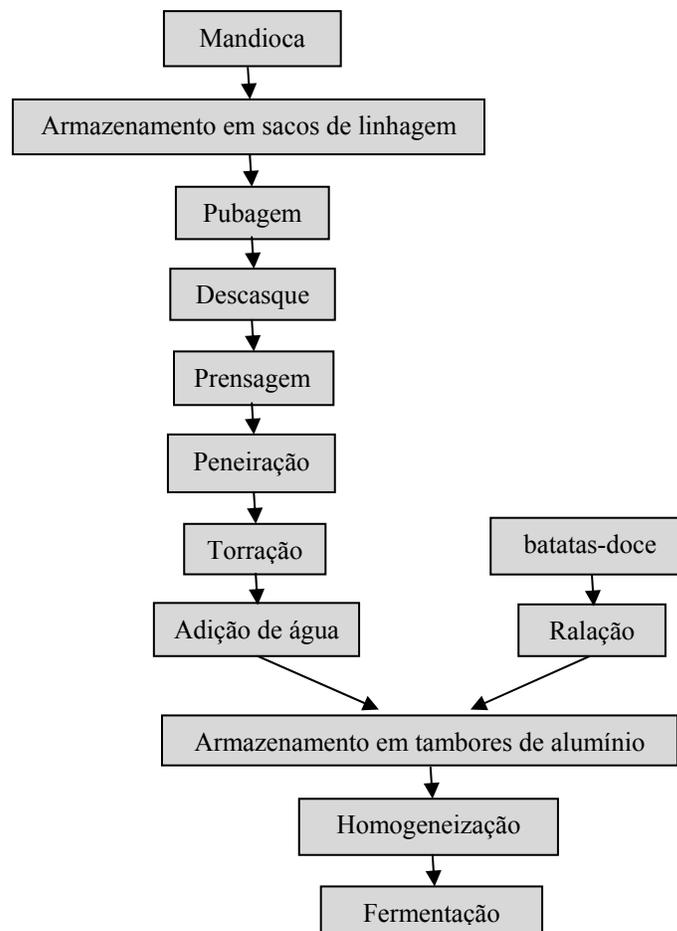


FIGURA 1 Fluxograma geral de produção de *caxiri* ou *cauím dubia*.

### **4.3 Amostragem**

Foram coletadas amostras de *caxiri* a cada 24 horas, ou seja, 0, imediatamente após a adição da batata-doce crua ralada, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de fermentação. Uma amostra foi retirada da água de puba da mandioca, durante a prensagem, para se realizar análises físico-químicas, a fim de se entender as mudanças ocorridas durante o preparo da bebida.

Em cada tempo de fermentação, 20 mL das amostras foram coletados e transferidos para frascos de coleta, contendo 180 mL de água peptonada estéril (0,1% de peptona, 0,5% de NaCl, 0,03%  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ).

Após a coleta, os frascos contendo as amostras foram lacrados, congelados e acondicionados em freezer (-20°C), sendo então transferidos para uma caixa de isopor contendo gelo seco e úmido para serem transportados para o Laboratório de Microbiologia Geral, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras - MG.

Em laboratório, a mistura foi homogeneizada em *Stomacher*, por 60 segundos, em velocidade normal, e diluições decimais utilizando-se água peptonada 0,1% foram preparadas e inoculadas por espalhamento nos diferentes do meio de cultivo. As análises físico-químicas foram realizadas com as amostras homogeneizadas em *Stomacher*, sem emprego de diluições decimais.

### **4.4 Análises microbiológicas**

#### **4.4.1 Enumeração dos microrganismos (bactérias aeróbias mesofílicas, Gram-negativas, bactérias ácido-láticas (BAL), leveduras e fungos filamentosos).**

A enumeração de microrganismos foi realizada utilizando-se sete diferentes meios de cultivo: *Yeast extract peptone glucose* (YEPG) pH 3,5 [1,0% extrato de levedura (Himedia, Mumbai, Índia); 1,0% peptona (Himedia,

Mumbai, Índia); 1,3% ágar (Merck); 2,0% glicose (Merck)] para crescimento de leveduras acrescido de antibiótico cloranfenicol 0,2% (Sigma, St. Louis, USA), De Man Rogosa Sharpe (MRS) pH 6,0 (Merck) para crescimento de bactérias lácticas, *dichloran rose bengal chloramphenicol* (DRBC) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) e ágar extrato de malte (MEA) pH 6,0 [2,0% extrato de malte (Merck); 1,4% ágar (Merck)], para crescimento de fungos filamentosos. Ágar nutriente (AN) [0,3% extrato de carne (Merck); 0,5% peptona bacteriológica (Himedia, Mumbai, Índia); 1,3% ágar (Merck)] contendo 0,1% de nistatina, para contagem total de bactérias aeróbicas mesofílicas e *violet red bile* com glicose VRBG (Merck, Alemanha) meio de cultivo para bactérias gram-negativas e Macconkey agar (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para coliformes. As amostras foram plaqueadas em superfície, com exceção do meio MRS, no qual se utilizou a técnica *pour-plate*, e as placas foram incubadas, a 28°C, por 48 horas, para o crescimento das bactérias e 5 dias para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos. Após a incubação, uma contagem diferenciada, baseada na morfologia das colônias, foi realizada.

#### **4.5 Identificação da microbiota**

##### **4.5.1 Contagem e classificação morfológica das colônias e isolamento dos morfotipos**

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e as estruturas morfológicas, caracterizando-se os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo. (Kurtzman & Fell, 1998; FDA, 1972). A partir da contagem total, foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição, cuja contagem se encontrava entre 30 a 300 colônias. O número de isolados selecionados para identificação foi determinado pelo cálculo da raiz quadrada do

número total de isolados, contados conforme mencionado no *Bacteriological Manual for Foods* (FDA, 1972).

#### **4.5.2 Identificação de bactérias**

Os isolados bacterianos purificados foram transferidos para placas contendo meio AN ou MRS e incubados, a 28°C, por 24-48 horas. Após a incubação, os isolados foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram, a fim de separá-los nos dois grupos (gram-positivos e gram-negativos). Para confirmação do Gram, foi utilizado o método KOH de Gregersen (1978). Os isolados foram analisados, em microscópio óptico, quanto à forma e ao arranjo das células.

Os isolados também foram submetidos a testes de catalase, oxidase e motilidade, de acordo com as recomendações propostas em *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (Holt et al., 1994). As bactérias gram-positivas foram submetidas a tratamento térmico (80°C, por 10 minutos), a fim de se avaliar a capacidade de liberação de esporos. Por meio da observação microscópica de lâminas dos isolados, os mesmos foram separados em bactérias formadoras e não formadoras de esporos.

Os isolados foram agrupados para a realização de testes moleculares, de acordo com os resultados dos testes bioquímicos realizados.

##### **4.5.2.1 Análise dos isolados bacterianos pela técnica ARDRA da região intergênica 16S-23S do rDNA**

A análise dos isolados bacterianos pela técnica ARDRA foi executada conforme descrito por Jeyaram et al. (2008), com algumas modificações. Colônias de bactérias foram retiradas da superfície de meio sólido (AN ou MRS) e o seu DNA foi extraído de acordo com os mesmos autores, com algumas modificações.

Para a amplificação do DNA, foi utilizado um volume final de 25 µl, contendo 2,5µl do tampão Master Mix 10X, 0,1 µl de Taq polimerase 5U.µl<sup>-1</sup>, 0,25µl dNTP 10mM, 0,5µl de cada *primer* Set II 100pmol (Tabela 1) 2 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM e 17,15 µl de água Milli-Q estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) obedeceu ao seguinte programa: desnaturação inicial, a 94°C, por 5 minutos; 30 etapas de desnaturação, a 94°C, por 30 segundos; anelamento dos *primers*, a 58°C, por 1 minuto e extensão da fita de DNA, a 72°C, por 2 minutos; extensão final, a 72°C, por 7 minutos e 4°C, como temperatura de armazenamento. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% (condições de corrida: 70V por 30 minutos).

TABELA 1 *Primers* utilizados nas metodologias moleculares para a identificação da microbiota.

<b>Primer</b>	<b>Região de amplificação</b>	<b>Nome do primer</b>	<b>Sequência do primer</b>	<b>Referência</b>
<b>Set II</b>	espaçador 16S–23S	16SF-R2	5'-CGCGGGATCCTTGTAC ACACCGCCCGTC-3'	Lechner (1998)
	rDNA	23Sr- R10&nbsp;nbsp;	5'-GGCCGTCGACCCTTTC CCTCACGGTACTG-3'	
<b>ITS</b>	região ITS1- 5.8S rDNA-	ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG G-3'	Masoud et al. (2004)
	ITS2	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATAT GC-3'	
<b>16S rRNA</b>	gene 16S rDNA	338F	5'- CGCCCGCCGCGCGGGCG	Ovreas et al. (1997)
	região V3	518r	GCGGGCGGGGCGGGGCA- 3' 5'-ATTACCGCGGCTGCTGG- 3'	
<b>18S rRNA</b>	espaçador 18S rDNA	YM951r NS3	5'- TTGGCAAATGCTTTCGC-3' 5'- GCAAGTCTGGTGCCAGCA GCC-3'	Haruta et al. (2006)

Para a análise de restrição, um volume de 30 µl contendo 3 µl de tampão de incubação (*MultiCore* 10X Promega), 0,5 µl de cada enzima de restrição 5U.µl<sup>-1</sup>, 15 µl do produto do PCR não purificado e 11 µl de água Milli-Q estéril foi incubado, a 37°C, por 2 horas e 30 minutos. As enzimas de restrição Hae III e Hind III (Promega) foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. Para análise dos padrões dos fragmentos de restrição, foi utilizado gel de agarose a 2% (condições de corrida: 90V por 150 minutos). O tamanho molecular dos produtos de digestão foi determinado por meio da utilização do marcador GeneRuler 100bp Plus DNA *Ladder, ready-to-use* (100-3000 bp, Fermentas).

#### **4.5.2.2 Sequenciamento da região intergênica 16S-23S do rDNA para identificação dos isolados bacterianos**

A reação de PCR de 100 µl foi realizada contendo 10 µl do tampão Master Mix 10X, 0,4 µl de Taq polimerase 5U.µl<sup>-1</sup>, 1µl dNTP 10mM, 2 µl de cada *primer* Set II 100pmol (Tabela 1), 4 µl MgCl<sub>2</sub> 50 mM e 72,6 µl de água Milli-Q estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) seguiu o mesmo programa utilizado no item anterior. Os produtos de PCR foram analisados com sequenciador automático de DNA (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) pela Macrogen (Seul, Coreia). As sequências obtidas foram alinhadas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST, do National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### **4.5.3 Identificação de leveduras**

Todos os isolados de leveduras foram inicialmente caracterizados por sua morfologia, formação de esporos, fermentação de glicose, teste de

*Diazonium Blue B* (DBB) e hidrólise de ureia ou uréase, de acordo com Kurtzman & Fell (1998) e Barnett et al. (2000).

Os isolados foram agrupados para a realização de testes moleculares, de acordo com os resultados dos testes realizados.

#### **4.5.3.1 Análise dos isolados leveduriformes pela técnica ARDRA da região intergênica ITS1-5.8S do rDNA**

A análise dos isolados leveduriformes pela técnica ARDRA foi executada conforme descrito por Bockelmann et al. (2008), com algumas modificações. Colônias de leveduras foram retiradas da superfície de meio sólido (YEFG), suspensas em tampão de PCR Master Mix 10X e aquecidas, a 90°C, por 15 minutos, em termociclador.

A suspensão obtida foi utilizada para a reação de PCR. Para amplificação do DNA, foi utilizado um volume de 25 µl, contendo 2,5µl do tampão Master Mix 10X, 0,1 µl de Taq polimerase 5U.µl<sup>-1</sup>, 0,25 µl dNTP 10mM, 0,5µl de cada *primer* ITS 100pmol (Tabela 1) 2,0 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM e 17,15 µl de água Milli-Q estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) obedeceu ao seguinte programa: desnaturação inicial, a 95°C, por 5 minutos; 30 etapas de desnaturação, a 95°C, por 30 segundos, anelamento dos *primers*, a 52°C, por 30 segundos e extensão da fita de DNA, a 72°C, por 1 minuto; extensão final, a 72°C, por 10 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% (condições de corrida: 70 V, por 30 minutos).

Para a análise de restrição, um volume de 30 µl contendo 14 µl de tampão de incubação, 0,5 µl de cada enzima de restrição e 15 µl do produto do PCR não purificado foi incubado, a 37°C, por 4 horas. Enzimas de restrição Hae III e MspI 5U.µl<sup>-1</sup> (Promega ou Fermentas) foram utilizadas, de acordo com instruções do fabricante. Para análise dos padrões de fragmentos de restrição, gel

de agarose a 2% foi utilizado (condições de corrida: 90V, por 150 minutos). O tamanho molecular dos produtos de digestão foi determinado por meio da utilização do marcador GeneRuler 100bp Plus DNA *Ladder, ready-to-use* (100-3000 bp, Fermentas).

#### **4.5.3.2 Sequenciamento da região ITS1-5.8S rDNA para a identificação dos isolados leveduriformes**

A reação de PCR de 100 µl foi realizada contendo 10µl do tampão Master Mix 10X, 0,4 µl de Taq polimerase 5U.µl<sup>-1</sup>, 1 µl dNTP 10 mM, 2µl de cada *primer* ITS 100 pmol (Tabela 1), 4 µl MgCl<sub>2</sub> 25mM e 76,6 µl de água Milli-Q estéril. O termociclador (Mastercycler Gradient, Eppendorf) seguiu o mesmo programa utilizado no item anterior. Os produtos de PCR foram sequenciados pela Macrogen e as sequências obtidas foram alinhadas com o banco de dados do GenBank, utilizando-se o programa BLAST (National Centre for Biotechnology Information, Maryland, USA).

#### **4.6 Avaliação da comunidade microbiana presente nas amostras por PCR-DGGE**

As amostras de *caxiri* coletadas durante a fermentação foram submetidas à análise de DGGE, com a finalidade de se avaliar a diversidade microbiana presente nas mesmas.

##### **4.6.1 Extração do DNA microbiano das amostras**

Alíquotas de 3 mL de cada amostra foram centrifugadas a 17500 x g por 5 minutos, por 3 vezes. Péletes foram ressuspensos em 400 µl de água estéril. Cada amostra foi transferida para tubos plásticos (eppendorfs) e submetida à extração do DNA, utilizando o *NucleoSpin Tissue kit* (Macherey-Nagel, Düren,

Germany). A extração de DNA foi realizada de acordo com instruções do fabricante, com pequenas modificações. O DNA genômico foi ressuspensionado em água Milli-Q estéril e estocado a -20°C.

#### 4.6.2 Amplificação por PCR

O DNA genômico extraído das amostras foi submetido à reação de polimerase em cadeia e verificado em gel de agarose 1%. As reações para amplificação da comunidade bacteriana utilizaram *primers* universais rDNA 16S, seguindo o protocolo estabelecido por Ovreas et al. (1997), como já descrito (Ampe et al., 1999).

A reação de PCR, com volume final de 40 µl, continha: 29,31 µl de água Milli-Q estéril, 4 µl de Tampão Master Mix 10X (Promega), 0,16 µl de dNTP, 1 µl de cada *primer* rDNA 16S (Tabela 1), 0,125 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,4 µl de MgCl<sub>2</sub> e 2 µl de DNA.

O termociclador operou com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C, por 5 minutos; 35 etapas de desnaturação, a 95°C, por 1 minuto; anelamento dos *primers* a 55°C, por 1 minuto e extensão da fita de DNA, a 72°C por 1 minuto; extensão final a 72°C, por 7 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento.

As reações para amplificação da comunidade leveduriforme utilizaram *primers* da região rDNA 18S, seguindo o protocolo estabelecido por Masoud et al. (2004). A reação de PCR continha: 29,4 µl de água Milli-Q estéril, 4 µl de Tampão Master Mix 10X (Promega), 1 µl de dNTP, 1 µl de cada *primer* 18S rRNA (Tabela 1), 0,1 µl de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> e 2 µl de DNA, totalizando 40 µl de volume final da reação.

O termociclador obedeceu ao seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C, por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação, a 95°C, por 60 segundos, anelamento dos *primers* a 55°C, por 60 segundos e a extensão da fita de DNA a

72°C, por 60 segundos; extensão final a 72°C, por 7 minutos e 4°C como temperatura de armazenamento.

#### **4.6.3 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (PCR-DGGE)**

Os produtos da PCR foram analisados por DGGE, utilizando *Bio-Rad* DCode Universal Mutation Detection System (BioRad, Richmond, CA, USA), seguindo os procedimentos já descritos por Muyzer et al. (1993), para a comunidade bacteriana. Os produtos de PCR foram aplicados na quantidade de 20 µl e a eles foram adicionados 20 µl de corante (2% de azul de bromofenol, 2% de xileno cianol, glicerol 100% e água Milli-Q) em gel de poliacrilamida 8% (m/v) em tampão 0,5X TAE com gradiente de desnaturação variando de 20% a 50% (100% correspondeu a 7 M de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada em voltagem constante de 40 V, por 30 minutos e, depois alterada para 60 V, por 15 horas e 30 minutos, à temperatura constante de 60°C. Para a comunidade fúngica, os procedimentos seguidos foram os já descritos por Masoud et al. (2004), com algumas modificações. Para a separação dos fragmentos de PCR, utilizou-se gradiente de desnaturação variando de 30% a 60% (100% correspondeu a 7 M de ureia e 40% (v/v) de formamida). A eletroforese foi realizada à voltagem constante de 130 V, por 4 horas, à temperatura constante de 60°C.

##### **4.6.3.1 Análises estatísticas**

A similaridade entre as diferentes horas de fermentação foi determinada com base na presença ou na ausência de amplicons detectados pelo DGGE. Os géis foram analisados utilizando-se o programa Diversity Database para a determinação da riqueza de amplicons (Sa). O agrupamento hierárquico foi realizado por meio 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.

## **4.7 Caracterização físico-química**

### **4.7.1 Determinação dos açúcares solúveis totais (AST)**

Os açúcares foram extraídos com solução de álcool etílico 70% e determinados, por leitura em espectrofotômetro a 620 nm, pelo método de Antrona (Dische, 1962). Os resultados foram expressos em g/100g de bebida. Para isso, foi determinado o teor de umidade, por meio da desidratação das amostras.

### **4.7.2 Determinação da proteína bruta (PB)**

A proteína bruta (PB) foi calculada em função da concentração de nitrogênio total, pelo método Kjeldahl, que é baseado na decomposição da matéria orgânica por meio da digestão da amostra a 400°C com ácido sulfúrico concentrado, em presença de sulfato de cobre como catalisador que acelera a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é determinado por destilação por arraste de vapor, seguida de titulação com ácido diluído (Brasil, 2003).

### **4.7.3 Determinação do amido**

O amido foi extraído quimicamente com reagente de Fehling, que é composto por uma solução A (sulfato de cobre cristalino em água) e uma solução B (tartarato de sódio e potássio e hidróxido de sódio) em água, sendo dosado espectrofotometricamente segundo o método Somogy-Nelson (Nelson, 1944). A determinação foi feita utilizando-se 620 nm de comprimento de onda e os resultados expressos em %.

#### **4.7.4 Determinação da acidez total titulável (ATT), pH e °Brix**

A acidez titulável foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,01 N, utilizando-se como indicador a fenolftaleína, e o resultado expresso em g de ácido cítrico/100 ml da bebida (Pereira et al., 2001).

O pH foi determinado na bebida, utilizando-se potenciômetro Micronal modelo B474, segundo técnica estabelecida pela AOAC (1992).

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado na bebida por refratometria, conforme normas da AOAC (1992), utilizando-se refratômetro digital ATAGO PR-1000, com compensação de temperatura automática e resultados expressos em °Brix.

#### **4.7.5 Substratos e metabólitos**

Foram analisados álcoois (etanol e glicerol), ácidos orgânicos (ácido acético, ácido lático, ácido málico, ácido succínico, ácido tartárico e ácido cítrico) e carboidratos (glicose e frutose) das amostras de *caxiri* (Schwan et al., 2001; Duarte et al., 2008). Análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, model LC-10Ai) (Shimadzu Corp., Japão), equipado com um sistema de dupla detecção, consistindo de um detector UV e um detector de índice de refração (RID – 10A SPD-10Ai). Uma coluna de exclusão iônica Shimadzu (Shim-pack SCR-101H, 7.9 mm X 30 cm), operada à temperatura de 50°C, foi utilizada para alcançar a separação cromatográfica. Ácidos solúveis em água, açúcares (frutose, glicose e sacarose) e etanol foram eluídos com ácido perclórico 100 mM, à taxa de fluxo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Os ácidos foram detectados por meio de absorvância UV (210 nm) e RID, enquanto concentrações de açúcares e etanol foram detectadas somente via RID. Açúcares, ácidos e etanol foram identificados e suas concentrações foram determinadas por comparação com tempos de retenção, utilizando-se padrões

certificados. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. O coeficiente de variação foi menor que 5%, em cada caso.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Enumeração dos microrganismos e identificação das espécies envolvidas na fermentação do caxiri

Neste trabalho, os microrganismos presente no *caxiri* foram enumerados, caracterizados e identificados por métodos dependentes e independentes de cultivo. Foram isoladas e caracterizadas 343 bactérias e 205 leveduras, totalizando 548 microrganismos obtidos das amostras. Os resultados das contagens são mostrados na Figura 2.

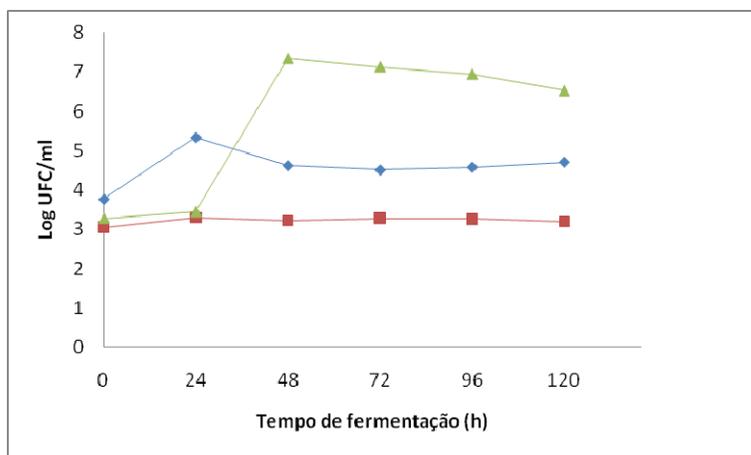


FIGURA 2 Números (logUFC/mL) do total de bactérias mesofílicas (♦), bactérias do ácido láctico (■) e leveduras (▲).

A população total de microrganismos cultiváveis na fermentação de mandioca foi enumerada utilizando-se sete meios de cultivo, porém, só foi detectado crescimento em três desses meios. Nos meios ágar Macconkey e ágar VRBG não houve crescimento, indicando a predominância de bactérias gram-

positivas. Maior frequência de bactérias gram-positivas em fermentações de mandioca, utilizando inóculos espontâneos tradicionais, também foi observada por Oguntoyinbo & Dodd (2010), Padonou et al. (2009), Almeida et al. (2007), Coulin et al. (2006) e Obilie et al. (2003).

O MRS, meio utilizado para a contagem de bactérias do ácido láctico (BAL), não foi especificamente seletivo, pois os resultados mostraram crescimento de diferentes grupos de BAL e também de *Bacillus* sp. Bactérias gram-negativas estiveram presentes no ágar nutriente, mas não cresceram no ágar Macconkey e ágar VRBG, específicos para este grupo de microrganismos. Isso também justifica a limitação dos métodos de cultivo para o entendimento da comunidade microbiana nos alimentos. Problemas associados com meios de cultura na enumeração microbiana de alimentos já foram reportados anteriormente, por outros autores (Miambi et al., 2003 e Oguntoyinbo & Dodd, 2010).

Os meios de cultura utilizados para a enumeração de fungos filamentosos foram o ágar extrato de malte e DRBC (Oxoid). Após espalhamento em superfície das amostras, as placas foram incubadas a 25°C, por até 5 dias. Passado o período de incubação, não foi observado crescimento de colônias, indicando a ausência de fungos filamentosos cultiváveis nas amostras dos diferentes tempos de fermentação do *caxiri*.

A população constituída por bactérias aeróbicas mesófilas foi maior no início da fermentação. Essa população aumentou após a adição do inóculo, sendo predominante até 24 horas do processo fermentativo. A contagem bacteriana no ágar nutriente variou de 3,77 a 4,71 logUFC/ml, alcançando valor máximo no tempo 24 horas de fermentação, com uma população de 5,2 logUFC/ml. Foram isoladas deste meio de cultivo 252 bactérias.

A contagem no meio MRS foi de 3,05 logUFC/ml, no tempo 0 hora de fermentação, logo após a adição da batata-doce crua e ralada, e se manteve

constante até o final da fermentação, quando, a população estimada foi de 3,19 logUFC/ml. A contagem máxima foi observada no tempo 72 horas com 3,28 logUFC/ml. Desse meio de cultura, foram isoladas 91 bactérias.

Leveduras cresceram durante a fermentação, aumentando em número de 3,27 logUFC/ml no tempo 0 a 7,34 logUFC/ml, no tempo de 48 horas, tornando-se os microrganismos predominantes até o final do processo fermentativo, com população de 6,52 logUFC/ml, no tempo 120 horas (Figuras 2). A predominância de leveduras e o teor alcoólico da bebida caracterizam a fermentação do *caxiri*, como uma fermentação alcoólica.

### 5.1.1 Bactérias e leveduras envolvidas na fermentação do caxiri

Os 343 isolados bacterianos foram submetidos a testes de coloração diferencial de Gram, análise microscópica, testes de catalase, oxidase, motilidade e esporulação. De acordo com os resultados desses testes e perfis gerados por ARDRA, os isolados foram agrupados para identificação das espécies por sequenciamento da região 16S-23S rDNA (Tabela 2).

TABELA 2 Agrupamento dos isolados bacterianos de acordo com testes preliminares realizados (Gram, arranjo e forma das células, catalase, oxidase, motilidade e esporulação).

Grupo	Característica do grupo	Nº de isolados
1	Bastonete, Gram + e esporulação +	211
2	Bastonete, Gram +, catalase +, motilidade + e esporulação -	15
3	Bastonete, Gram +, catalase +, motilidade - e esporulação -	23
4	Bastonete, Gram +, catalase -, motilidade + e esporulação -	2
5	Bastonete, Gram +, catalase -, motilidade - e esporulação -	6
6	Bastonete, Gram -, motilidade - e oxidase +	38
7	Bastonete, Gram -, motilidade + e oxidase -	30
8	Cocos, Gram +, catalase -, motilidade - e esporulação -	18
TOTAL		343

A maior parte dos isolados foi caracterizada como bastonete gram-positivo, catalase positivo, apresentando motilidade e capacidade de formar endósporos, pertencendo ao gênero *Bacillus*. A metodologia da amplificação da região 16S-23S rDNA, com posterior análise utilizando enzimas de restrição chamada ARDRA, foi utilizada neste trabalho. Entre as enzimas de restrição testadas, a dupla digestão com Hae III e Hind III foi escolhida por melhor diferenciar os isolados.

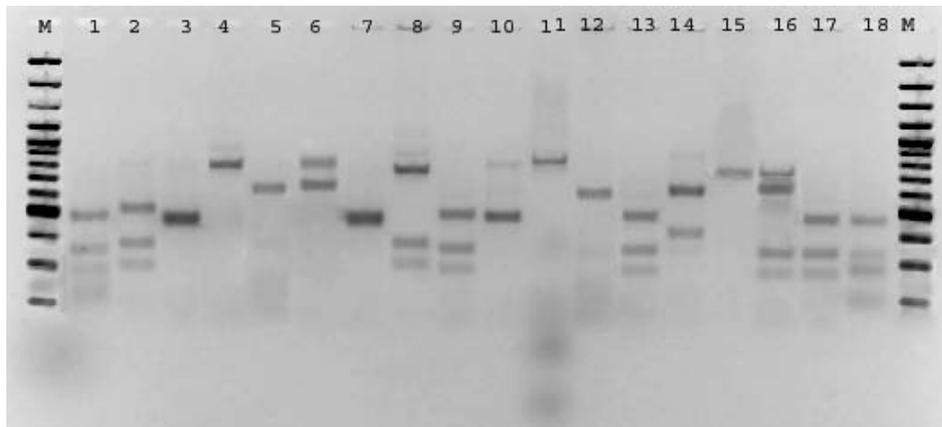


FIGURA 3 Agrupamento por ARDRA das bactérias isoladas do *caxiri* por meio da amplificação da região 16S–23S rDNA, usando dupla digestão com Hae III e Hind III. M- Marcador GeneRuller 100pb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), com fragmentos de 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 pb. Perfil A (1, 17 e 18)- *Bacillus* sp; Perfil B (2, 9 e 13)- *Bacillus* sp.; Perfil C (3, 7)- *Bacillus* sp.; Perfil D (4)-*Sphingomonas* sp.; Perfil E (5,12)- *Bacillus* sp.; Perfil F (6)- *Bacillus subtilis*; Perfil G (8)-*Thalassobacillus devorans*; Perfil H (11)- *Bacillus* sp.; Perfil I (10)-*Enterobacter* sp.; Perfil J (14)- *Pediococcus acidilactici*.; Perfil L (15)- *Sphingomonas* sp.; Perfil M (16)- *Lactobacillus plantarum*.

O par de *primers* set II foi utilizado com sucesso para o agrupamento de 270 microrganismos. Os grupos 2, 3 e 4 e alguns isolados dos grupos 6 e 7

(Tabela 2) não puderam ser identificados, pois produtos de PCR não foram amplificados. Por meio da dupla digestão enzimática foram obtidos 12 padrões de fragmentos de restrição distintos (Figura 3).

Utilizando-se a técnica ARDRA, com a região espaçadora 16S-23S do rDNA (*primer set II*) e dupla digestão por Hae III e Hind III foi possível observar alto polimorfismo de perfis de bandas entre os isolados. As sequências parciais do gene 16S-23S rDNA obtidas de representantes de cada grupo foram alinhadas com todas as sequências presentes no Banco de dados GenBank e resultaram na identificação final da microbiota dominante no *caxiri* (Tabela 4).

Os perfis A, B, C, E, F e H foram característicos para espécies de *Bacillus*. Entre estes, somente o perfil F apresentou representantes de uma única espécie, *B. subtilis*. Esta bactéria também gerou um padrão de banda diferenciado dos outros isolados de *Bacillus* na produção de ‘Hawaijar’ (Jeyaram et al., 2008).

O perfil A, gerado pelo ARDRA, apresentou isolados identificados como *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. cereus* e *B. thuringiensis*. Essas espécies de *Bacillus* são proximamente relacionadas e agrupadas por meio da região 16S rDNA (Hans et al., 1991). O perfil B apresentou isolados de *B. amyloliquefaciens* e *B. thuringiensis*, espécies também relacionadas entre si, por serem de origem não médica, sendo encontradas principalmente no solo e em alimentos (Hans et al., 1991). O perfil C foi caracterizado por *B. pumilus*, *B. thuringiensis* e *B. cereus*. O *B. cereus* e o *B. thuringiensis* (grupo *B. cereus*) são proximamente relatados pelo alto grau de similaridade entre suas sequências (Lechner et al, 1998; Castanha et al., 2007). Estas espécies não podem ser diferenciadas somente com base na sequência do 16S rDNA (Wu et al., 2006), mas elas são diferentes com relação aos corpos parasporais e ao padrão de crescimento das colônias. O perfil E teve como representantes *B. simplex* e *B.*

*pumilus* e o perfil H foi caracterizado, principalmente, por *B. cereus*, mas *B. thuringiensis* também foi identificado por meio desse padrão de banda.

Amoa-Awua & Jakobsen (1995) e Amoa-Awua et al. (1997) demonstraram a habilidade de algumas espécies de *Bacillus*, incluindo *B. subtilis* e *B. pumilus* isolados de massa de mandioca azeda, *agbelima*, de hidrolisar o tecido da mandioca, por meio da produção de celulases. O gênero *Bacillus* é conhecido por sua habilidade de secretar proteases. A importância biotecnológica de algumas espécies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* e *B. stearothermophilus*, deve-se a várias aplicações relatadas para a produção de enzimas, antibióticos, solventes e outras moléculas (Nascimento e Martins, 2004; Beg e Gupta, 2003). *B. thuringiensis* é utilizado para o controle de insetos protegendo diversas culturas (Juarez-Pérez et al., 1997). Já *B. cereus* é de interesse médico, pois é um patógeno de homens e animais (Keim et al., 1997).

*Thalassobacillus devorans* (perfil G), *Pediococcus acidilactici* (J), *Lactobacillus plantarum* (M), *Sphingomonas* sp. (D e L) e *Enterobacter* sp. (I) puderam ser diferenciados por meio do ARDRA, apresentando padrões de bandamento distintos.

*Thalassobacillus devorans* é uma espécie nova moderadamente halofílica, que foi primeiramente isolada em *habitats* hipersalinos no sul da Espanha (Garcia et al., 2005). Esta espécie ainda não havia sido relacionada a fermentações espontâneas.

As BAL encontradas no *caxiri* foram *L. plantarum*, isolada somente nas primeiras horas da fermentação e *P. acidilactici*, presente em todos os tempos amostrados. *L. plantarum* vem sendo relatado em muitos alimentos fermentados tradicionais, como *ogi*, *uji*, *boza*, *gari*, *agbelina* e *cauim* (Halm et al., 1993; Sanni, 1993; Holzapfel, 1997; Oyewole, 1997; Gotcheva et al., 2000; Amoa-Awua et al., 2005; Almeida et al., 2007). As BAL são típicos microrganismos da

fermentação de mandioca, com predominância dos gêneros *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii* e *L. manihotvorans*), seguido por *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Lactococcus* (Morlon-Guyot et al., 1998; Lacerda et al., 2005; Silveira et al., 2003).

*Sphingomonas* sp. foi encontrada durante toda a fermentação, mas em maior número nas primeiras 48 horas. Esse gênero tem como características ser gram-negativo, bastonete ou cocobacilo, catalase positiva, oxidase positiva (Holt et al., 1994). Muitas espécies de *Sphingomonas* têm sido isoladas de ambientes hospitalares, mas a maioria pode ser encontrada em solos, rios, bem como na superfície de rizosfera de plantas (Ashtaputre & Shah, 1995). Linhagens de *Sphingomonas* foram estudadas com a finalidade de produzir biopolímeros por meio da fermentação para utilização como espessantes, gelificantes e estabilizantes nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química e petroquímica (Berwanger et al., 2007). O *caxiri* tem consistência líquido-pastosa e já foi descrito como mingau alcoólico. *Sphingomonas* sp. pode estar envolvida no desenvolvimento desta consistência, pela produção de biopolímeros que têm características gelificantes, alta viscosidade e estabilidade térmica, atuando como uma goma na bebida.

*Enterobacter* é um gênero de bactérias gram-negativas, facilmente encontradas no ambiente, como na água, no solo, nas plantas e associada a pequenos mamíferos e insetos. A distribuição dessas bactérias justifica sua presença no *caxiri*, visto que seu preparo é rudimentar e não tem controle de assepsia. Este gênero também foi relatado em fermentações de mandioca, no *cauim* (Almeida et al., 2007) e no *attiéké* (Coulin et al., 2006). Bactérias dos gêneros *Acetobacter*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* são os contaminantes mais atuantes e, geralmente, associados aos fracassos da fermentação alcoólica, devido à formação do ácido lático e de outros ácidos orgânicos (Amorim & Oliveira, 1982).

Neste trabalho, não foi observada a predominância de bactérias do ácido láctico (BAL) durante a fermentação, estando em desacordo com a literatura sobre fermentações de raízes de mandioca (Almeida et al., 2007; Padonou et al., 2009; Oguntoyinbo & Dodd, 2010).

Os 205 isolados de leveduras foram submetidos a testes bioquímicos de fermentação em meio líquido contendo glicose como fonte de carbono, produção de esporos em meio específico, DBB, urease, além de caracterização morfológica das colônias e células. Entre estes, 11 isolados, ou 5,1%, apresentaram a capacidade de hidrolisar a ureia e não produziram ascósporos em meio específico, sendo previamente identificados entre os Basidiomicetos. Desses, 9 leveduras não foram capazes de fermentar a glicose (Tabela 3). As leveduras isoladas apresentaram morfologia celular esferoidal, ovoidal ou cilindroidal. Portanto, a população quase total de leveduras (95%) pode ser caracterizada como fermentativa e pertencente à divisão Ascomycota.

TABELA 3 Agrupamento dos isolados leveduriformes, de acordo com testes preliminares realizados (fermentação de glicose, urease, DBB, produção de ascósporos).

Grupo	Característica do grupo	Nº de isolados
1	Urease positiva, fermentação positiva, DBB negativo, produz ascósporos	2
2	Urease positiva, fermentação negativa, DBB positivo e não produz ascósporos	9
3	Urease negativa, fermentação positiva, produz ascósporos	194
TOTAL		205

Os isolados foram agrupados pelos resultados desses testes morfológicos, bioquímicos e por ARDRA. Para a identificação das espécies procedeu-se o sequenciamento da região ITS1-5.8S rDNA. Foram obtidos nove padrões de fragmentos de restrição distintos (Figura 4), os quais corresponderam a seis espécies. Os perfis A, C, G e H corresponderam à mesma espécie, *Saccharomyces cerevisiae*. Isso, possivelmente, se deve ao fato de haver polimorfismo dentro da espécie, gerando padrões de fragmentos de restrição distintos. Jeyaram et al. (2008) também encontraram perfis diferentes correspondendo à mesma espécie.

Parte do 18S rDNA, o 5.8S rDNA e parte do 28S rDNA são aqui referidos como região 5.8S-ITS rDNA. Essa região foi amplificada pelos *primers* ITS1-ITS4 (White et al., 1990). O par de *primers* ITS1-ITS4 foi utilizado com sucesso neste estudo para o agrupamento e posterior identificação de 205 leveduras, com exceção de 3 isolados que não puderam ser identificados, pois não apresentaram similaridade com nenhuma sequência de nucleotídeos depositada no GenBank. O peso molecular dos diferentes perfis de bandas das 6 espécies identificadas variou de, aproximadamente, 100 pb a 750 pb (Figura 4).

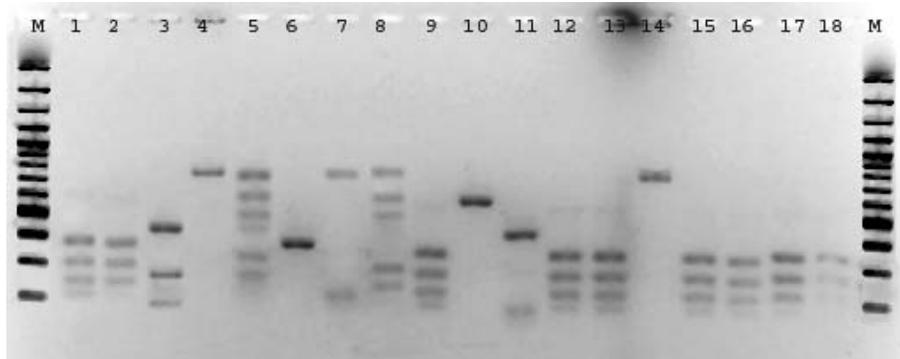


FIGURA 4 Agrupamento por ARDRA das leveduras isoladas do *caxiri* por meio da amplificação da região ITS1-5.8S rDNA-ITS2, usando digestão dupla com Hae III e Msp I. As letras se referem aos diferentes perfis encontrados: M- Marcador GeneRuller 100pb Plus DNA Ladder, ready-to-use (Fermentas), com fragmentos de 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 e 100 pb; Perfil A (1, 2, 9, 12, 13,15, 16, 17 e 18)- *Saccharomyces cerevisiae*; Perfil B (3)- *Rhodotorula mucilaginosa*; Perfil C (5)- *Saccharomyces cerevisiae*; Perfil D (6)- *Pichia membranifaciens*; Perfil E (11)- *Pichia guilliermondii*; Perfil F (4 e 14)- Não identificado; Perfil G (10)- *Saccharomyces cerevisiae*; Perfil H (7)- *Saccharomyces cerevisiae*; Perfil I (8)-*Cryptococcus luteolus*.

A região 5.8S-ITS foi também utilizada para a identificação de leveduras isoladas de kefir (Latorre-Garcia et al., 2007), do setor de laticínios (Bockhelmann et al., 2008), de vinho (Clemente-Jimenez et al., 2004), de aves (Deak et al., 2000), de leveduras isoladas em diferentes ambientes (Esteve-Zaroso et al., 1999), de suco de laranja (Pina et al., 2005), espécies de *Candida* (Sipiczki, 2004), fermentação industrial para a produção de etanol (Liberal et al., 2005) e isolados de *cauim* de arroz e amendoim (Ramos et al., 2010) .

*Saccharomyces* foi o gênero dominante entre os isolados leveduriformes, sendo *S. cerevisiae* a principal levedura identificada na fermentação do *caxiri*. De maneira geral, o gênero *Saccharomyces* desempenha importante papel durante as fermentações alcoólicas para a produção de vinho, cerveja, saquê e

etanol combustível. Esta levedura também foi o microrganismo dominante em fermentação de sorgo para a produção de uma cerveja chamada *tchoukoutou*, em Benin (Kayodé et al., 2007). A presença de linhagens de *S. cerevisiae* durante fermentação de cana-de-açúcar, café e mandioca já foi relatada por Schwan et al. (2001), Silva et al. (2000), Coulin et al. (2006), respectivamente.

Outras leveduras presentes em menor número, durante a fermentação do *caxiri*, foram *Pichia membranifaciens*, *P. guilliermondii* e *Rhodotorula mucilaginosa*. Os gêneros *Pichia* e *Saccharomyces* foram também detectados em bebida fermentada de arroz e mandioca produzida por índios brasileiros (Schwan et al., 2007). Ramos et al. (2010), estudando a fermentação espontânea de arroz e amendoim, encontraram, como leveduras dominantes, *P. guilliermondii*, além de *S. cerevisiae* e *R. mucilaginosa*. As espécies *R. mucilaginosa* e *P. guilliermondii* também foram reportadas na fermentação da boza (Botes et al., 2007). Estes mesmos autores relataram que *P. guilliermondii* é usualmente encontrada em vários ambientes, como solo, água e bebidas fermentadas. Leveduras dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula* foram descritas em outro processo de fermentação de mandioca no Brasil (Lacerda et al., 2005). Na África ocidental, Oyewole (2001) isolou diferentes gêneros de leveduras, entre eles *Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces* e *Zygosaccharomyces*, durante a fermentação de mandioca para a produção de *fufu* (Coulin et al., 2006).

*Cryptococcus luteolus* foi detectada em baixas contagens na bebida. Essa levedura pode ser considerada patogênica oportunista, causando a criptococose, uma infecção fúngica que afeta, principalmente, indivíduos imunossuprimidos (Bivanco et al., 2006). Sua presença em somente um tempo da fermentação indicou contaminação da bebida, provavelmente por parte das manipuladoras ou dos utensílios utilizados no preparo do *caxiri*.

Tem sido sugerido que o crescimento de leveduras em alimentos e bebidas fermentados é favorecido pelo ambiente ácido criado pelas bactérias e

que o crescimento de bactérias é estimulado pela presença de leveduras, as quais podem fornecer fatores de crescimento, como vitaminas e compostos nitrogenados solúveis (Nout & Sarkar, 1999). A produção de ácidos e de outros compostos antimicrobianos pode promover ou melhorar a segurança e a estabilidade dos produtos fermentados (Schwan et al., 2007).

Mais estudos sobre as leveduras envolvidas na fermentação alcoólica da mandioca devem ser realizados, com o objetivo de saber exatamente o papel desses microrganismos. Entretanto, pode-se sugerir que eles podem estar envolvidos na degradação do amido, produção de etanol e sabor.

## **5.2 Sucessão microbiana durante a fermentação do caxiri**

Os resultados deste estudo indicaram que as espécies dominantes presentes no início da fermentação foram *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Sphingomonas* sp. e, em menor número, as BAL *P. acidilactici* e *L. plantarum*. A presença de leveduras *S. cerevisiae* e *R. mucilaginosa* foi detectada logo após a adição das batatas-doce. Este resultado indicou que esses microrganismos podem ser provenientes do inóculo, além do ambiente ou dos utensílios utilizados para o preparo da bebida.

Os resultados nas Tabelas 4 e 5 mostraram que a microbiota presente na fermentação do *caxiri* foi dominada, no início do processo, por *B. pumilus*, *B. subtilis* e *Sphingomonas* sp. Leveduras e BAL ocorreram em baixas contagens. Depois de 24 horas, a microbiota foi composta majoritariamente por *P. acidilactici*, mas foi detectada a presença de *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. simplex*, *Sphingomonas* sp. e *L. plantarum*. A população de leveduras, no T24 horas de fermentação, foi composta por *S. cerevisiae* e *Rhodotorula mucilaginosa*. A partir de 48 horas de fermentação, as leveduras se tornaram os microrganismos dominantes e contribuíram para a acidificação e o aumento do grau alcoólico do produto. *Saccharomyces cerevisiae* foi a principal

levedura identificada neste período. Simultaneamente, houve redução na população de bactérias, mudança que pode ser explicada pela redução nos valores de pH e aumento do teor alcoólico na bebida no decorrer do processo fermentativo. *Bacillus megaterium* fez parte da população bacteriana presente nesta amostra.

Decorridas 72 horas de fermentação, *Enterobacter* sp. foi capaz de crescer na bebida, indicando contaminação. *B. amyloliquefaciens* esteve presente nas amostras a partir deste tempo. As leveduras *P. guilliermondii* e *P. membranifaciens* foram isoladas e identificadas somente neste tempo de fermentação.

TABELA 4 Distribuição, em %, de bactérias isoladas na fermentação do *caxiri*, produzido com mandioca e batata-doce.

Número de acesso	Similaridade (%)		T0	T24	T48	T72	T96	T 120
		Bacteria	(%)					
GI:253720431	98-99	<i>Bacillus pumilus</i>	20,9 (10)	4,1 (4)	4,5 (5)	8,1 (6)	34,1 (14)	38,3 (15)
GI:109676381	99-100	<i>Bacillus subtilis</i>	30,8 (14)	0,7 (3)	9,8 (11)	1,6 (1)	4,5 (4)	6,9 (5)
GI:42740913	98-100	<i>Bacillus cereus</i>	2,2 (2)	0,2 (1)	11,6 (6)	14,5 (13)	3,4 (3)	2,7 (2)
GI:218086503	97-100	<i>Bacillus thuringiensis</i>	2,2 (2)	1,4 (6)	7,1 (12)	16,1 (9)	24,0 (12)	32,9 (24)
GI:118603279	98	<i>Bacillus megaterium</i>	0	0	3,6 (4)	0	0	0
GI:154350369	100	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0	0	0	6,4 (4)	3,4 (3)	1,4 (1)
GI:253720424	100	<i>Bacillus simplex</i>	4,4 (4)	0,7 (3)	1,8 (2)	0	0	0
GI:260842091	100	<i>Thalassobacillus devorans</i>	0	0	0	0	0	4,1 (1)
GI:262477965	100	<i>Sphingomonas</i> sp.	18,6 (6)	3,5 (11)	25,0 (10)	14,6 (6)	1,1 (1)	5,5 (4)
GI:22093957	99	<i>Pediococcus acidilactici</i>	2,2 (2)	85,8 (24)	2,7 (3)	1,6 (1)	2,3 (2)	4,1 (3)
GI:156447550	97-98	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,3 (3)	0,2 (1)	0	0	0	0
GI:157849642	97-98	<i>Enterobacter</i> sp.	2,2 (2)	0	0	1,6 (1)	26,1 (6)	0
		Não identificadas	13,2 (8)	2,4 (10)	28,5 (14)	35,5 (17)	1,1 (1)	4,1 (3)

( ) números entre parênteses indicam o número de isolados, T0 = 0 hora de fermentação, T24 = 24 horas, T48 = 48 horas, T72 = 72 horas, T96 = 96 horas e T120 = 120 horas.

TABELA 5 Distribuição de leveduras isoladas na fermentação do *caxiri*, produzido com mandioca e batata-doce.

Número de acesso	Similaridade (%)		T0	T24	T48	T72	T96	T 120
		Leveduras	(%)					
GI:161332350	98-100	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	80,1 (8)	90,0 (12)	99,4 (64)	55,7 (24)	98,9 (48)	100,0 (14)
GI:20378560	99	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	19,0 (4)	10,0 (3)	0	0	0	0
GI:70888517	100	<i>Pichia membranifaciens</i>	0	0	0	37,4 (15)	0	0
GI:256275031	100	<i>Pichia guilliermondii</i>	0	0	0	6,9 (7)	0	0
GI:20378384	100	<i>Cryptococcus luteolus</i>	0	0	0	0	1,1 (3)	0
		Não identificada	0	0	0,6 (3)	0	0	0

( ) números entre parênteses indicam o número de isolados, T0 = 0 hora de fermentação, T24 = 24 horas, T48 = 48 horas, T72 = 72 horas, T96 = 96 horas e T120 = 120 horas.

A partir de 96 horas do processo fermentativo, a população bacteriana se manteve estável. A levedura *Cryptococcus luteolus* esteve presente somente nesta amostra, indicando ser uma espécie contaminante, possivelmente proveniente das pessoas que prepararam a bebida. No tempo 120 horas, a bactéria *Thalassobacillus devorans* pode ser isolada e a levedura *S. cerevisiae* foi a única espécie encontrada, mostrando sua predominância no processo fermentativo.

### 5.3 PCR-DGGE

Os trabalhos de Omar & Ampe (2000) e Ercolini et al. (2003) mostraram que a variável região V3 do 16S rDNA pode ser utilizada para avaliar a população bacteriana em alimentos fermentados. Nielsen et al. (2005), estudando as leveduras associadas à fermentação de cacau, mostraram que a técnica de DGGE é uma ferramenta eficiente para estudos de dinâmica de populações de leveduras. Vários autores têm empregado esta técnica para o estudo dos microrganismos envolvidos na produção dos mais diversos alimentos fermentados, incluindo aqueles produzidos à base de mandioca (Haruta et al., 2006, Miambi et al., 2003, Ampe et al., 2001).

No presente estudo, o DNA foi extraído diretamente das amostras de *caxiri* coletadas em cada tempo de fermentação e foi utilizado como molde nas ampliações de PCR da região 16S rDNA para procariotos e 18S rDNA para eucariotos. Subseqüentes ampliações de PCR foram analisadas por DGGE. Foram obtidos produtos de amplificação com aproximadamente 180 pb utilizando-se *primers* específicos para a comunidade bacteriana e 370 pb, utilizando *primers* específicos para a comunidade fúngica.

Os padrões de bandas da comunidade indicaram a dinâmica e a sucessão bacteriana que ocorreram durante o progresso da fermentação (Fig 5). O perfil da comunidade bacteriana presente no *caxiri* não apresentou muitas variações a

partir de 24 horas de fermentação, indicando que não ocorreram grandes mudanças da população durante toda fermentação. Foi possível notar que fragmentos presentes no tempo 0 hora, logo após a adição do inóculo, permaneceram durante a fermentação, revelando que microrganismos presentes na batata-doce fazem parte da microbiota da bebida fermentada, resultado também observado pela técnica tradicional.

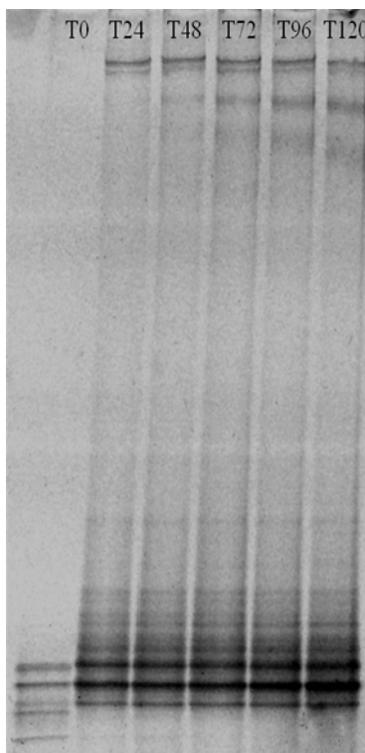


FIGURA 5 Gel de poliacrilamida de DGGE, gerado por separação de fragmentos do gene 16S rDNA amplificado com *primer* específico para a comunidade bacteriana das amostras do cauíim durante 48 horas de fermentação. T0 = 0 hora, T24 = 24 horas, T48 = 48 horas, T72 = 72 horas, T96 = 96 horas, T120 = 120 horas.

Na análise da comunidade fúngica, as principais bandas encontradas no tempo 0 hora de fermentação persistiram durante todo o processo, o que permite afirmar que as leveduras presentes durante a fermentação, provavelmente, eram originárias do inóculo, do ambiente ou dos objetos utilizados no preparo da bebida (Fig 6).



FIGURA 6 Gel de poliacrilamida de DGGE, gerado por separação de fragmentos do gene 18S rDNA amplificado com *primer* específico para a comunidade fúngica das amostras do *caxiri*, durante 120 horas de fermentação. T0 = 0 hora, T24 = 24 horas, T48 = 48 horas, T72 = 72 horas, T96 = 96 horas, T120 = 120 horas.

As amostras em horas próximas apresentam maior conformidade em relação à composição da microbiota. Resultados semelhantes foram observados por Nielsen et al. (2007), ao analisarem os microrganismos envolvidos na fermentação do cacau, os quais relataram que a dinâmica das comunidades microbianas se alterou vagarosamente durante o curso da fermentação.

No gel de DGGE da comunidade bacteriana (Figura 5), foram observados 13 fragmentos de DNA principais, enquanto 15 fragmentos diferentes foram detectados no gel de DGGE da comunidade fúngica (Figura 6). Estes resultados permitem afirmar que esta técnica foi capaz de detectar leveduras presentes nas amostras que não puderam ser identificadas pelo método tradicional de cultivo, já que cada fragmento obtido no gel de DGGE, teoricamente, corresponde a uma espécie diferente.

A análise do agrupamento hierárquico, em função da presença e da ausência de bandas detectadas nas diferentes horas de fermentação, é visualizada em forma de dendrograma (Figuras 7 e 8). O dendrograma indicou a presença de dois grupos distintos para a comunidade bacteriana. A amostra T0 foi a única agrupada separadamente das demais, podendo ser observado menor número de bandas. Isso pode ser devido, provavelmente, ao fato de componentes minoritários da microbiota original serem selecionados pelo ácido ou por outras condições nutricionais, o que induziu ao aumento em sua população, durante o processo de fermentação.

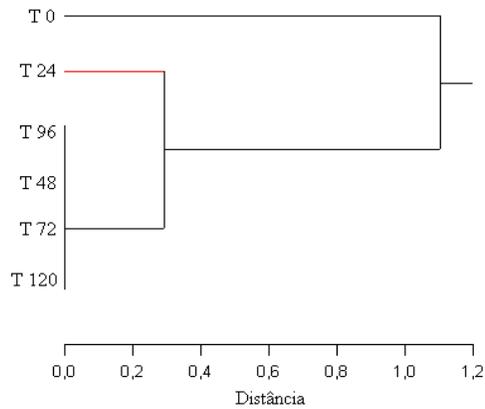


FIGURA 7 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 16S de bactérias presentes nas 120 horas de fermentação do *caxiri*

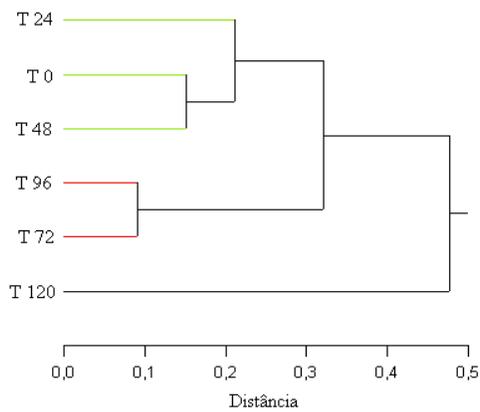


FIGURA 8 Agrupamento hierárquico de amplicons de rDNA 18S de leveduras presentes nas 120 horas de fermentação do *caxiri*

O dendograma para os eucariotos também dividiu as amostras em dois diferentes grupos. O primeiro foi formado pelas amostras retiradas a partir do tempo 0 até a amostra T96. Esse resultado indicou que não houve grandes alterações na população fúngica a partir da adição do inóculo até a bebida estar

pronta para consumo. O segundo grupo foi constituído somente pelo tempo 120 horas, o qual apresentou menor quantidade de bandas. Isso pode ser explicado, possivelmente, pelo estresse causado pelo elevado teor alcoólico, pela escassez de nutrientes na bebida e pela dominância da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que pode ser observada na técnica dependente de cultivo.

A técnica de DGGE vem sendo bastante empregada em análises de comunidades de microrganismos em alimentos fermentados, mas é muito importante considerar algumas limitações quando esta é utilizada para estudos de ecologia de microrganismos. Algumas comunidades representativas podem não ser detectadas pelo sistema de *primers*, de modo que as bandas observadas no gel podem representar as espécies mais abundantes na amostra (Ercolini, 2003). *Amplicons* de microrganismos diferentes podem possuir a mesma mobilidade eletroforética, ocupando a mesma posição no gel. Portanto, uma banda detectada no gel pode representar mais de um genótipo, com sequências divergentes, mas com teores de G+C iguais. Outra limitação é que um mesmo microrganismo pode gerar múltiplas bandas no gel de DGGE, devido à heterogeneidade do operon (Giraffa & Neviani, 2001).

Portanto, a técnica de PCR-DGGE deve ser utilizada juntamente com outras técnicas, como, por exemplo, técnicas dependentes de cultivo. Dessa forma, esta é uma ferramenta complementar para o estudo de comunidades microbianas complexas.

#### **5.4 Caracterização físico-química do caxiri**

Como se observa na Tabela 6, o valor de pH decresceu durante a fermentação e alcançou 3,15, ao final do processo. Valores similares de pH foram também encontrados na fermentação de mandioca e arroz, por Almeida et al. (2007); em fermentação de ‘puba’, por Silveira et al. (2000) e na produção de *Fufu*, por Fagbemi & Ijah (2006). A acidez total titulável aumentou de 0,04

para 0,26 g/100ml, confirmando a acidificação durante o processo fermentativo. A baixa acidez do inóculo, observada nas primeiras horas de fermentação, permitiu um bom desenvolvimento de *Bacillus* spp. e enterobactérias, microrganismos considerados sensíveis a ácidos (Obilie et al., 2004).

Decrescentes concentrações de amido solúvel foram encontradas durante a fermentação (Tabela 6), variando de 1,13% a 0,68%, no final do processo. Tem sido reportado que a atividade metabólica microbiana é responsável pela hidrólise do amido durante a fermentação de mandioca (Demiate et al., 2000).

Carboidratos foram analisados durante a fermentação. A maior concentração de glicose foi observada após 48 horas de fermentação, podendo ser devido à atividade de amilase dos microrganismos.

TABELA 6 Caracterização físico-química do *caxiri* durante a fermentação.

Características	Tempo de fermentação (horas)						
	AP	0	24	48	72	96	120
Acidez total titulável (g/100ml)	0,36±0,04	0,04±0,01	0,12±0,01	0,22±0,01	0,25±0,01	0,28±0,02	0,26 ± 0,01
pH	4,37±0,32	4,76±0,25	3,62±0,11	3,27±0,23	3,18±0,17	3,19±0,16	3,15 ± 0,13
Proteína (%)	5,70±0,14	1,20±0,14	1,35±0,07	1,95±0,35	0,90±0,01	1,45±0,07	1,00 ± 0,01
Amido (%)	10,3±0,70	11,3±0,43	8,13±0,15	10,35±2,62	5,93±0,25	9,57±1,05	6,80 ± 0,10
Açúcares totais ( g/100g)	11,66±0,78	32,81±0,57	32,76±0,51	17,02±0,15	17,34±0,81	15,93±0,58	15,26 ± 0,21

AP – água de puba, SST – sólidos solúveis totais), ± - desvio padrão

Essa atividade pode ser atribuída, principalmente, aos *Bacillus*, gênero dominante entre as bactérias. Das 48 espécies de *Bacillus* descritas, 32 produzem  $\alpha$ -amilase. Dentro deste gênero, *B. subtilis* e *B. licheniformis* são as duas espécies mais utilizadas frequentemente na produção comercial de  $\alpha$ -amilase (Sajedi et al., 2005). A glicose foi encontrada, durante o preparo da bebida, em concentrações que variaram de 6,04 a 0,38 g l<sup>-1</sup> (Tabela 7).

Frutose foi detectada em baixas concentrações, não ultrapassando 4 g l<sup>-1</sup> no decorrer da fermentação. A utilização dos açúcares pode também ser observada pelo decréscimo dos açúcares totais, que variaram de 3,38 a 1,53 g/100g. O conteúdo de proteínas aumentou após 48 horas de fermentação, o que pode ser correlacionado com o aumento da biomassa microbiana durante o processo, visto que, neste tempo de fermentação, a contagem microbiana foi a mais elevada, atingindo 7,34 logUFC/ml.

Etanol, ácidos orgânicos (ácidos acético, láctico, cítrico, málico, tartárico, succínico, oxálico e propiônico) e carboidratos (glicose e frutose) foram analisados durante a fermentação (Tabela 7). A concentração de etanol aumentou somente após 24 horas. No tempo 48 horas, a concentração alcoólica foi de 70,99 g l<sup>-1</sup>, que corresponde a, aproximadamente, 9°GL, porém, a graduação alcoólica continuou aumentando até atingir 104,69 g l<sup>-1</sup>, no tempo 96 horas, correspondendo a 13,3°GL. Leveduras do gênero *Saccharomyces* parecem ser as principais responsáveis pela produção do etanol no *caxiri*.

TABELA 7 Caracterização físico-química durante o processo fermentativo do *caxiri*.

Composto	Tempo de fermentação (horas)						
	AP*	0	24	48	72	96	120
Ácido acético (g l <sup>-1</sup> )	18,26±0,07	3,04±0,11	1,65±0,02	3,49±0,02	3,59±0,05	7,97±0,00	5,13±0,12
Ácido láctico (g l <sup>-1</sup> )	49,16±0,05	4,59±0,08	9,93±0,05	16,80±0,09	18,40±0,00	31,45±0,08	27,89±0,35
Ácido cítrico (g l <sup>-1</sup> )	1,75±0,00	2,00±0,02	1,49±0,00	1,12±0,00	1,12±0,03	1,54±0,03	1,34±0,06
Ácido málico (g l <sup>-1</sup> )	6,37±0,00	2,23±0,06	3,72±0,35	0,63±0,02	1,19±0,06	3,69±0,00	1,86±0,12
Ácido tartárico (g l <sup>-1</sup> )	2,12±0,02	0,42±0,03	0,79±0,06	nd	0,23±0,02	0,10±0,00	0,28±0,03
Ácido succínico (g l <sup>-1</sup> )	14,96±0,06	7,07±0,13	2,26±0,15	2,37±0,01	5,74±0,23	7,19±0,29	7,46±0,32
Ácido oxálico (g l <sup>-1</sup> )	0,59±0,00	0,39±0,01	0,17±0,00	0,18±0,00	0,25±0,01	0,57±0,01	0,22±0,01
Ácido propiônico (g l <sup>-1</sup> )	11,22±0,12	3,69±0,11	2,24±0,04	2,31±0,00	1,63±0,00	1,47±0,01	2,24±0,04
Glicose (g l <sup>-1</sup> )	6,48±0,01	4,31±0,00	4,48±0,00	6,04±0,01	3,69±0,01	4,98±0,01	0,38±0,01
Frutose (g l <sup>-1</sup> )	7,56±0,01	3,67±0,01	2,25±0,01	2,14±0,01	1,65±0,01	2,45±0,01	1,75±0,01
Glicerol (g l <sup>-1</sup> )	61,30±0,04	21,15±0,00	31,68±0,08	53,51±0,05	45,39±0,06	1187,26±0,81	56,50±0,04
Etanol (g l <sup>-1</sup> )	19,35±0,00	nd	20,08±0,00	70,99±0,09	73,66±0,15	104,69±0,05	83,86±0,05
Metanol (g l <sup>-1</sup> )	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

AP- Água de puba , nd (não detectado), ± - desvio padrão

A produção de ácido láctico aumentou durante o processo fermentativo, atingindo seu nível máximo em 96 horas de fermentação, e a concentração final encontrada foi de 27,89 g l<sup>-1</sup>. A alta concentração deste ácido orgânico pode ser explicada pela presença de bactérias homoláticas, como *L. plantarum* e *P. acidilactici*. De acordo com as rotas metabólicas em que as hexoses são metabolizadas, os microrganismos são divididos em dois grupos: homofermentativos e heterofermentativos. Homofermentativos, como *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e alguns *Lactobacillus*, produzem ácido láctico como o maior ou o único produto da fermentação da glicose. (Aguirre & Collins, 1993; Tamime e O'Connor, 1995). Altas concentrações de lactato também foram reportadas em fermentações de mandioca e arroz (Almeida et al., 2007), mandioca (Ampe et al., 1999) e *fufu* (Brauman et al., 1996).

Um ligeiro aumento na concentração de ácido acético também pode ser notado. Essa observação indicaram um processo simultâneo de sacarificação e fermentação alcoólica, seguido pela produção de ácido acético. Parte do conteúdo de etanol pode ter sido convertido por bactérias do ácido acético. O grupo bioquímico 7 (Tabela 1) é composto por bactérias gram-negativas e oxidase negativa. Dentro deste grupo havia isolados que apresentaram atividade de catalase positiva, os quais foram previamente agrupados no gênero *Acetobacter*. Entretanto, não houve a formação de produtos de PCR para estas bactérias, indicando que a região intergênica 16S-23S do rDNA acessada pelos *primers* utilizados não foi adequada ao estudo dessas bactérias. Portanto, o uso de meios de cultura específicos e outros *primers* será fundamental para a verificação da presença desta espécie na bebida. A produção de ácido láctico e acético, durante a fermentação do *caxiri*, está de acordo com resultados de Coulin et al. (2006) e Giraud et al. (1998), que concluíram que a fermentação

heterolática ocorre na maioria dos produtos de mandioca espontaneamente fermentados na África.

Os ácidos cítrico, málico, tartárico, succínico, oxálico e propiônico não apresentaram grandes alterações em suas concentrações e o ácido butírico não foi detectado em nenhuma das amostras. Estes resultados indicam que estes ácidos não foram metabólitos importantes durante a fermentação de mandioca para a produção do *caxiri*.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a composição microbiana, durante o processo fermentativo do *caxiri*, se alterou lentamente e os microrganismos predominantes já se encontravam presentes nas primeiras horas de fermentação. Esses microrganismos foram, provavelmente, oriundos do inóculo, do ambiente e dos utensílios utilizados durante a preparação e foram responsáveis por alterações físico-químicas durante o período de fermentação.

As espécies bacterianas predominantes foram *B. thuringiensis*, *B. pumilus*, *Sphingomonas* sp. e *P. acidilactici*. A levedura *S. cerevisiae* prevaleceu durante todo o processo fermentativo, sendo, provavelmente, responsável pela produção do etanol na bebida.

A técnica molecular ARDRA e o sequenciamento foram ferramentas úteis para a caracterização dos microrganismos e reduziram o tempo de identificação das espécies. No entanto, essas técnicas devem estar associadas aos métodos tradicionais de identificação.

Teor alcoólico médio de 11°GL foi encontrado na bebida final, indicando a fermentação alcoólica por parte da levedura *S. cerevisiae*. Quantidades expressivas de ácido láctico foram encontradas, revelando que houve progressiva acidificação da bebida durante a fermentação.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos fragmentos obtidos no DGGE deve ser realizada, para que se possam comparar os métodos dependente e independente de cultivo e também conhecer espécies que não são capazes de serem cultivadas, porém, estão presentes na fermentação da bebida.

Portanto, o conhecimento sobre os microrganismos envolvidos no processo de fermentação e suas dinâmicas para a produção da bebida *caxiri* é um pré-requisito para o desenvolvimento de uma bebida de maior qualidade nutricional e mais segura, no aspecto sanitário.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, M.; COLLINS, M. D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 75, n. 2, p. 95-107, Aug. 1993.
- ALBUQUERQUE, M. **A mandioca na Amazônia**. Belém: Ministério do Interior, 227 p. 1969
- 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.A.; FEGLO, M. O. P. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 6/7, p. 1201-1207, Oct. 2005.
- AMOA-AWUA, W. K. A.; FRISVAD, J. C.; SEFADEDEH, S.; JAKOBSEN, M. The contribution of moulds and yeasts to the fermentation of agbelima cassava dough. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 83, n. 3, p. 288-296, Aug. 1997.
- AMOA-AWUA, W. K. A.; JAKOBSEN, M. The role of bacillus species in the fermentation of cassava. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 79, n. 3, 250-256, Sept. 1995.
- AMOA-AWUA, W. K. A.; OWUSU, M.; FEGLO, P. Utilization of unfermented cassava flour for the production of an indigenous African fermented food, agbelima. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 6/7, p. 1201-1207, Oct. 2005.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J. Infecção na fermentação: como evitá-la. **Alcool & Acucar**, São Paulo, v. 2, n. 5, p. 12-18, 1982.
- AMPE, F.; BEN OMAR, N.; MOIZAN, C.; WACHER, C.; GUYOT, J. P. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 3, p. 5464-5473, Mar. 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 RNA hybridization. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 1/2, p. 45-54, Apr. 2001.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of the Agricultural Chemists**. 12. ed. Washington, 1992.

ASHTAPUTRE, A. A.; SHAH, A. K. Studies on the exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*-GS1: nutritional requirements and precursor forming enzymes. **Current Microbiology**, New York, v. 31, n. 4, p. 234-238, Oct. 1995.

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

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, tiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, 294-304, Feb. 2003.

BERWANGER, A. L. S.; SCAMPARINI, A. R. P.; DOMINGUES, N. M.; VANZO, L. T.; TREICHEL, H.; PADILHA, F. F. Biopolymer production synthesized by *Sphingomonas capsulata*, using industrial media. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 1, p. 177-183, jan./fev. 2007.

BIVANCO, F. C.; MACHADO, C. A. S.; MARTINS, E. L. Criptococose cutânea. **Arquivos Médicos do ABC**, Santo Andre, v. 31, n. 2, p. 102-109, jul./dez. 2006.

BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. Bethesda, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acessado em: 5 fev. 2010.

BOCKELMANN, W.; HELLER, M.; HELLE, K. J. Identification of yeasts of dairy origin by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). **International Dairy Journal**, Barking, v. 18, n. 10/11, p. 1066-1071, Oct./Nov. 2008.

BOTES, A.; TODOROV, S. D.; MOLLENDORFF, J. W. von; BOTHA, A.; DICKS, L. M. T. Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. **Process Biochemistry**, London, v. 42, n. 2, p. 267-270, Feb. 2007.

BRASIL. Instrução Normativa SDA nº 22, de 14 de abril de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2 maio 2003. Seção 1.

BRAUMAN, A.; KELEKE, S.; MALONGA, M.; MIAMBI, E.; AMPE, F. Microbiological and biochemical characterization of cassava retting a traditional lactic acid fermentation for foo-foo (Cassava flour) production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 8, p. 2854-2858, Aug. 1996.

CAPECE, A.; SALZANO, G.; ROMANO, P. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non-*Saccharomyces* wine species. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 33-39, July 2003.

CASTANHA, E. R.; VESTAL, M.; HATTAN, S.; FOX, A.; FOX, K. F.; DICKINSON, D. Bacillus cereus strains fall into two clusters (one closely and one more distantly related) to bacillus anthracis according to amino acid substitutions in small acid-soluble proteins as determined by tandem mass spectrometry. **Molecular and Cellular Probes**, London, v. 21, n. 3, p. 190-201, June 2007.

CLEMENTE-JIMENEZ, J.; MINGORANCE-CAZORLA, L.; MARTINEZ-RODRIGUEZ, S.; LAS HERAS-VAZQUEZ, F.; RODRIGUEZ-VICO, F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 2, p. 149-155, Apr. 2004.

COCOLIN, L.; BISSON, L. F.; MILLS, D. A. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 189, n. 1, p. 81-87, Aug. 2000.

COULIN, P.; FARAH, Z.; ASSANVO, J.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 106, n. 2, p. 131-136, Feb. 2006.

DEAK, T.; CHEN, J.; BEUCHAT, L. R. Molecular characterization of *yarrowia lipolytica* and *candida zeylanoides* isolated from poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4340-4344, Oct. 2000.

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, n. 2, p. 149-158, June 2000.

DISCHE, E. Color reactions of carbohydrates. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Methods in carbohydrates chemistry**. New York: Academic, 1962. v. 1, p. 477-512.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVÁSIO, I. M.; SCHWAN, R. F. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 36, n. 4, p. 557-569, Apr. 2009.

ERCOLINI, D.; HILL, P. J.; DODD, C. E. R. Bacterial community structure and location in Stilton cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 6, p. 3540-3548, June 2003.

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 Systematic Bacteriology**, Ames, v. 49, 329-337, Jan. 1999.

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, n. 6, p. 635-640, June 2006.

FOOD DRUGS ADMINISTRATION. **Bacteriological analytical manual**. Washington: AOAC, 1972.

GARCÍA, M. T.; GALLEGO, V.; VENTOSA, A.; MELLADO, E. *Thalassobacillus devorans* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic, phenol-degrading, Gram-positive bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, n. 5, 1789-1795, Sept. 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.

GIRAUD, E.; CHAMPAILLER, A.; MOULARD, S.; RAIMBAULT, M. Development of a miniaturized selective counting strategy of lactic acid bacteria for evaluation of mixed starter in a model cassava fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 84, n. 3, p. 444-450, Mar. 1998.

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

GRAMACHO, D. D. Ensaio sobre a utilização da matéria prima de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz) na obtenção de “carimã e polvilho azedo”. Nota prévia. In: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. **Projeto mandioca**. Cruz das Almas, 1975, 187p. (Série Pesquisa).

GREGERSEN, T. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 5, n. 2, p. 123-127, June 1978.

HALM, M.; LILLIE, A.; SPREUSEN, A. K.; JAKOBSEN, M. Microbiological and aromatic characteristics of fermented maize doughs for kenkey production in Ghana. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 135-143, July 1993.

HANS, G. T.; BALLOWS, A.; DWORKIN, M.; HARDER, W.; SCHLEIFER, K. H. **The prokaryotes, a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications**. 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1991. v. 2.

HARUTA, S.; BUENO, S.; EGAWA, I.; HASHIGUSHI, K.; FUJII, A.; NAGANO, M.; ISHII, M.; IGARASHI, Y. Succession 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.

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: W. & Wilkins, 1994. 787 p.

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

HORWITZ, W. **Official methods of analysis of Association of Agricultural Chemists**. 12. ed. Washington: AOAC, 1992.

IACUMIN, L.; CECCHINI, F.; MANZANO, M.; OSUALDINI, M.; BOSCOLO, D.; ORLIC, S.; COMI, G. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 2, p. 128-135, Apr. 2009.

JEYARAM, K.; SINGH, W. M.; PREMARANI, T.; DEVII, A. R.; CHANU, K. S.; TALUKDAR, N. C.; SINGH, M. R. Molecular identification of dominant microflora associated with 'Hawaijar': a traditional fermented soybean (*Glycine max* (L.)) food of Manipur, India. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 259-268, Mar. 2008.

JUAREZ-PÉREZ, V. M.; FERRANDIS, M. D.; FRUTOS, R. PCR-based approach for detection of novel bacillus thuringiensis cry genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 8, p. 2997-3002, Aug. 1997.

KAYODÉ, A. P. P.; HOUNHOUGAN, D. J.; NOUT, M. J. R.; NIEHOF, A. Household production of sorghum beer in benin: technological and socio-economic aspects. **International Journal of Consumer Studies**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 258-264, Mar. 2007.

KEIM, P.; KALIF, A.; SCHUPP, J.; HILL, K.; TRAVIS, S. E.; RICHMOND, K.; ADAIR, D. M.; HUGH-JONES, M.; KUSKE, C. R.; JACKSON, P. Molecular evolution and diversity in bacillus anthracis as detected by amplified fragment length polymorphism markers. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 179, n. 3, p. 818-824, Feb. 1997.

KIMARYO, V. M.; MASSAWE, G. A.; OLASUPO, N. A.; HOLZAPFEL, W. H. The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of "kivunde", a traditional Tanzanian food product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 2/3, p. 179-190, June 2000.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeast: a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. 79 p.

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, n. 2, p. 213- 219, Nov. 2005.

LATORRE-GARCIA, L.; DEL CASTILLO-AGUDO, L.; POLAINA, J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 785-791, June 2007.

LECHNER, S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, n. 2, p. 1373-1382, Feb. 1998.

LIBERAL, A. T. S.; SILVA FILHO, E.; MORAIS, J.; SIMOES, D.; MORAIS JUNIOR, M. Contaminant yeast detection in industrial ethanol fermentation must by rDNA-PCR. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 1, p. 19-23, Jan. 2005.

LIMA, T. S. **Um peixe olhou para mim: o povo Yudjá e a perspectiva**. São Paulo: UNESP/ ISA; Rio de Janeiro: NUTI, 2005.399 p.

MASOUD, W.; CESAR, L. B.; JESPERSEN, L.; JAKOBSEN, M. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. **Yeast**, Davis, v. 21, n. 7, p. 549-556, May, 2004.

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. 111-120, June 2003.

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

MUGULA, J. K.; NNKO, S. A. M.; NARVHUS, J. A.; SORHAUG, T. Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 187- 199, Feb. 2003.

MUYZER, G.; DE 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. 1, p. 695-700, Jan. 1993.

NASCIMENTO, W.C.A.; MARTINS, M. L. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 1/2, p. 53-62, jan./jun. 2004.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogy method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 153, n. 2, p. 136-175, May 1944.

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

NIELSEN, D. S.; TENIOLA, O. D.; BAN-KOFFI, L.; OWUSU, M.; ANDERSSON, T. S.; HOLZAPFEL, W. H. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. **International of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 114, n. 2, p. 168-186, Mar. 2007.

NOUT, M. J. R.; SARKAR, P. K. Lactic acid fermentation in tropical climates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 76, n. 1/4, p. 395-401, Nov. 1999.

OBILIE, E. M.; TANO, D.; AMOA AWUA, W. K. A. Souring and breakdown of cyanogenic glucosides during the processing of cassava into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 93, n. 1, p. 115-121, May 2004.

OBILIE, E. M.; TANO-DEBRAHA, K.; AMOA-AWUA, W. K. Microbial modification of the texture of grated cassava during fermentation into akyeke. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 275-280, Dec. 2003.

OGUNTOYINBO, F. A. Evaluation of diversity of *Candida* species isolated from fermented cassava during traditional small scale gari production in Nigeria. **Food Control**, Guildford, v. 19, n. 5, p. 465-469, May 2008.

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

OMAR, N. B.; AMPE, F. Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3664-3673, Sept. 2000.

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**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 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.

OYEWOLE, O. B. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. **Food Control**, Guildford, v. 8, n. 5/6, p. 289-297, Oct./Dec. 1997.

PADONOU, S. W.; NIELSEN, D. S.; HOUNHOUIGAN, J. D.; THORSEN, L.; NAGO, M. C.; JAKOBSEN, M. The microbiota of Lafun, an African traditional cassava food product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 133, n. 1/2, p. 22-30, July 2009.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; OLIVEIRA, L. L. **Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos**. 2. ed. Juiz de Fora: EPAMIG, 2001. 234p.

PINA, C.; TEIXEIRO, P.; LEITE, P.; VILLA, M.; BELLOCH, C.; BRITO, L. PCR-fingerprinting and RAPD approaches for tracing the source of yeast contamination in a carbonated orange juice production chain. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 5, p. 1107-1114, May 2005.

RAMOS, C. L.; ALMEIDA, E. G.; PEREIRA, G. V. M.; CARDOSO, P. G.; DIAS, E. S.; SCHWAN, R. S. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 2010. No prelo.

SAJEDI, R. H.; NADERI-MANESH, H.; KHAJEH, K.; AHMADVANDI, R.; RANJBAR, B.; ASOODEH, A.; MORANDIAN, F. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 36, n. 5/6, p. 666-671, Apr. 2005.

SANNI, A. I. The need for process optimization of African fermented foods and beverages. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 18, n. 2, p. 85-95, Apr. 1993.

SCHWAN, R. F.; ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; JESPERSEN, L. Yeast diversity in rice cassava fermentations produced by the indigenous Tapirape people of Brazil. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 7, n. 11, p. 966-972, Dec. 2007.

SCHWAN, R. F.; MENDONÇA, A. T.; SILVA, J. J.; RODRIGUES JUNIOR, V.; WHEALS, A. E. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 79, n. 1, p. 47-50, Jan. 2001.

SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F.; DIAS, E. S.; WHEALS, A. E. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 60, n. 2/3, p. 251-260, Sept. 2000.

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

SIPICZKI, M. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinina* and *Candida stellata*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v. 44, n. 6, p. 471-479, Dec. 2004.

TAMIME, A. Y.; O'CONNOR, T. P. Kishk: a dried fermented milk/cereal mixture. **International Dairy Journal**, Barking, v. 5, n. 2, p. 109-128, 1995.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of 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**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322

WU, X.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a group specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 107-119, Jan. 2006.

YEATES, C.; GILLINGS, M. R.; DAVISON, A. D.; ALTAVILLA, N.; VEAL, D. A. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. **Biological Procedures Online**, Bethesda, v. 1, p. 40-47, May 1998.