

**IDENTIFICAÇÃO DOS MICROGANISMOS
PRESENTES EM BEBIDA FERMENTADA
PRODUZIDA PELOS ÍNDIOS TAPIRAPÉ**

EUZICLEI GONZAGA DE ALMEIDA

2005

EUZICLEI GONZAGA DE ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES EM
BEBIDA FERMENTADA PRODUZIDA PELOS ÍNDIOS TAPIRAPÉ**

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

Orientador:

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

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

Almeida, Euziclei Gonzaga de.

Identificação dos microrganismos presentes em bebida
fermentada produzida pelos índios Tapirapé / Euziclei Gonzaga de
Almeida. – Lavras : UFLA, 2005.

74 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras,
2005.

Orientador: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Tapirapé. 2. Tampi'itãwa. 3. Bebida fermentada. 4. Cauim. 5.
Microrganismo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD - 576.163
- 663.13

EUZICLEI GONZAGA DE ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS PRESENTES EM
BEBIDA FERMENTADA PRODUZIDA PELOS ÍNDIOS TAPIRAPÉ**

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

APROVADA em 3 de março de 2005

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

UFLA

Profa. Dra. Ivana A. Silveira

UNILAVRAS

Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

*A minha mãe Edmunda, pelas orações e conselhos.
A meu pai Rômulo, in memoriam, pela criação.
A todos os meus irmãos e familiares.
A minha esposa e filho.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos dispensadas a mim e a meus familiares e por ter concedido força e saúde para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão de bolsa de estudos, sem o qual não atingiria meu objetivo.

Em especial, à professora Rosane Freitas Schwan, pela oportunidade e confiança para a realização deste curso. Expresso meus sentimentos de alegria e felicidade por estar atingindo objetivo tão almejado.

Aos professores Marcelo Nivert e Herena Naoco, que me fizeram sonhar e acreditar na possibilidade de realizar este sonho, pelo contato estabelecido com a profa. Rosane pelo incentivo e apoio.

À minha mãe, Edmunda e meus irmãos, que sempre acreditaram e apoiaram as minhas decisões. À minha esposa e filho, que me acompanharam nesta jornada, pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência.

A meus amigos TAPIRAPÉ, que autorizaram e contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, a meus amigos e informantes, cacique Xywaeri José Pio e família, que não mediram esforços para contribuir durante a preparação e coleta das amostras. Obrigado pelo tempo e dedicação a mim dispensados.

Às “Irmanzinhas de Jesus”, pelas informações e substrato cedido para realização da coleta.

A meus amigos, Prefeito Roberto Rempel e Maria Antônia, pelo apoio e compreensão; Pedro Martins e João Paulo, pelo companheirismo e ajuda durante coleta.

Aos funcionários do DBI/UFLA Irondina, Rosângela, Rafaela, Lamartine, Zélia, Soraya, Solange e Antônio.

Em especial à secretária de Pós-Graduação Magda, pelo companheirismo e prestatividade no desempenho de sua função. A meus amigos, colegas e companheiros de Laboratório: Ivani, Aramália, Fernanda, Claudineli, Cláudia Eugênia, Cristina, Luís, Raquel, Luana, Sheila, Márcio, Mirian, Valdirene, Evânia, Félix, João Borges, Débora, Whasley, Márcia, Ana Paula, Luziane, Claudinha, Léo, Leandro, Carla, Grazielle, Danielle, Helson, Victor, Jaíne, Cláudia Nogueira, Milena e Fábio.

À minha amiga e companheira Cidinha, pelos ensinamentos, conselhos, dedicação e empenho durante realização desse trabalho, e pela incansável batalha durante identificação das leveduras e análises em cromatografia.

Aos meus companheiros de luta, Caio, Helton, Gabriela e Adriene, que estiveram sempre presentes lado a lado na elaboração das etapas que completam este trabalho. Podemos comemorar juntos.

Gostaria também de agradecer aos professores Eustáquio e Romildo (Microbiologia), Roberta, Carlos Pimenta, Alexandre (Ciência dos Alimentos), às funcionárias Cleuza e Sandra, pelas análises físico-químicas, e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa. Agradeço a todos, de coração.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Alimentos fermentados.....	3
2.2 Histórico da fermentação.....	3
2.3 Alimentos fermentados produzidos por populações indígenas.....	8
2.4 População indígena do Brasil.....	14
2.5 O povo Tapirapé.....	15
2.6 Alimentos fermentados produzidos pelos índios Tapirapé.....	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Área de estudo.....	24
3.2 Contato e permissão para ir à tribo.....	24
3.3 Substratos utilizados.....	24
3.4 Preparo da bebida.....	25
3.5 preparação do cauim não fermentado.....	26
3.6 Fermentação do cauim cozido.....	26
3.7 Coleta das amostras.....	27
3.8 Armazenamento e transporte das amostras.....	28
3.9 Reativação e diluição dos microrganismos.....	28
3.10 Plaqueamento em meios de cultivo.....	28
3.11 Determinação dos açúcares solúveis totais (AST).....	29
3.12 Determinação da Proteína Bruta (PB).....	29
3.13 Determinação do amido.....	29
3.14 Determinação do pH.....	29
3.15 Determinação da acidez titulável (ATT) e °Brix.....	30

3.16 Contagem e classificação morfológica das colônias.....	30
3.17 Isolamento dos morfotipos.....	30
3.18 Purificação das colônias isoladas.....	31
3.19 Identificação das espécies microbianas.....	31
3.19.1 Identificação de bactérias.....	31
3.19.1.1.2 Identificação de bactérias gram-negativas.....	31
3.19.1.2 Identificação de bactérias gram-positivas.....	32
3.20 Identificação de fungos leveduriformes.....	38
3.21 Análises cromatográficas para carboidratos (sacarose, glicose, frutose e maltose) e ácidos orgânicos (lático e acético).....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Classificação morfológica.....	41
4.2 Análises físico-químicas.....	42
4.2.1 pH.....	42
4.2.2 °Brix.....	44
4.2.3 Proteína bruta, amido, açúcares totais, glicose e sacarose.....	45
4.2.3.1 Proteína bruta.....	45
4.2.3.2 Amido.....	47
4.2.3.3 Açúcares totais, glicose e sacarose.....	49
4.2.3.4 Ácido lático e ácido acético.....	52
4.4 Identificação dos microrganismos.....	55
5 CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

RESUMO

ALMEIDA, Euziclei Gonzaga de. **Identificação dos microrganismos presentes em bebida fermentada produzida pelos índios Tapirapé.** 2005. 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Os índios Tapirapé da tribo Tapi'itãwa, produzem vários alimentos fermentados, dentre estes, encontra-se a bebida chamada “cauim”. Estes índios vivem próximos à cidade de Confresa no Estado de Mato Grosso. O cauim é geralmente usado como principal alimento pelos pais e crianças até os dois anos de idade. Para a elaboração do cauim pode-se utilizar como substrato várias fontes de carboidratos tais como: arroz, mandioca, milho, amendoim e outros. De modo geral o processo fermentativo é realizado em batelada simples. Para o preparo do cauim, utilizam a saliva como fonte de inóculo, através da mastigação da batata-doce, que é adicionada ao recipiente de preparação como fonte de inóculo. Os microrganismos envolvidos no processo de fermentação e a sua atividade metabólica ainda não são conhecidos, sendo este o principal objetivo deste estudo. O processo de fermentação da bebida preparada a partir do substrato de arroz e mandioca foi acompanhado com análises microbiológicas e químicas. No início da fermentação, a população de bactérias presentes nas amostras coletadas foi de $7,9 \times 10^9$ UFC / mL e de leveduras foi de $3,2 \times 10^4$ UFC / mL. No entanto, a partir de 12 horas até o final da fermentação, a população de leveduras aumentou atingindo $6,9 \times 10^7$ UFC / mL. De 355 microrganismos isolados e identificados quanto ao gênero e espécie, 132 foram de leveduras e 223 de bactérias. Dentre os isolados bacterianos, 215 foram Gram positivos e 8 Gram negativos. Os gêneros de leveduras mais frequentes foram: *Candida*, *Cryptococcus*, *Lypomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* e *Trichosporon*. O pequeno número de isolados de bactérias Gram negativas foram representados pelas espécies de *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter agglomerans*; *Pseudomonas maltophilia*; *Serratia plymuthica*. Entre as bactérias Gram positivas os gêneros mais encontrados foram: *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Paenibacillus*. Houve um predomínio das espécies *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum* em todas as amostras analisadas. Os valores de pH variaram de 3,8 a 4,9 nas amostras coletadas, semelhantes ao observado em bebidas de fermentação láctica. Foi observado um aumento nas concentrações de glicose, sacarose e maltose no decorrer do processo fermentativo para elaboração do cauim. A concentração de frutose decresceu durante a fermentação e variou de 68,68µg/mL na amostra SF(Sem

* Orientadora: Rosane Freitas Schwan - UFLA

Fermento) a 24,9µg/mL na amostra (T48) após 48 horas de fermentação. Maltose foi o açúcar que apresentou concentração mais elevada após 36 horas de fermentação. Verificou-se também a aumentos nas concentrações de acidez titulável, ácido lático e de ácido acético após 48 horas de fermentação.

ABSTRACT

ALMEIDA, Euziclei Gonzaga de. **Identification of microorganisms presents in fermented beverage produced by Tapirapé indians.**

The Tapirapé Indians from the tribe Tapi'itãwa produced several fermented foods including the beverage called "cauim". These amerindians live near Confresa town in the state of Mato Grosso. Several substrates can be used to prepare cauim, such as: rice, cassava, corn, peanuts among others. The fermentative process used was simple batch. Mastication of sweet potato and saliva are used as source of inoculum during the elaboration of the beverage cauim. The microbial load and their role during the fermentative process of cauim are not known, so their identification was the main aim of this study. The fermentative process of the beverage prepared with cassava and rice was evaluated with microbial and chemical analyses. The bacteria population was of 7.9×10^9 CFU/ mL and yeasts population were of 3.2×10^4 CFU/ mL in the first hour of the fermentation. However, after 12 hours of fermentation it was observed an increased in the yeast population, which reached 6.9×10^7 CFU/ mL. From a total of 355 microorganisms isolated and identified to genus and specie level, 132 were yeasts and 223 of bacteria. Among the bacteria, 215 belonged to Gram positive group and 8 to Gram negative. The yeast genus more frequently isolated was: *Candida*, *Cryptococcus*, *Lypomyces*, *Pichia*, *Debaryomyces* and *Trichosporon*. The small number of Gram negative bacteria was represented by the following species: *Enterobacter cloacae*; *Enterobacter agglomerans*; *Pseudomonas maltophilia*; *Serratia plymuthica*. *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* e *Paenibacillus* were the genus more frequently isolated among the Gram positive bacteria. There was a dominium of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* in all samples analyzed. The pH value varied from 3.8 to 4.9 during the fermentative process probably due to lactic acid fermentation. The chemical analyses showed that the sugars concentrations varied during the fermentative process. It was observed an increased in the concentrations of glucose, sucrose and maltose during the first 12 hours of elaboration of the beverage. Fructose concentration decreased during the fermentation process and varied from 68.68µg/mL in the samples without inoculum (SF) to 24.9µg/mL after 48 hours of fermentation. Maltose showed higher concentration after 36 hours of fermentation. There was an increase in acidity, lactic acid and acetic acid during the fermentation process.

*Advisor: Dr Rosane Freitas Schwan - UFPA

1 INTRODUÇÃO

A fermentação é técnica milenar, utilizada mesmo antes do nascimento de Cristo. Há relatos de que a utilização dessa técnica teve seu início na China, tendo sido depois difundida a outras nações, como Coréia, Japão e outros países orientais. Ela é mais intensamente utilizada na China e Japão, por se encontrar fortemente arraigada à cultura destes povos, e tem se conservado, passando de geração a geração. Atualmente, a fermentação é encontrada em todos os países, vilas, aldeias e cidades do mundo, como por exemplo, Estados Unidos, México, Indonésia e Brasil, que a utilizam para produzir vários tipos de alimentos e bebidas fermentadas.

Tribos indígenas, em várias partes do mundo, contribuíram para o aperfeiçoamento e utilização das técnicas fermentativas. Nos países asiáticos, vários estudos têm sido feitos com alimentos e bebidas fermentadas. Os produtos fermentados elaborados por vários povos indígenas tiveram suas técnicas de preparo estudadas, porém, pouco se sabe sobre alimentos e bebidas fermentadas indígenas no Brasil.

Nações não indígenas também fazem uso da fermentação para produzir alimentos e bebidas, o que a torna importante, por ser um dos mais velhos e econômicos métodos de produção e preservação de alimentos. Não se utiliza a fermentação somente para uso doméstico, rural ou urbano, mas também em escala comercial a partir do crescente aumento de consumo destes produtos e sua preferência no mercado consumidor.

Várias tribos indígenas brasileiras fazem uso da fermentação, como as da Amazônia (Araweté), do Xingu (kayapó) e demais regiões. Dentre estas, destaca-se a comunidade indígena dos Tapirapé. Sabendo-se que esta comunidade indígena utiliza a fermentação para produzir alimentos e bebidas,

realizou-se o estudo de levantamento na Aldeia Tapi'itãwa, para quantificar esses produtos. Para tal, são utilizados vários substratos como matéria-prima, como por exemplo: “cauim” de milho (verde), de arroz, mandioca (puba), amendoim, banana, semente de algodão, bacaba, abóbora e semente de banana brava. Estes processos de produção são totalmente empíricos e rudimentares, utilizando como fermento o líquido da mastigação da batata-doce que é adicionado ao recipiente de preparação da bebida para propiciar o desenvolvimento e proliferação dos microrganismos para desencadear os processos fermentativos.

As matérias-primas ou substratos utilizados nesses processos são coletados no campo ou cultivados pelos membros da aldeia em suas roças (culturas itinerantes). Dessa forma, valores e respeito são atribuídos à caça, pesca, coleta e agricultura, pois estes povos dependem destas relações para suprir suas necessidades.

Em busca de melhor entendimento do processo fermentativo para a produção da bebida fermentada “cauim” produzida pelos índios Tapirapé, este trabalho foi realizado objetivando-se isolar e identificar os microrganismos presentes durante a fermentação e caracterizar quimicamente a bebida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Alimentos fermentados

Os alimentos fermentados têm papel vital na história do desenvolvimento do homem, oferecendo grande variedade de sabores, aromas e texturas que enriquecem sua nutrição. Acredita-se que sua importância será ainda maior quando a população mundial alcançar de 8 a 12 bilhões de habitantes, já no século XXI. De modo geral, os alimentos e bebidas fermentadas podem ser produzidos e distribuídos a baixo custo (Steinkraus, 1996) e são de alto valor nutricional fornecendo calorias, proteínas, vitaminas e minerais a preços acessíveis para a maioria dos consumidores. Alguns alimentos fermentados já são industrializados atualmente e fazem parte da dieta da população de quase todo o globo, como, por exemplo: pão, queijos, iogurtes, vinagre e bebidas fermentadas (cerveja, vinho) e fermento-destiladas (uísque, cachaça, tequila).

2.2 Histórico da fermentação

Estima-se que o homem começou a utilizar as bebidas fermentadas há cerca de 30 mil anos. A produção de cerveja deve ter iniciado por volta de 8.000 a.C., o que ocorreu paralelamente aos processos de fermentação de cereais que se difundiram lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevada nas antigas sociedades estáveis. Há registros sobre a utilização da cerveja na Antiguidade entre os povos da Suméria, Babilônia e Egito. A bebida também foi processada por gregos e romanos durante o apogeu dessas civilizações (Filho et al., 2001).

Segundo relatos bíblicos, o vinho é um produto da fermentação, utilizado muito tempo antes do nascimento de Jesus Cristo. Na China, por volta de 2.300 a.C., já se produzia um vinho derivado do arroz, chamado “kiu”. No Japão, produzia-se a bebida alcoólica saquê proveniente da fermentação do

arroz. Na Ásia Central, o “koumis” é uma bebida preparada utilizando-se a fermentação alcoólica do leite de camelo ou de égua (Battcock & Azam-Ali, 1998).

Outras bebidas foram obtidas pelos povos primitivos a partir de sucos de frutas fermentadas, em sua maioria desenvolvidas de forma acidental (Museu do Índio 2004).

Segundo antropólogos e historiadores, não se conhece, em todo o mundo, nenhuma sociedade que não utilize a fermentação para a produção de alimentos ou bebidas. Ela tem sido aperfeiçoada desde os tempos remotos, a partir de erros e acertos, em tantas tentativas, não havendo conhecimento da necessidade da presença de microrganismos para desencadear os processos fermentativos (Gotcheva et al., 2000).

Fermentação é um dos métodos mais antigos e econômicos de produzir e preservar alimentos (Billings, 1998). O processo de fermentação é relativamente eficiente, com baixo requerimento de energia para a preservação, e aumenta o tempo de prateleira do produto final, diminuindo a necessidade do uso de refrigeração para a preservação de alimentos. Estas características são altamente apropriadas para a utilização em países em desenvolvimento e outras áreas onde o acesso a equipamentos sofisticados é mais difícil. De modo geral, os alimentos fermentados são populares em todo o mundo, mas, em algumas regiões, fazem parte da maioria da dieta básica de milhões de indivíduos (Billings, 1998).

Segundo Tortora et al., (2002), a fermentação é definida como qualquer processo metabólico que libere energia de açúcar ou outra molécula orgânica, não requer oxigênio ou outro sistema transportador de elétrons e usa uma molécula orgânica como acceptor final de elétrons.

Organismos aeróbios convertem a “glicose” em “piruvato” pela glicólise e, utilizando o oxigênio molecular, oxidam completamente o piruvato até CO_2 e H_2O . Na fermentação, o NAD^+ é regenerado a partir do NADH pela

redução do piruvato a lactato. Na glicólise, a desidrogenação de duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, derivadas de cada molécula de glicose, converte duas moléculas de NAD^+ em duas de NADH . A redução de duas moléculas de piruvato em duas de lactato regenera duas moléculas de NAD^+ ficando o processo global equilibrado, podendo continuar indefinidamente. Não há variação no estado de oxidação do carbono quando a glicose é convertida em lactato. Essa conversão gera duas moléculas de ATP para cada uma das glicoses consumidas. Um grande número de microrganismos fermenta a glicose e outras hexoses até lactato. Por exemplo, certos lactobacilos e estreptococos fermentam a lactose do leite em ácido láctico (Lehninger, 1993).

De acordo com esse mesmo autor, fermentação é um termo geral que significa degradação anaeróbica da glicose ou de outros nutrientes orgânicos em produtos variados (característicos para cada um dos diferentes organismos), com o propósito de obtenção de energia na forma de ATP. Trata-se da mais antiga forma de obtenção de energia das moléculas dos combustíveis orgânicos.

Por definição, fermentação é o processo de decomposição de substâncias orgânicas induzido por microrganismos ou por complexo de enzimas de origem microbiana, animal ou de plantas (Walker, 1998). Fermentação pode também ser descrita como mudanças bioquímicas provocadas pela atividade metabólica de microrganismos e ou enzimas na oxidação de carboidratos em ambientes aeróbicos, anaeróbicos ou parcialmente anaeróbicos (Walker, 1998).

Os microrganismos homofermentativos obrigatórios produzem mais de 85% de ácido láctico de glicose, assim com os heterofermentativos facultativos. Embora os homofermentativos obrigatórios não sejam capazes de fermentar pentoses ou gluconatos, enquanto que os heterofermentativos facultativos fermentam algumas dessas fontes de carboidratos. Os microrganismos heterofermentativos obrigatórios produzem gás (CO_2) a partir de glicose, ácido láctico e também produzem ácido acético e ou etanol (Hammes et al., 1991).

A temperatura ótima para crescimento de lactobacilos está entre 30°C e 40°C. Assim, encontram-se distribuídos no ambiente habitando produtos alimentícios de fonte animal e vegetal. Normalmente, habitam o trato intestinal de aves e de mamíferos, e raramente são patogênicos (Hammes et al., 1991).

O processo de fermentação que ocorre nos substratos pode agir de, pelo menos, cinco maneiras diferentes na elaboração de um alimento fermentado:

a – pelo enriquecimento da dieta dos povos pelo desenvolvimento de diversidade de sabores, texturas e aromas dos substratos alimentares (Steinkraus, 1996);

b - preservando os substratos pela presença de ácido lático, ácido acético, álcoois e fermentações alcalinas (Caplice & Fitzgerald, 1999; Blandino et al., 2003);

c - enriquecendo os substratos pela atuação microbiana com acréscimos de vitaminas, proteínas, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (Steinkraus, 1996);

d - promovendo a desintoxicação de alimentos pelo processo fermentativo (Holzapfel 1997);

e - diminuindo o tempo de cozimento dos alimentos (Steinkraus, 1996).

Acredita-se que quatro tipos de fermentação tenham sido responsáveis pela sobrevivência dos homens durante milênios, que são: a fermentação alcoólica (Steinkraus, 1983), a fermentação ácido-lática que também está relacionada com a salga (Steinkraus, 1979), a fermentação acética e a fermentação alcalina (Blandino et al., 2003). Fermentação alcoólica resulta na produção de etanol a partir de substrato fermentecível e as leveduras são os microrganismos predominantes neste tipo de fermentação. Como exemplo citam-se os vinhos e cervejas. A fermentação lática é principalmente realizada por bactérias do ácido lático e está envolvida nos processamentos de leite e derivados e também na fermentação de cereais. O grupo das bactérias acéticas

tem envolvimento na produção de vinagre e outras fermentações de vegetais e são responsáveis por converterem etanol em ácido acético na presença de excesso de oxigênio. As fermentações alcalinas geralmente ocorrem durante as fermentações de pescados e sementes comumente utilizadas como condimentos (Blandino et al., 2003).

Muitos alimentos tradicionais ou indígenas são normalmente produzidos por processos fermentativos naturais que, na maioria das vezes, podem envolver a mistura de culturas de bactérias, leveduras e ou fungos (Gotcheva et al., 2000). A maioria dos microrganismos encontrados em alimentos fermentados indígenas pode ser ingerida pelo homem (Steinkraus, 1996). Estes organismos, usualmente, produzem várias enzimas, como amilases, proteases, lipases e pectinases, entre outros, que permitem que os diversos grupos microbianos colonizem os mais diversos substratos e modifiquem o sabor preservando o alimento.

A preparação de muitos alimentos e bebidas indígenas e outros tradicionalmente fermentados, permanece, até os dias de hoje, como artesanal ou empírica. Eles são produzidos em casa, vilas ou em indústrias de pequena escala. Nas últimas duas décadas, tem-se pesquisado mais sobre os alimentos fermentados indígenas buscando melhorar a qualidade e estabilidade do produto (Steinkraus, 1996). Também em relação aos microrganismos envolvidos no processo de fermentação, tem-se utilizado a manipulação genética para a melhoria da qualidade e a eficiência da produção controlada de alimentos fermentados (Holzapfel, 1997).

Na obtenção de alimentos de origem fermentada, pelos indígenas ou população nativa principalmente das Américas e Austrália, ainda utiliza-se o processo de fermentação tradicional e empírico. Apesar dos avanços tecnológicos na área, ainda não existem informações disponíveis sobre os

microrganismos que estão envolvidos nos processos de fermentação da maioria dos povos indígenas (Gotcheva, 2000).

2.3 Alimentos fermentados produzidos por populações indígenas

A fermentação não é utilizada pelos orientais apenas para produzir bebidas, outros alimentos também são produzidos a partir de processos fermentativos, tais como: “tempeh”, “natto” e “molho de soja”. Estes alimentos se destacam entre os japoneses e chineses, pelos quais são produzidos e consumidos em maior escala e são utilizados em dietas alimentares, com o propósito de se controlar o ganho de peso excessivo (obesidade), dos quais os mais indicados e utilizados são o natto e o tempeh (Nout & Kiers, 2005, Beuchat, 1997). O molho de soja é consumido no mundo inteiro e é o ingrediente fundamental das dietas alimentares da Indonésia até o Japão. A cada ano são produzidos, industrialmente no Japão, mais de um bilhão de litros de molho de soja (Battcock & Azam-Ali, 1998). Outros alimentos, como “tofu” (Japão) e o “sufu” (China), conhecidos como “queijos de soja”, são produzidos também a partir da fermentação, porém, em menor quantidade que os citados anteriormente (Han et al., 2001).

Alguns produtos da fermentação são utilizados como condimento pelos orientais, tais como molho de peixe e massas. Em geral, o consumo desses alimentos e bebidas vem aumentando e se difundindo em todo o mundo (Beuchat, 1997). Além disso, os alimentos fermentados representam importante parte na dieta de muitos países do oeste da África, e são vistos como uma forma de introduzir variedade no consumo de matérias-primas, como mandioca, trigo e peixe. Na África, produtos fermentados de mandioca, como fufu, gari e agbelima, são os principais componentes da dieta de mais de 800 milhões de “Amoa-Awua” e, em algumas áreas do continente africano, a soja constitui 50% da dieta da população (Amoa-Awua et al., 1995; Battcock & Azam-Ali, 1998).

A diversidade dos alimentos fermentados consumidos é grande. Blandino et al. (2003) citam mais de 60 alimentos e bebidas fermentadas a partir de cereais. Beachau (1997) relacionou 65 alimentos fermentados indígenas a partir dos mais diversos substratos e microrganismos. Alguns alimentos produzidos a partir de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) encontram-se relacionados na Tabela 1 e algumas bebidas produzidas por outros povos indígenas de vários países de forma tradicional na Tabela 2. Mandioca é o quarto substrato mais utilizado em processos fermentativos indígenas depois de arroz, trigo e milho (Kimaryo et al., 2000).

A **agbelima** é produzida a partir da mistura de inóculo com raízes de mandioca descascadas e raladas, sendo largamente consumida em países como Ghana, Togo e Benin (Amoa-Awua et al., 1996). A microbiota predominante durante sua fermentação é constituída, dentre outros, por *Lactobacillus* spp (*Lb. plantarum*; *Lb. brevis*; *Lb. fermentum*; *Lb. salivarius*); *Leuconostoc mesenteroides* e *Streptococcus* spp; *Bacillus* spp. (Amoa-Awua et al., 1995). De acordo com esse mesmo autor, entre as bactérias do ácido láctico isoladas, apenas *Lb. plantarum* e *Lb. mesenteroides* estiveram presentes em larga escala após 96h de fermentação.

TABELA 1 Alimentos fermentados indígenas produzidos a partir de mandioca

Produto	Substratos	Microrganismos	Utilização	Região	Referencia
Agbelima	Mandioca	<i>Lactobacillus</i> spp; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; <i>Streptococcus</i> spp; <i>Bacillus</i> spp.	Massa tipo pão	Gana, Togo e Benin	Amoa-Awua et al., 1996; Mante et al. 2003.
Kivunde	Mandioca	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Massa tipo pão	Tanzânia	Kimaryo et al.,2000.
Fufu	Mandioca	<i>Streptococcus lacticus</i> ; <i>Geotrichum candidum</i> ; <i>Corynebacterium manihot</i> ; <i>Lactobacillus</i> spp; <i>Leuconostoc</i> spp.	Pasta	Nigéria	Oyewole & Odunfa, 1990.
Gari	Mandioca	Bactérias do ácido láctico; <i>Alcaligenes</i> ; leveduras.	Farinha	Nigéria, Oeste da África	Steinkraus, 1996, Beuchat, 1997.
Tape ketela	Mandioca e arroz	<i>Aspergillus rouxii</i> ; <i>Endomycopsis</i> sp.	Pasta ligeiramente alcoólica e agridoce	Indonésia	Steinkraus, 1996.

TALELA 2 Bebidas fermentadas indígenas, conhecidas no mundo e descritas

Produto	Substrato	Microrganismo	Bebida	Região	Referência
Chicha	Milho	Bactérias do ácido láctico e leveduras	Bebida alcoólica	América Latina; Venezuela; Equador, Peru; Bolívia; Colômbia; Argentina	Beuchat, 1997, Steinkraus, 1996
Tepache	Milho e frutas	Leveduras	Bebida alcóolica	México	Moreno-Terrazas et al., 2001
Boza	Milho, trigo e arroz	Leveduras e bactérias lácticas	Bebida não alcóolica	Bulgária	Blandino et al. 2003
Sobia	Trigo	Leveduras e bactérias lácticas	Bebida não alcóolica	Arábia Saudita	Gassem, 2002
Pulque	Agave	Leveduras e bactérias do ácido láctico	Bebida alcóolica	México	Steinkraus, 1996

A **chicha** é uma bebida alcoólica amarelada, clara, efervescente com sabor semelhante ao da sidra. chicha é produzida na região dos Andes a partir da fermentação do milho e é consumida em vários países da América Latina. No processo de preparação desta bebida, a saliva serve de fonte de amilase para a conversão do amido em açúcares fermentescíveis (Steinkraus et al., 1983). O milho é mastigado, e então, colocado para secar ao sol, sendo depois misturado com água para dar início ao processo de fermentação. Leveduras, em particular *Saccharomyces cerevisiae*, bactérias do ácido láctico pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, bactérias do ácido acético (*Acetobacter* sp.) e várias espécies de fungos filamentosos formam a mistura de microrganismos envolvidos neste processo de fermentação (Blandino et al., 2003).

Tepache é o nome dado a uma série de bebidas fermentadas refrescantes preparadas, cuja tradição tem origem pré-hispânica. É preparada a partir de grãos de milho e ainda hoje é bastante consumida no México. Tem diversas modalidades de preparação e suas características influenciadas por variação no solo, de acordo com a origem da matéria-prima processada e também pelos diversos tipos de microrganismos responsáveis pela fermentação. Na parte central do México, é produzida a partir de frutas, principalmente abacaxi e outras frutas, como a maçã e laranja, que são fermentadas em água adoçada por açúcar mascavo ou marrom. Nesta região, as fermentações são preparadas em recipiente tipo barril de madeira chamado “tepacheras”. Leveduras dominam a fermentação, sendo encontradas *Saccharomyces cerevisiae*, *Kloeckera africana* e *Candida intermedia* (Moreno-Terrazas et al., 2001).

Boza é uma bebida tradicional da Bulgária, produzida à base de cereais, que se caracteriza pelo seu agradável sabor doce meio azedado, como sabor de pão. É também consumida em algumas regiões da Turquia, Albânia e Romênia. Os principais cereais usados na sua preparação são o trigo, o milho e o arroz. A fermentação é causada pela mistura de leveduras e bactérias ácido-láticas (BAL)

numa proporção de BAL/leveduras de 2/4 (Blandino et al., 2003). As bactérias do ácido láctico encontradas foram das seguintes espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus copriphilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc Raffinolactise* e *Leuconostoc brevis* (Blandino et al., 2003). As leveduras encontradas durante a elaboração de “boza” foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Geotrichum peniicilatum* e *Geotrichum candidum* (Gotcheva et al., 2000).

O **pulque** é uma bebida das regiões hispano-americanas, principalmente México. É produzida a partir da fermentação natural do suco de agave (agave americana), que chega a ter cerca de 6% de álcool. No consumo, às vezes, são adicionados mel e sucos de frutas. Pulque é uma importante fonte de vitaminas para a população mexicana. O conteúdo de vitaminas aumenta, durante a fermentação, de 5 para 29µg/100mL de tiamina, 54 para 515µg/100mL de niacina e 18 para 33µg/100mL de riboflavina (Steinkraus, 1996). Escalante et al. (2004) identificaram a população bacteriana envolvida na fermentação de pulque utilizando sequenciamento do 16S rDNA, tendo sido identificadas as seguintes bactérias: *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. kefir*, *Lb. acetotolerans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. plantarum*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Microbacterium arborescens*, *Flavobacterium johnsoniae*, *Acetobacter pomorium*, *Gluconobacter oxydans* e *Hafnia alvei* (Escalante et al., 2004). Leveduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* e *S. carbajali*, também participam do processo de fermentação de agave na elaboração de pulque (Steinkraus, 1996).

A **sobia** é uma bebida fermentada, tradicionalmente preparada na província oeste da Arábia Saudita. A preparação de sobia se dá com a mistura de trigo e farinha de malte. Amostras de sobia revelaram grande quantidade de bactérias, dentre essas, algumas acidoláticas que se encontraram variando entre 4,17 a 8,09 log UFC/mL, respectivamente. Leveduras e fungos também são

encontrados, variando de 3,96 a 5,87 log UFC/mL. A contagem de coliformes ficou entre 0,67 a 3,84 log UFC/mL. A acidez da bebida expressa pelo percentual de ácido láctico varia de 0,04% para 0,30%, enquanto o pH das amostras varia de 3,37 a 5,53. Bactérias do ácido láctico encontradas na fermentação de sobria são pertencentes às seguintes espécies: *Lactobacillus cellobiosus*; *Lb. Buchneri*; *Lb. Plantarum*; *Lb. Brevis*; *Lb. delbrueckii delbrueckii*; *Leuconostoc lactis* e *Pediococcus pentosaceus*. Coliformes também foram detectadas nas amostras e consistiram de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. sakazakii*, *E. cloacae* e *Serratia liquefaciens*. A população leveduriforme compreendeu as seguintes espécies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *C. ciferrii*, *C. guilliermondii*, *C. lipolytica*, *Kloeckera japonica* e *Rhodotorula rubra*. Todos os fungos filamentosos isolados foram identificados como sendo pertencentes ao gênero *Penicillium* (Gassem, 2002).

2.4 População indígena do Brasil

Os índios no Brasil se encontram distribuídos em 562 terras indígenas, totalizando cerca de 315.000 índios. São 206 povos (ou etnias), concentrados, em sua maioria (70% do total), numa parcela da Amazônia Legal que engloba seis estados: Amazonas, Acre, Roraima, Rondônia, Mato Grosso e Pará. Além desses, deve-se considerar a existência de 40 povos isolados na Amazônia Ocidental. O estado do Amazonas é onde está a maior concentração de etnias; já no estado de Mato Grosso, são encontrados cerca de 32 povos indígenas (Museu do Índio, 2005).

Atualmente, a maior parte das sociedades indígenas faz uso de alimentos e produtos industrializados introduzidos pelos não índios após o contato entre eles. Nos casos em que isso ocorre, os membros da sociedade passam a precisar de dinheiro para adquiri-los, o que os leva a buscar trabalho remunerado ou a

procurar comercializar seus produtos, inserindo-se dessa forma no mercado regional (Museu do Índio, 2005).

2.5 O povo Tapirapé

Os índios Tapirapé habitaram a área localizada entre os rios Tocantins e Xingu até o século XVII. Depois, por volta da segunda metade do século XVIII sua presença foi anotada ao norte do rio Tapirapé (Baldus, 1979).

Atualmente habitam duas áreas indígenas, a Tapirapé/Karajá, com 66.166 ha, que foi homologada em 1983, sendo constituída de indivíduos Tapirapé e Karajá, e a Urubu Branco, com extensão de 167.533 ha e homologada em 1998, onde vivem apenas índios Tapirapé. Nessa área existem quatro aldeias que se organizam da seguinte forma: uma funciona como aldeia sede e as outras três estão anexadas a elas. Cada aldeia tem seu cacique comprometido com sua comunidade de forma coletiva (3º Grau Notícias, 2005).

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

Em 1900, os Tapirapé totalizavam aproximadamente 1.500 índios habitando cinco aldeias localizadas próximas à margem esquerda do Araguaia (Wagley, 1988). Essa comunidade pertence ao tronco lingüístico tupi-guarani e totaliza, atualmente, um número aproximado de 650 integrantes (3º Grau Notícias, 2005).

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

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

Os Tapirapé habitam uma região de floresta tropical, com flora e fauna tipicamente amazônicas. Por serem agricultores, coletores, caçadores e pescadores, suas aldeias ficam próximas a densas florestas em terrenos altos e inundáveis (Kidlink, 2005).

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

Para o povo Tapirapé, a cultura tem significado mítico e histórico, sendo repassada de uma geração a outra (Museu do índio, 2005). Este mesmo autor afirma que, para os Tapirapé, os animais, as plantas, os rios e os córregos têm alma, como se fossem membros da aldeia. Dessa forma, respeito e valores são atribuídos à caça, à pesca, à coleta e à agricultura, fazendo com que estas populações tradicionais da Amazônia tenham relações íntimas e de profunda familiaridade com o meio ambiente. Os sistemas culturais têm um papel importantíssimo na comunidade Tapirapé, facilitando a utilização e preservação dos recursos naturais para fins culturalmente apropriados.

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

De acordo com o levantamento feito pelos alunos da escola Tapirapé em 1988, o grupo coletava 47 espécies de frutas silvestres que eram utilizadas como importantes fontes de alimentos. Estes índios possuem profundo conhecimento botânico da região e aproveitam as espécies vegetais úteis e vitais à sua subsistência. Essas coletas são realizadas em conjunto com a pesca, coleta de ovos de tartarugas, frutas silvestres, mel e cocos e explorando as matas de galerias das proximidades. (Kidlink, 2005).

Alguns tabus alimentares desapareceram por completo da cultura Tapirapé. Isto se justifica diante do processo de aculturação pelo qual passaram ou, mesmo, devido à escassez de caça e peixes na região onde se encontra a reserva. Segundo Toral (1994), a relação é basicamente a mesma anotada por Wagley (1988) e a única ressalva a se fazer é que, devido à escassez da carne verificada nos dias de hoje, a maioria das espécies interditadas devido a tabus alimentares, como espécies de veado e tatu, teve seu consumo atualmente permitido a sexos e grupos etários aos quais, até a década de 1940 e 50, eram proibidos.

Toral (1994) afirma que o abandono do sistema tradicional e o esgotamento dos terrenos próximos à área de refúgio para onde foram transferidos no início da década de 1950 fizeram com que o rendimento da agricultura fosse muito reduzido. Atualmente, as espécies mais cultivadas são: mandioca para a fabricação de farinha; milho, arroz, banana, mamão, mandioca mansa, aipim, cará, batata-doce, abóbora, amendoim, andu (tipo de feijão),

algodão e outras espécies menos importantes. Próximo às casas mantêm-se pés de urucum e mangueiras. Quanto à fonte de proteína, devido ao seu valor na alimentação, as espécies preferidas pelos Tapirapé são: o porco-queixada, porco-caetetu, paca, cotia, tamanduá-bandeira, jabuti, quati, macaco-prego, tartaruga e seus ovos, tracajá e seus ovos, veado-campeiro, veado-mateiro, tatu, guariba, anta e pato-do-mato, dentre outros.

Após o nascimento de uma criança na tribo Tapirapé, tanto a mulher quanto o marido seguem a dieta pós-parto, que é baseada no consumo da bebida cauim fermentado. Segundo Wagley (1988), após o nascimento de uma criança, a mãe deve tomar somente cauim durante todo o primeiro mês. Depois, pode escolher um tipo de proteína animal (tartaruga ou peixe) que comerá, com cauim, durante o segundo mês. No terceiro mês da dieta, escolherá outra proteína. Conseqüentemente, ao introduzir uma fonte de proteína, poderá continuar a dieta caso a criança não venha a passar mal. Caso aconteça e seja apontado pelo curador, terá que retornar ao início da dieta em ambos os casos. Por outro lado, o pai tem a liberdade de tentar uma dieta normal e, se nada acontecer à criança, poderá continuar. Caso contrário, deverá acompanhar a dieta da mãe.

Os festivais e rituais se encontram arraigados à cultura Tapirapé. Em destaque, encontram-se a cauinagem e o kawió. O primeiro – cauinagem – é geralmente produzido para festejar a chegada da colheita, em agradecimento à boa produtividade da mãe terra, em virtude das chuvas ocorridas. O mais importante neste festival é que o anfitrião da festa oferece o que produziu em sua roça, compartilhando com todos os membros da aldeia (Wagley, 1988).

O kawió é um ritual de preparação de uma criança para o cargo de cacique. É uma bebida fermentada, obtida do grão de milho maduro, que tem objetivo diferente do cauim. Quando oferecida, esta bebida não pode ser ingerida, o que dá direito ao anfitrião de pedir um presente a quem está

oferecendo. Bebê-la é um ato de desrespeito, pois é um prestígio doar em vez de receber. Essa atitude impossibilita o acúmulo de bens nas mãos de um ou poucos índios, o que faz com que não exista diferença de classes sociais dentro da comunidade indígena. Dessa forma, não existe índio “rico” ou “pobre” dentro da aldeia (Wagley, 1988). A cultura Tapirapé foi e continuará sendo o mecanismo capaz de propiciar a harmonia e a sobrevivência destes povos da Amazônia, não somente sobrevivência física, mas, social, cultural, econômica e espiritual.

2.6 Alimentos fermentados produzidos pelos índios Tapirapé

Os índios do tronco lingüístico Tupi-Guarani fazem uso da fermentação na obtenção de grande variedade de alimentos e bebidas fermentadas. Para isso, diferentes substratos são utilizados como matéria-prima, destacando-se a mandioca, o arroz, o milho, o amendoim, a seiva de palmeiras e frutos, como o ananás e o caju (Instituto Camões, 2004). As técnicas utilizadas por estes índios envolvem processos naturais e rudimentares, comparados aos empregados nas indústrias de alimentos e bebidas no país ou no mundo. Mesmo assim, eles conseguem produzir bebidas a partir de várias fontes de carboidratos fermentescíveis.

Segundo Ampe et al., (2000), durante a fermentação, quando se utiliza a mandioca como substrato, o pH decresce rapidamente, igualando-se ao pKa do ácido láctico. Esses autores relataram que o lactato e o acetato são os metabólitos mais importantes encontrados nas amostras dos produtos da fermentação da mandioca, como, por exemplo, durante a obtenção do polvilho azedo.

De acordo com a variedade de mandioca utilizada no preparo da bebida, haverá variações no conteúdo de açúcares totais, proteínas e fibras. Porém, cultivares amargas de mandioca conhecida como ‘mandioca brava’ apresentam concentrações de açúcares totais e proteínas mais elevadas, possuindo baixos níveis de fibras (Padonou et al., 2004).

Por ser de origem brasileira, a mandioca já era utilizada pelos povos indígenas, mesmo antes da colonização; por isso, supõe-se que boa parte dos subprodutos de sua utilização foi herdada da cultura indígena. Alimentos, como a farinha de mandioca, o polvilho doce e azedo, dentre outros, contribuem com boa parte da dieta da população brasileira.

A diferença entre **polvilho doce e azedo** é determinada pelo teor de acidez. Para polvilho doce, o máximo permitido é de 1mL de solução de NaOH 1N por 100g de amostra e 5mL para o polvilho azedo (Nakamura, 1975). Na Figura 1 encontra-se um fluxograma de produção de polvilho azedo.

O bagaço acumulado durante a separação do leite de fécula é descartado e a fécula separada por decantação em tanques, planos inclinados ou por centrifugação (Cereda e Giaj-Levra, 1987). A fermentação pode ocorrer em cocho de madeira ou tanques de alvenaria revestidos ou não de azulejos, abertos ou fechados (Cereda, 1987).

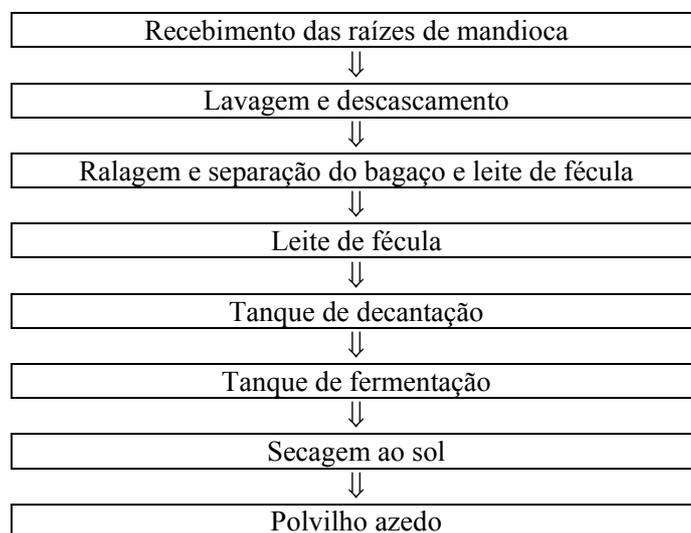


FIGURA 1 Fluxograma do processo de produção de polvilho azedo. Adaptado da Tese de Doutorado de Ivana Aparecida da Silveira, UFLA (2001).

Na fabricação da **farinha de puba**, as raízes de mandioca, após serem colhidas, são deixadas de molho com casca em água corrente dentro de sacos ou outro recipiente de madeira ou metal pelo período de três a quatro dias, período em que ocorre a liberação do ácido cianídrico das raízes. Após a pubagem (Wagley, 1988), as raízes ficam umedecidas e moles, permitindo a retirada das cascas. A massa é prensada e, em seguida, torrada em recipientes apropriados, obtendo-se, como produto, a farinha de puba.

São vários os substratos utilizados pelos índios Tapirapé para produzir bebida chamada “cauim”, tais como, arroz, mandioca, milho, amendoim, semente de algodão, bacaba, buriti, banana, abóbora, semente de bananeira brava e demais frutas fermentescíveis.

Quando o substrato do cauim é o arroz, este é utilizado já sem casca. Em seguida, ele é posto em água por cerca de 15 a 20 minutos, para hidratar. Retira-se a água para que o arroz possa ser triturado em pilão de madeira, obtendo-se a farinha de arroz.

A mandioca passa pelo processo de pubagem da mandioca, sendo, em seguida, transferida para um jirau de madeira ao sol, onde ocorre a desidratação da mesma. Depois de secas, obtém-se a farinha de mandioca triturada em pilão de madeira.

O processo de preparação da bebida é bem rudimentar e tradicional. Ao mesmo tempo em que os substratos são preparados, coloca-se água para aquecer até o ponto de fervura em uma panela, normalmente de alumínio. A fonte de calor para o aquecimento consta de um fogão rudimentar, feito com três pedras arranjadas de forma que a panela fique apoiada sobre elas. Após a água ser pré-aquecida, os substratos são adicionados. Primeiro adiciona-se a farinha de arroz e, em seguida, a farinha de mandioca para que sejam cozidas. Durante o cozimento toma-se o cuidado de misturar bem os substratos, utilizando-se para isso, uma colher de madeira, para que o cozimento ocorra de maneira

homogênea. Após o cozimento, o recipiente de preparação é retirado do fogo e deixado para esfriar à temperatura ambiente.

Desse ponto, o produto obtido do cozimento já é o “cauim”, que pode ser consumido antes ou após a fermentação. O “cauim fermentado” é obtido a partir da adição de fermento no “cauim cozido”. Este fermento vem da mastigação da batata-doce, o que é feito, normalmente, por uma índia jovem da tribo. O líquido da mastigação é adicionado aos poucos no recipiente de preparação da bebida. Deixa-se fermentar por 24 horas, para obter o produto final, “cauim fermentado”, já pronto para o consumo.

Em tribos do Xingu, no processo de preparação da massa (polvilho azedo) a mandioca é descascada e ralada. Depois, o polvilho é retirado deixando-o desidratar por uma noite. No dia seguinte, a massa está pronta para fazer o beiju. A massa é novamente peneirada, para ficar fina. Em seguida, um recipiente apropriado (de barro ou de alumínio) é colocado no fogo e, quando quente, a massa é posta sobre a mesma em finas camadas para cozimento. O processo não é demorado; uns dois minutos de cada lado e está pronto para ser consumido. Os indígenas costumam comê-lo com peixe ou outro tipo de carne (3º Grau Notícias, 2005).

Entre os índios Tapirapé, o processo é um pouco diferente. A mandioca passa por processo conhecido como “pubagem”. A massa obtida é posta pra secar, podendo ser armazenada ou preparado o beiju a partir dela. Quando a massa está seca, é só adicionar água e sal à massa, misturar, peneirar e fazer o cozimento, como descrito anteriormente (Almeida et al., 2004).

Os índios Tapirapé utilizam a fermentação para produzir alimentos e bebidas há muitos anos. Não se pode definir com precisão a data, mas, considerando que o homem utiliza várias espécies de leveduras há milênios na produção de pão, cerveja, vinho e outros, pode-se inferir que esta prática entre os Tapirapé seja bem antiga, passando de geração a geração.

A partir do levantamento feito sobre os tipos de alimentos e bebidas e as técnicas de preparo utilizadas por estes índios, houve interesse em conhecer quais microrganismos estavam envolvidos nos processos fermentativos e alguns dos metabólitos que são produzidos pela ação dos microrganismos fermentadores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi realizado junto ao povo Tapirapé, pertencente ao tronco lingüístico Tupi-Guarani, na aldeia Tapi'itãwa, situada próximo à Serra do Urubu Branco, distante 32 km do município de Confresa, MT, localizada 10,8° de latitude sul e a 51,3° de longitude oeste, no extremo norte do estado de Mato Grosso. A região tem clima equatorial quente e úmido (três a quatro meses secos), com vegetação de transição entre cerrado e floresta amazônica (Miranda & Amorim, 2000).

3.2 Contato e permissão para ir à tribo

A partir de contínuos contatos, favorecidos pela amizade e prestação de serviços por parte do Sr. Rômulo Xavier Almeida (*in memoriam*) que residiu em Confresa por longos anos foi possível ir à tribo. A partir daí foram feitos novos contatos e visita à aldeia Tapi'itãwa, para verificar com o Cacique a possibilidade da realização do trabalho. A autorização foi concedida a partir de um requerimento encaminhado à comunidade indígena Tapirapé, que foi entregue em mãos ao Cacique José Pio Tapirapé, que após uma reunião feita com os demais membros representantes da aldeia, deu o parecer legal, assinando o documento em duas vias. Uma cópia foi encaminhada à Fundação Nacional do Índio (FUNAI) para que a mesma tivesse conhecimento da realização deste trabalho na aldeia Tapi'itãwa.

3.3 Substratos utilizados

Para a preparação do cauim, foram utilizados a mandioca, o arroz (sem casca), a batata-doce e o açúcar. Esses componentes foram adicionados sem utilização de medidas. Raízes de mandioca (*Manihot esculenta*), cultivada pelos índios Tapirapé,

foram processadas por meio de pubagem e utilizadas como substrato para produção de cauim.

3.4 Preparo da bebida

A bebida foi produzida a partir da mistura dos substratos de arroz e mandioca. Durante a preparação, o arroz foi umedecido por 10 a 15 minutos, triturado em pilão até obter a farinha de arroz. A mandioca passou por um processamento de fermentação conhecido como pubagem. Foi deixada de molho em água corrente (ou parada) por três a quatro dias. A casca foi removida e posta ao sol para secar e, depois de seca, foi triturada em pilão. Inicialmente, adicionou-se a farinha de arroz no recipiente com água em aquecimento, iniciando o cozimento. A farinha de mandioca foi adicionada logo após a sua obtenção. Durante o cozimento, os substratos foram misturados com pá de madeira para propiciar cozimento uniforme (Figura 2). Esta mistura foi retirada do fogo após o cozimento, resultando no cauim cozido.



FIGURA 2. Cozimento da “farinha” de mandioca para produção da bebida fermentada cauim.

3.5 Preparação do cauim não fermentado

A bebida foi preparada de maneira bem rústica. O cozimento foi feito em fogão improvisado denominado ‘trempe’. Os substratos foram adicionados em água pré-aquecida e, durante o cozimento, mexeu-se com colher de madeira, permitindo o cozimento homogêneo dos substratos.

3.6 Fermentação do “cauim” cozido

Quando frio, adicionou-se o fermento (batata-doce) ao cauim cozido. Esse fermento foi obtido por meio da mastigação da batata-doce por uma índia (Figura 3). Em seguida, o fermento (mistura da mastigação) foi adicionado ao recipiente de preparação da bebida. Após a adição do fermento, a mistura (fermento com substrato) foi fermentada por 24 horas à temperatura ambiente,



FIGURA 3. Processo de inoculação da bebida fermentada cauim. Mastigação da batata doce para servir de inóculo.

obtendo-se o produto pronto para o consumo, chamado de cauim fermentado.

3.7 Coleta das amostras

Para cada amostra foram coletados 20mL do substrato cozido, que foi adicionado a um frasco contendo 150mL de H₂O peptonada (1% de peptona e 5% de NaCl), e 30ml de glicerol a 40% (autoclavados a 121°C/15 min). As coletas foram feitas em intervalos de 12 horas, a partir da adição do fermento.

Foram feitas seis coletas, denominadas: SF – sem fermentação; T0 – 0 hora após a adição do fermento, T12 – 12 horas após a adição do fermento, T24 – 24 horas após a adição do fermento, T36 – 36 horas após a adição do fermento, e T48 – 48 horas após a adição do fermento. De cada tempo foram coletadas duas amostras, denominadas de “A” e “B”.

3.8 Armazenamento e transporte das amostras

Após coleta, os frascos contendo as amostras foram lacrados, congelados e acondicionados em freezer (-20°C). Depois, foram transferidas para caixa de isopor contendo gelo seco e gelo úmido para serem transportadas.

As amostras foram mantidas congeladas até a reativação e plaqueamento das mesmas, num período não superior a 15 dias.

3.9 Reativação e diluição dos microrganismos

A reativação foi feita em meio caldo nutriente (CN) estéril. Para isso, cada amostra de substrato foi transferida para erlenmeyer contendo 90mL do meio. Cada erlenmeyer foi inoculado com 10ml do substrato descongelado e incubado em câmara BOD, a 28°C, por 24 horas. A partir da cultura pura reativada, foram preparadas diluições decimais.

3.10 Plaqueamento em meios de cultivo

Para a determinação da contagem total de bactérias, leveduras e fungos filamentosos foi utilizada uma alíquota de 100 µL de cada diluição em duplicata que, em seguida, foi espalhada com Alça de Drigalsky, utilizando-se a técnica de plaqueamento por superfície.

Para o isolamento dos microrganismos, foi utilizado meio yeast extract peptone glucose (YEPG) pH 3,5 (em g. L⁻¹: extrato de levedura 10,0; peptona 10,0; ágar 13,0; glicose 20,0) para crescimento de leveduras, de man rogosa sharpe (MRS) pH 6,0 (em g. L⁻¹: peptona bacteriológica 10,0; extrato de carne 8,0; extrato de levedura 4,0; glicose 20,0; monooleato de sorbitano (Tween 80) 1,0; K₂HPO₄, 2,0; acetato de sódio 3,0; citrato de amônia 2,0; sulfato de magnésio 0,01; sulfato de manganês 0,036) para crescimento de bactérias e batata dextrose ágar (BDA) pH 6,0 (em g. L⁻¹: batata 250; glicose 20,0; ágar 15,0) para crescimento de fungos filamentosos.

Foram feitas diluições seriadas de base 10 para o plaqueamento nos referidos meios de cultivo com as seguintes diluições: 10^3 , 10^4 e 10^5 , para o meio (YEPG pH = 3,5); 10^6 , 10^7 e 10^8 , para o meio MRS; 10^4 , 10^5 e 10^6 , para o meio BDA. As diluições e plaqueamentos foram feitos em câmara de fluxo laminar e as placas encubadas em BOD a 28°C durante 48 horas.

3.11 Determinação dos açúcares solúveis totais (AST)

Os açúcares solúveis totais foram extraídos com álcool etílico a 70% e determinados, por leitura em espectrofotômetro a 620nm, pelo método de Antrona (Dische, 1962). Os resultados foram expressos em % de glicose na bebida.

3.12 Determinação da proteína bruta (PB)

Foi calculada em função da concentração de nitrogênio total pelo método Kjeldahl, o qual baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra analisada em sulfato de amônio através da digestão com ácido p.a. e posterior destilação com liberação de amônia, que é fixada em solução ácida e titulada (Brasil, 2003).

3.13 Determinação do amido

O amido foi extraído quimicamente e doseado espectrofotometricamente segundo o método químico Somogy–Nelson (1944). A determinação foi feita a 620 nm e os resultados expressos em g de glucose por 100g da bebida fermentada indígena “cauim”.

3.14 Determinação do pH

O pH foi determinado no filtrado, utilizando-se potenciômetro Micronal modelo B474, segundo técnica estabelecida pela AOAC (1992).

3.15 Determinação da acidez total titulável (ATT) e °Brix

A acidez titulável foi determinada por titulometria com solução de NaOH 0,01 N, utilizando como indicador a fenolftaleína, sendo o resultado expresso em graus Dornic (°D) ou porcentagem de compostos com caráter ácido, como ácido láctico (Pereira et al., 2001).

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado no filtrado por refratometria, conforme normas da AOAC (1992), utilizando-se refratômetro digital ATAGO PR-1000, com compensação de temperatura automática e resultados expressos em °Brix.

3.16 Contagem e classificação morfológica das colônias

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo. Tais características incluíram: cor da colônia, tamanho, tipo de borda (lisa, irregular, aracnóide), estrutura (lisa, rugosa, côncava, convexa, achatada), com ou sem anel e demais características que se julgasse necessárias para a diferenciação dos morfotipos isolados.

Foi realizada contagem total dos morfotipos encontrados, identificando o tipo de meio cultivado, a amostra, a diluição e a duplicata.

3.17 Isolamento dos morfotipos

A partir da contagem total, foi escolhida, para morfologia de colônia, uma placa de cada meio e diluição, cuja contagem se encontrasse entre 30 e 300 colônias. O número de isolados que foram 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). Foram isoladas uma ou duas colônias de cada morfotipo em placa.

3.18 Purificação das colônias isoladas

Os isolados foram purificados por meio de sucessivas repicagens e as leveduras separadas de bactérias por meio de exame microscópico. Para certificação da pureza das bactérias, foram realizados testes pela técnica de coloração diferencial de Gram, descrita em Madigan et al. (2004) e Pelczar et al. (1996).

Todos os isolados bacterianos e leveduriformes foram transferidos para criotubos contendo YEPG (pH 6,0) líquido e acrescido de glicerol, em concentração final de 20%, e congelados a -80°C .

3.19 Identificação das espécies microbianas

3.19.1 Identificação de bactérias

Os isolados bacterianos foram repicados para placa com meio YEPG e incubados a 28°C , por 24 horas. A partir desse tempo, os isolados foram submetidos a testes de coloração de Gram e catalase. Pode-se, assim, subdividir os isolados em grupos (gram-positivos e gram-negativos), para a realização de testes específicos para a identificação das espécies.

3.19.1.1 Identificação de bactérias gram-negativas

Estes isolados foram identificados utilizando kits do sistema bac-tray I, II e III (Difco). Inicialmente, realizou-se o teste para detectar a presença ou ausência da enzima oxidase (cloridrato de N, N, N, N-tetrametil-p-fenilondiamina 1g; 100mL de H_2O).

Os isolados gram e catalase negativos foram inoculados no sistema bac-tray I e II e os gram-negativos e oxidase positivos nos kits do sistema bac-tray III. Cada kit bac-tray consiste de dez diferentes substratos contidos em um suporte de poliestireno descartável. As provas do sistema bac-tray I consistem de hidrólise da β galactosidase, deidrolação da arginina, descarboxilação da lisina,

descarboxilação da ornitina, produção de H₂S, presença de urease, produção de acetoína (VP), desaminação da fenilalanina, produção de indol e utilização de citrato. As reações do sistema bac-tray II foram: utilização do malonato, utilização de ramnose, adonitol, arabinose, inositol e sorbitol, sacarose, manitol e rafinose com produção de ácido.

Reações de tolerância à cetrimida, utilização de acetamida, elevação do pH por malonato citrato, utilização de maltose, hidrólise da esculina, controle de intensidade de cor para o teste de arginina, deidrolação da arginina, hidrólise da uréia e metabolização do triptofano resultando em indol, estão presentes no sistema bac-tray III.

Para a inoculação nas galerias do suporte, foi realizada uma suspensão da cultura bacteriana com 24 horas de incubação, em 3 mL de água destilada estéril, tomando-se o cuidado para não inocular muito material e evitar a turvação do meio. As galerias do bac-tray foram incubadas, por 18 a 24 horas, a uma temperatura de 28°C. A identificação das espécies foi determinada pela soma dos resultados positivos, conforme o manual do fabricante (DIFCO). Obtendo-se o código, determinou-se a espécie por meio da análise de um software ou catálogo.

3.19.1.2 Identificação de bactérias gram-positivas

Os isolados de bactérias gram-positivas foram submetidos a tratamento térmico (80°C/10 min. ou fervura por 1 min.) para induzir a esporulação, seguido da confecção de lâminas e de exame microscópico para certificar da ausência ou presença de esporos nos mesmos.

A partir dos resultados dos testes de coloração de Gram, motilidade, catalase, oxidase e produção de ácido e gás a partir da glicose, os isolados foram separados em grupos que foram submetidos a provas bioquímicas estabelecidas para cada grupo que foram utilizadas para identificar os isolados quanto ao

gênero e espécie. O esquema da figura 4 mostra um agrupamento utilizado para identificação das cepas isoladas.

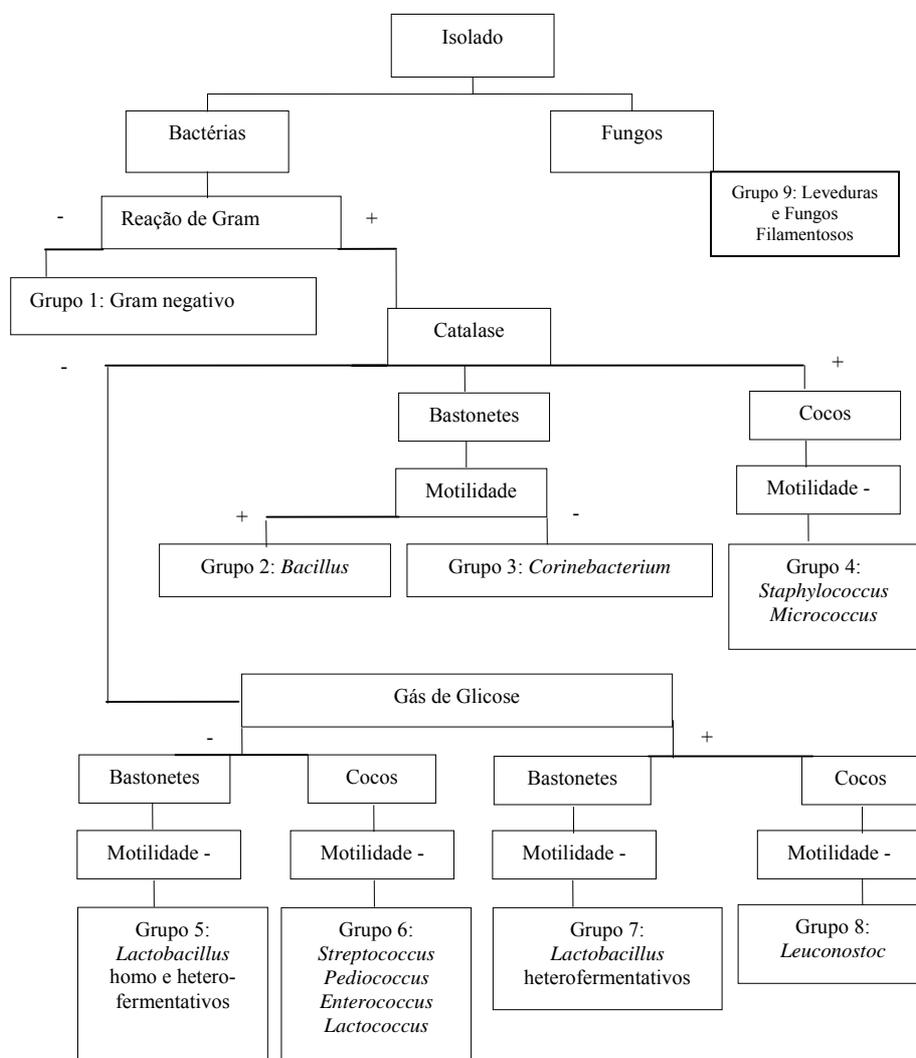


FIGURA 4 Esquema de agrupamento e classificação dos microrganismos, adaptado da Tese de Doutorado de Ivana Aparecida da Silveira, UFLA (2001).

Grupo 1 Bacilos gram-negativos

Após classificação preliminar (oxidase e reação em TSI e LIA), culturas de 24 horas foram inoculadas em galerias dos sistemas API 20E e 20NE (Bio Mérieux), para identificação.

Grupo 2 Bacilos gram-positivos, catalase positiva e motilidade positiva

Foram identificados segundo tabelas e chaves diferenciais propostas por Slepecky e Hemphill (1991). As principais provas diferenciais utilizadas foram motilidade a 37°C, redução do nitrato, O-F glicose, indol, liquefação de gelatina a 22°C, citrato de Simmons, Voges-Proskauers (VP), uréia, fenilalanina desaminase, fermentação de fontes de carbono (glicose, manitol, arabinose e xilose), crescimento em NaCl 7,5% e hidrólise de amido. Também foi verificada a presença com formação de esporos por meio da técnica de coloração de esporos (Ribeiro e Soares, 1993). A confirmação da identificação foi feita por meio do sistema API 50CH e provas complementares do API 20NE (Bio Mérieux)

Grupo 3 Bastonetes curtos (cocobacilos) gram-positivos, catalase positiva, motilidade negativa

Após verificação da ausência de esporos, foram realizados testes propostos por Macfaddin (1980), seguidos de confirmação de identificação por meio do sistema API Coryne (Bio Mérieux). Os testes realizados foram: redução do nitrato, produção de enzimas (pirazinamidase, pirrolidonil arilamidase, fosfatase alcalina, beta-glucoronidase), esculina, uréase, hidrólise de gelatina, fermentação de fontes de carbono (glicose, ribose, xilose, manitol, maltose, lactose, sacarose) e catalase.

Grupo 4 Cocos gram-positivos, catalase positiva e motilidade negativa

Para a identificação dos microrganismos, foram realizadas as seguintes provas: oxidase, redução do nitrato, motilidade, O-F glicose, crescimento em NaCl 5%, 10% e 15%, fermentação de glicose em aerobiose e anaerobiose, fermentação de manitol em aerobiose e anaerobiose, coagulase (em tubo), liquefação de gelatina a 22°C, arginina deidrolase, H₂S₂ Voges-Proskauer (VP) e DNase.

Grupo 5 Bacilos gram-positivos, catalase negativa, motilidade negativa e sem produção de gás a partir da glicose

Os microrganismos desse grupo foram agrupados de acordo com características fisiológicas (homofermentativos ou heterofermentativos facultativos), segundo tabelas e chaves diferenciais propostas por Hammes, Weiss e Holzapfel (1991). As principais provas utilizadas foram: crescimento a 15°C, produção de NH₃ a partir da arginina, fermentação de fontes de carbono (amigdalina, celobiose, galactose, lactose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose, salicina, sacarose, trealose, arabionose, esculina, melezitose, ribose, sorbitol e xilose). Uma vez agrupados, a identificação desses microrganismos foi realizada por meio do sistema API 50CHL (Bio Mérieux).

Grupo 6 Cocos gram-positivos, catalase negativa e motilidade negativa, sem produção de gás a partir da glicose

Esses microrganismos foram classificados, agrupados e identificados de acordo com o gênero, de acordo com tabelas e chaves citadas por Holt et al. (1994). Os principais testes foram: crescimento a 10°C e 45°C, crescimento em pH 9,5, crescimento em NaCl 6,5%, crescimento em bile 40°C, crescimento em ágar KF e SF, verificação de hemólise em ágar sangue a 5%. Fermentação de fontes de carbono (lactose, sacarose, manitol, sorbitol e arabinose), liquefação de

gelatina a 22°C, arginina deidrolase e redução de nitrato. A identificação foi confirmada, incluindo espécies por meio do sistema API STREP (Bio Mérieux).

Grupo 7 Bacilos gram-positivos, catalase negativa e motilidade negativa, com produção de gás a partir da glicose

Esses microrganismos foram agrupados de acordo com as características fisiológicas (heterofermentativos obrigatórios), segundo tabelas e chaves diferenciais proposta por Hammes, Weiss e Holzapfel (1991). As principais provas utilizadas foram: crescimento a 15°C, produção de NH₃ a partir da arginina, fermentação de fontes de carbono (arabinose, celobiose, esculina, galactose, maltose, manose, melezitose, melibiose, rafinose, ribose, sacarose, trealose e xilose). Uma vez agrupados, a identificação dos microrganismos por meio do sistema API 50CHL (Bio Mérieux).

Grupo 8 Cocos ou (cocobacilos) gram-positivos, catalase negativa e motilidade negativa, com produção de gás a partir da glicose

Esses microrganismos foram classificados e agrupados de acordo com tabelas e chaves citadas por Holt et al. (1994). Os principais testes foram: produção de ácido a partir das fontes de carbono (arabinose, frutose, maltose, melibiose, salicina, sacarose e trealose), crescimento em pH 4,8, crescimento com 10% de etanol, crescimento a 37°C, hidrólise de arginina, indol e produção de ácido e gás a partir da glicose. Uma vez agrupados esses microrganismos, foi realizada a confirmação da identificação por meio do sistema API 50CHL (Bio Mérieux).

A interpretação dos resultados das provas bioquímica para identificação dos isolados seguiu instruções de Macfaddin (Williams & Wilkins, 1980), “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology” (Holt et al., 1994) e “The Prokaryotes” (Hammes, Weiss e Holzapfel 1991),

3.20 Identificação de fungos leveduriformes

Os fungos leveduriformes foram identificados com base em testes bioquímicos e chaves dicotômicos propostas por Barnett et al. (2000).

As colônias de leveduras foram repicadas em meio YW (Yeast's Wickerham), (em g.L⁻¹; extrato de levedura, 3,0; extrato de malte, 3,0; peptona universal, 5,0; glicose, 10,0), pH 3,5 acrescido com os antibióticos ampicilina e gentamicina, na concentração de 100 µg/mL, incubadas a 28° C, durante 24 horas, sendo transferidas para tubos “eppendorf” com água destilada estéril para esgotamento das reservas energéticas das células leveduriformes.

Após 24 horas, estas suspensões foram transferidas para uma placa de mármore estéril com 21 perfurações. Como em um sistema de “carimbo”, as colônias foram inoculadas em placas contendo os meios para testes de assimilação de carbono (glicose, galactose, sacarose, maltose, celobiose, trealose, lactose, melibiose, rafinose, melicitose, sorbose, inulina, amido solúvel xilose, L e D arabinose, D-ribose, L-ramnose, glicerol, eritritol, ribitol, galactitol, manitol, glucitol, salicina, L-K-d-glucanal, succinato de sódio, citrato de sódio, inositol, metanol, etanol e ácido químico) e nitrogênio (nitrato e nitrito de sódio, lisina, etilamina e glucosamina), resistência à cicloheximida (0,01% e 0,1%), crescimento em meio sem vitamina e teste de osmolaridade (50% e 60% de glicose, e 10% e 16% de NaCl). Testes de fermentação em meio líquido contendo D-glicose, sacarose, maltose, D-galactose, melibiose, melicitose, celobiose, refinose, D-xilose e metil α-D-glucosídeo e crescimento a 30°C, 35°C, 37°C, 40°C e 42°C, em tubos de ensaio, também foram realizados (Kurtzman & Fell, 1998; Barnet et al, 2000).

As placas contendo meio de cultura para os testes de assimilação, após serem inoculadas, foram incubadas à temperatura de 28°C e a leitura dos resultados foi realizada em intervalos de 7 a 21 dias. Os resultados foram analisados comparando-se o crescimento das colônias com o controle positivo e

negativo. Valores numéricos foram atribuídos ao crescimento microbiano, sendo 0 colônia igual ao controle negativo; 1 colônia igual ao controle positivo; 2 colônias apresentando o dobro do tamanho da colônia no controle positivo e 3 o triplo ou maior que o tamanho da colônia comparado ao controle positivo.

As leituras dos testes de fermentação de carboidratos em meio líquido e crescimento a diferentes temperaturas foram realizadas após 24, 48 e 72 horas e após 7, 14 e 21 dias de incubação. Os dados obtidos da fermentação de carboidratos foram referentes à produção de ácido e à quantificação da produção de CO₂ (pelo deslocamento do meio líquido nos tubos de Durham).

3.21 Análises cromatográficas para carboidratos (sacarose, glicose, frutose e maltose) e ácidos orgânicos (lático e acético)

Para a realização das análises cromatográficas, as amostras foram transferidas do freezer (-20°C) para refrigerador (10°C), onde permaneceram por aproximadamente 12 horas. Em seguida, foram deixadas à temperatura ambiente por aproximadamente 4 horas, antes de serem analisadas. Após estabilização da temperatura, 25 µL das amostras foram diluídas 20 vezes em água ultra pura (somente para maltose) filtrada em membrana ultrafiltrante (nitrato-celulose) de porosidade 0,20 µm, marca Sartorius. Foram injetados 20 µL da amostra para a corrida cromatográfica, injetados manualmente.

Os valores foram determinados utilizando-se metodologia de acordo com as técnicas modificada por Schwan et al. (2001) e Shimadzu (1998). Foi utilizado cromatógrafo de fase líquida Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. Para a determinação dos açúcares foi utilizada uma coluna de poliamina, modelo Shim-pack CLC NH₃-(M), 4.6mm ID x 150 (Shimadzu). A coluna utilizada para determinação dos ácidos foi Shim-pack SCR 101 H (7,9mm de diâmetro x 30 cm).

Para a determinação de carboidratos, a coluna operou a 30°C, tendo como fase móvel acetonitrila a 75%, a um fluxo de 0,8 mL/min. Para a determinação de ácidos orgânicos, a coluna operou entre 40°C e 41°C, a fase móvel foi de 1% de ácido orto-fosfórico, a um fluxo de 0,6 mL/min., utilizando o detector de ultra violeta com comprimento de onda de 210 nm.

A quantificação foi feita a partir de comparação com curvas de calibração, determinadas utilizando-se padrões certificados da marca Supelco, exceto ácido acético glacial, que foi utilizado da marca Merck.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Classificação morfológica

Foram observados crescimentos vigorosos de colônias nos meios MRS pH 6,0 e YEPG pH 3,5. Entretanto, não ocorreu crescimento de fungos filamentosos no meio BDA pH 6,0. Os resultados das populações de bactérias e leveduras das diferentes amostras nos variados tempos de coleta durante a elaboração de cauim fermentado encontram-se na Tabela 3.

Foi observado aumento na população microbiana durante o processo fermentativo, a partir da amostra SF (sem fermentação) plaqueada em meio de cultivo sólido (YEPG pH 3,5) e (MRS pH 6,0). Observando o crescimento em meio YEPG (pH 3,5), que apresentou população microbiana de $3,2 \times 10^4$ UFC/mL. No decorrer do processo fermentativo, ocorreu aumento considerável da população microbiana, atingindo, no final (T48), a população de $6,9 \times 10^7$ UFC/mL (Tabela 3).

TABELA 3 Contagem microbiana nos meios de cultura YEPG pH 3,5 e MRS de amostras coletadas em diferentes períodos, durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”.

Meio YEPG pH 3,5		Meio MRS	
Tempo (horas)	UFC/ml	Tempo (horas)	UFC/ml
SF ¹	$3,2 \times 10^4$	SF ^{1/}	$7,9 \times 10^9$
T0 ^{2/}	$7,5 \times 10^3$	T0	$2,2 \times 10^{10}$
T12 ^{3/}	$6,1 \times 10^4$	T12	$1,2 \times 10^{10}$
T24 ^{4/}	$2,4 \times 10^6$	T24	$1,2 \times 10^{10}$
T36 ^{5/}	$1,2 \times 10^7$	T36	$2,5 \times 10^{10}$
T48 ^{6/}	$6,9 \times 10^7$	T48	$1,5 \times 10^{10}$

1 – Sem Fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

Ao comparar os dois meios de cultivos utilizados no isolamento dos microrganismos, verificou-se diferença entre a população microbiana do meio MRS em relação ao meio YEPG pH 3,5. Na amostra SF em meio MRS pH 6,0, a população microbiana encontrada foi de $7,9 \times 10^9$ UFC/mL, sendo superior à da amostra SF em meio YEPG pH 3,5. Porém, esta população, em meio MRS pH 6,0, apresentou oscilações quanto ao crescimento microbiano. Inicialmente há aumento populacional a partir da amostra SF até a da T12 (Tabela 3), seguido pela diminuição na amostra T24 e aumentando mais que o dobro da população na amostra T36, apresentando o mais alto índice populacional de $2,5 \times 10^{10}$ UFC/mL, voltando a cair novamente em T48 (Tabela 3). Diferentemente, nas amostras cultivadas em meio YEPG pH 3,5, havendo uma diminuição da população logo a partir de T0 (Tabela 3), desse ponto em diante, a população tendeu a aumentar constantemente até a amostra T48, apresentando população microbiana final de $6,9 \times 10^7$ UFC/mL.

Houve também variação considerável no número de microrganismos no meio YEPG pH 3,5 entre as amostras T12 e T24, em que o primeiro apresentou população de $6,1 \times 10^4$ UFC/mL enquanto que, após 12 horas, a população foi de $2,4 \times 10^6$ UFC/mL. Esse aumento mostrou que há multiplicação das leveduras no ambiente de fermentação.

4.2 Análises físico-químicas

4.2.1 pH

Os valores de pH variaram de 3,8 a 4,9 (Figura 4) nas amostras coletadas após a adição do fermento. No Tempo T0 (início da fermentação), os valores observados foram próximos da amostra SF (sem fermentação), embora seja alto o valor apresentado (4,9). Desse período em diante, os valores de pH das amostras coletadas tenderam a diminuir, ou seja, aumentaram os valores da acidez, baixando os valores do pH (Figura 5).

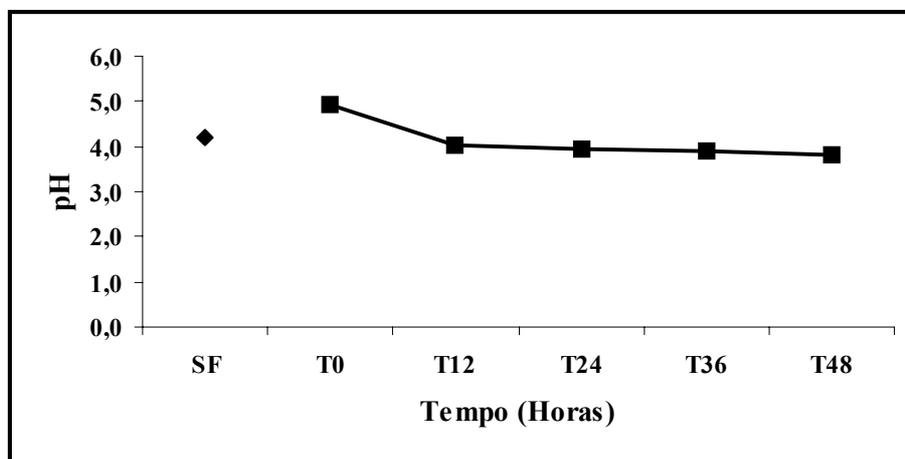


FIGURA 5 Valores de pH em amostras coletadas em diferentes períodos durante preparação da bebida fermentada indígena “cauim” obtidos por meio de análise físico-química. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

O processo de obtenção do fermento envolveu a mastigação da batata-doce crua que, juntamente com os componentes da saliva, foram adicionados ao recipiente de preparação contendo os substratos para fermentação. A adição do fermento promoveu aumento no valor de pH, o que pode ser constatado quando se comparam os valores observados em T0 e SF (Figura 5).

Na literatura, os valores de pH encontrados para alimentos e bebidas fermentadas foram bem próximos dos observados nesse trabalho. Trabalhando com polvilho azedo, Silveira (2001) encontrou valores para pH variando de 6,59 e 3,69; constatou-se também decréscimo nos valores de pH com o decorrer do processo.

Plata Oviedo (1998), em levantamento de pH em amostras de polvilho azedo comercial, verificou valores médios de pH de 3,81. Em outro trabalho, Pereira (2001) verificou, para fécula de mandioca, valores médios de pH de 4,69 e polvilho azedo de 4,18.

Além desses trabalhos, na literatura tem sido observado que o emprego de bactérias ácido-lática na fermentação de alimentos e bebidas amiláceas, normalmente, vem promovendo a redução nos valores de pH em níveis próximos a 3,0, caracterizando assim o processo de fermentação (Cereda, 1987; Cardenas e Bukle, 1980; Silveira, 2001).

4.2.2 °Brix

A Figura 6 mostra os valores observados na determinação do °Brix. Os valores variaram de 5,925, na amostra T36 a 7,825, na amostra T12. Em geral, observou-se ligeira tendência em aumentar estes valores até a amostra T12, que passou a diminuir até a amostra T36, aumentando novamente a partir da amostra T36 até a amostra T48.

Estes valores mostraram que houve dois pontos durante o processo de fermentação em que ocorreu a liberação de açúcares, possivelmente em decorrência da degradação do amido. Segundo Rivera (1997), o conteúdo de amilose diminui nos primeiros dias da fermentação, devido ao ataque de enzimas amilolíticas. Posteriormente, o grânulo de amido sofre novos rearranjos, seguidos por possíveis ações da enzima amilopectina, promovendo o aumento no teor de amilose. Isso pode ser uma possível explicação para os dois maiores valores observados para o °Brix neste trabalho.

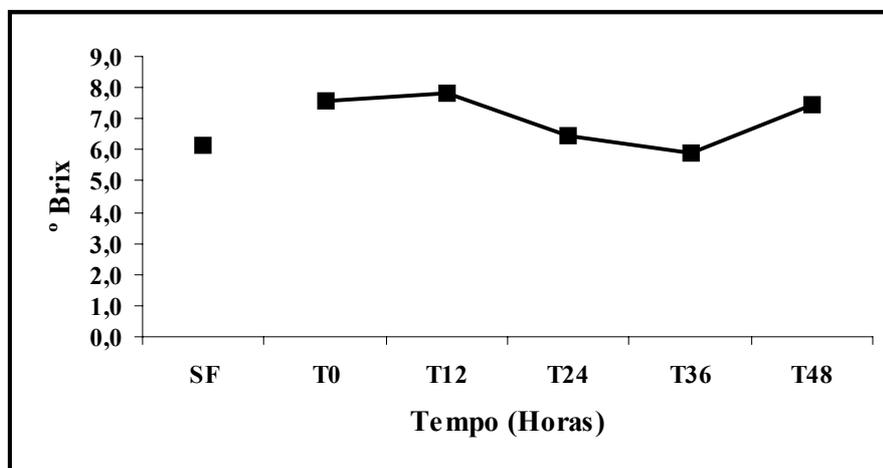


FIGURA 6 Valores de °Brix em amostras coletadas em diferentes períodos, durante preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtidos por meio de análise físico-química. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

4.2.3 Proteína bruta, amido, açúcares totais, glicose e sacarose

4.2.3.1 Proteína Bruta

Para os tratamentos avaliados (sem fermentação; T0; T12; T24; T36 e T48), não foram observadas diferenças significativas, mostrando que aparentemente, houve alterações nos valores de proteínas amostrados antes e após o processo de fermentação.

Em geral, os valores para proteína bruta variaram de 3,2% no tratamento T12 (12 horas) a 3,5% T0 (0 hora) (Figura 7), apresentando média geral de 3,3%. Esses valores são considerados baixos quando comparados com outras fontes de proteínas de origem vegetal, como, por exemplo, a soja que possui 40% de proteína bruta (Sediyama et al., 1999).

Segundo Cereda et al. (2001), a quantidade de proteína bruta apresentada em fécula de mandioca é de 0,26%, que é um produto de fermentação amilácea. Isso mostra que, realmente, os produtos fermentados a

partir de substratos ricos em amido, tendem a apresentarem altos teores de amido, como é o caso da fécula, que apresenta 96,88% de amido e 17,78% de amilose (Cereda et al., 2001). São, portanto, alimentos ricos em energia e altamente calóricos, porém, pobres em proteínas.

Mesmo com a adição do fermento, não houve aumento significativo na quantidade de proteína bruta nas amostras coletadas (Figura 7). No entanto, houve ligeiro aumento após a adição do fermento, o que pode ter contribuído para o aumento do teor de proteína bruta após esse período. Tem sido observado que não há incremento no conteúdo de proteína bruta em decorrência do processo de fermentação, principalmente nas fermentações de origem amilácea.

Em estudo da determinação da composição química de subprodutos da mandioca, Cereda & Fioretto (1983) verificaram altas quantidades de amido (69,76%). Para proteína, o valor encontrado foi de 1,51%. Valores baixos para subprodutos da mandioca foram também encontrados por Melotti (1972).

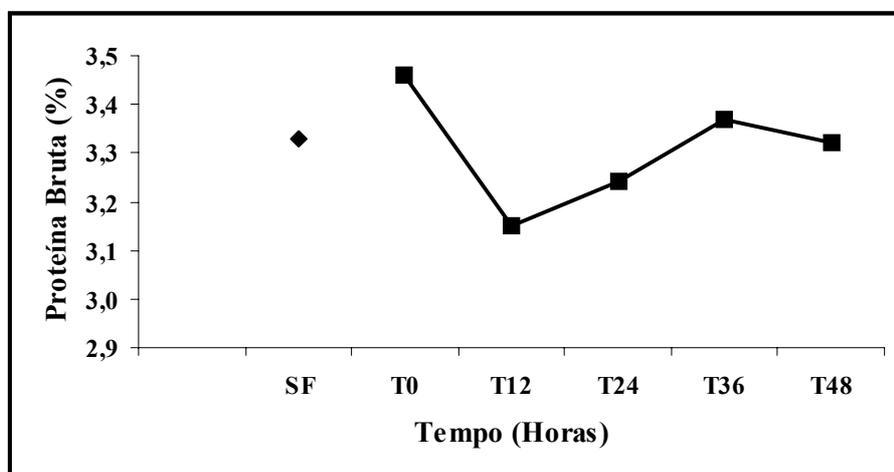


FIGURA 7 Teor de proteína bruta de amostras coletadas em diferentes períodos durante preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtido por meio de análise físico-química. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

Os microrganismos fermentativos normalmente obtêm alguns ou todos os seus aminoácidos a partir do ambiente de fermentação. Dependendo de suas propriedades biossintéticas, os microrganismos podem ou não ser capazes de converter os aminoácidos presentes nesses substratos em compostos protéicos (Madigan et al., 2004). Bactérias ácido-láticas normalmente predominam na fermentação do amido; essas, por sua vez, não são capazes de sintetizar e incrementar o conteúdo de proteína nesses produtos da fermentação. Soma-se a isso o fato das fontes de amido utilizadas serem normalmente pobres em proteínas, como, por exemplo, a mandioca que contém cerca de 1% a 2% de proteína bruta (Oliveira et al., 2002).

Os resultados aqui obtidos concordam com os resultados de Cereda et al. (2001) quanto ao teor de proteína bruta em subprodutos da fermentação ácido-lática. Devido a isso, alimentos e bebidas fermentadas indígenas normalmente são consumidos juntamente com fonte de proteína de origem animal, como peixe, tartaruga e animais silvestres.

Apesar do baixo conteúdo protéico, alimentos ricos em amido e carboidrato podem ser utilizados como fonte alternativa de substrato para o desenvolvimento microbiano, em que o nitrogênio não protéico é transformado em proteína microbiana. Das diversas vantagens, citam-se: curto tempo de geração, rápido aumento da massa celular e alto conteúdo de proteína (Camargo, 1986).

4.2.3.2 Amido

Observaram-se diferenças significativas no conteúdo de amido nas amostras nos diferentes períodos de avaliação. A média geral para o teor de amido das amostras foi de 3,4%, variando de 1,65% (T48) a 11,8% (SF), durante o processo de preparação e fermentação da bebida “cauim” (Figura 8).

O gráfico da figura 8 mostra o teor de amido nas diferentes amostras. Pode-se observar que não houve grandes alterações nos teores de amido nas amostras coletadas após adição do fermento. Por outro lado, quando comparados com o período SF, percebe-se uma drástica redução nesse teor. Literaturas referentes ao teor de amido em bebidas fermentadas indígenas ainda são escassas. Porém, trabalhos com subprodutos da mandioca obtidos via fermentação têm demonstrado que ocorre degradação do amido por amilases produzidas pelos microrganismos presentes nos substratos (Ascheri, 1992; Cereda, 1973; Demiate et al, 2000).

Várias alterações ocorrem no amido durante a fermentação, devido ao desenvolvimento de uma gama de microrganismos (Cereda & Gíaj-Levra, 1987). Durante o processo de obtenção do “cauim”, têm sido encontradas bactérias ácido-lática e leveduras (Almeida et al., 2004).

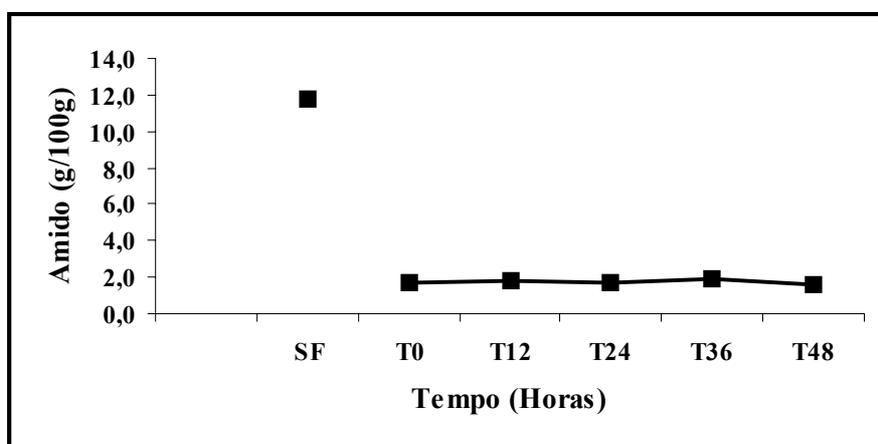


FIGURA 8 Teor de amido em amostras coletadas em diferentes períodos durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtido por meio de análise físico-química. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

4.2.3.3 Açúcares totais, glicose e sacarose

Foram observadas diferenças significativas para açúcares totais, glicose e sacarose nas amostras nos diferentes períodos avaliados. A média geral para açúcares totais, glicose e sacarose foi de 3,6, 2,9 e 0,5, respectivamente. Em relação aos açúcares totais, o menor valor foi observado nas amostras SF. Em seguida, observou-se acréscimo nas primeiras 12 horas, seguido por diminuição, tendendo a se estabilizar após 48 horas de fermentação (Figura 9). Comportamento semelhante foi observado nos teores de glicose e sacarose (Figura 9).

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

Alterações nas propriedades físico-químicas em decorrência da degradação do amido foram relatadas por Nakamura et al. (1976), segundo esses autores, tais alterações modificam o sabor e o odor do produto. As leveduras podem estar consumindo os ácidos orgânicos, formando compostos aromáticos que, em conjunto com os ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação, são responsáveis para definir as características acima citadas (Cereda, 1987). Esse talvez seja um dos motivos da preferência pela bebida fermentada indígena “cauim” após processo de fermentação.

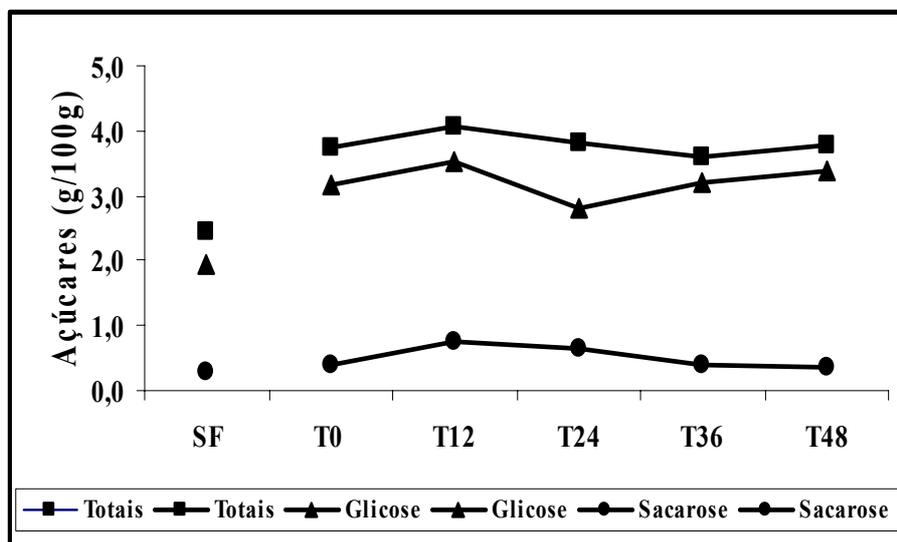


FIGURA 9 Teor de açúcares totais, glicose e sacarose em amostras coletadas em diferentes períodos durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtido por meio de análise físico-química. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

Não foram constatadas diferenças significativas entre as amostras das repetições do experimento para o teor de frutose nas análises feitas com CLAE, para bebida fermentada indígena “cauim” (Figura 10). Porém, os valores observados variaram de 24,9µg/mL, na amostra T48 a 68,6µg/mL, na amostra SF (Figura 10). Houve uma tendência dos teores de frutose nas amostras reduzirem com o tempo da fermentação, conforme se observa na Figura 10.

Conforme comentado anteriormente, as modificações ocorridas durante o processo de fermentação, normalmente leva a produção de açúcares mais simples, entre eles a frutose. Esses açúcares são utilizados, durante o processo de fermentação, como fonte de energia pelos microrganismos. Esse processo, possivelmente, é o responsável pelas alterações no sabor e aroma dos produtos obtidos da fermentação (Nakamura et al., 1976).

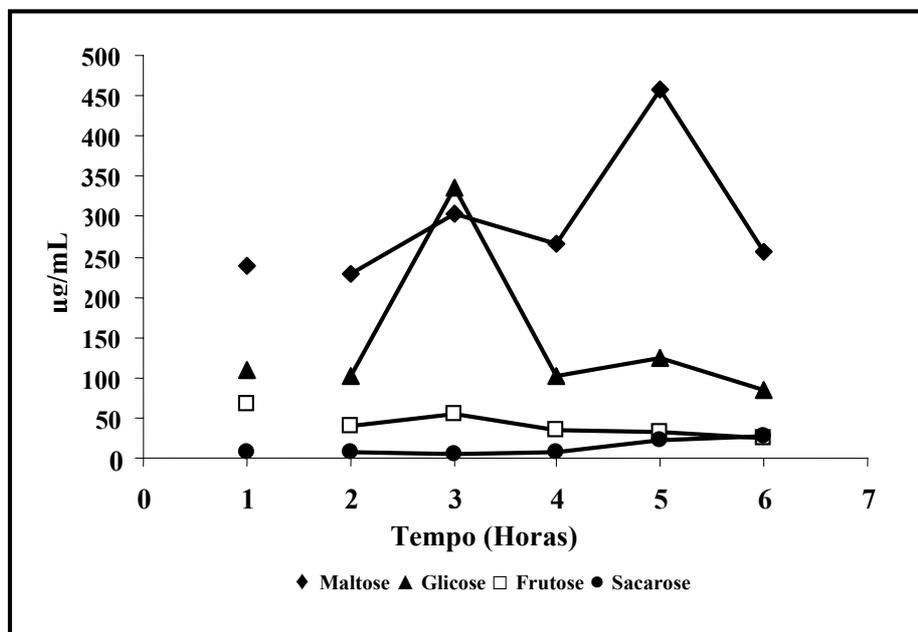


FIGURA 10 Teores de sacarose, frutose, glicose e maltose em amostras coletadas em diferentes períodos durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtido por meio de CLAE. 1 – sem fermentação; 2 - 0 hora de fermentação; 3 - 12 horas de fermentação; 4 - 24 horas de fermentação; 5 - 36 horas de fermentação; 6 - 48 horas de fermentação.

Semelhante ao ocorrido nas análises físico-químicas, foram observadas diferenças significativas para o teor de glicose nas diferentes amostras avaliadas por meio de CLAE, na bebida fermentada indígena “cauim” (Figura 10). Para essa característica, a média geral observada para as amostras avaliadas foi de 145,2µg/mL. Os valores observados variaram de 85,2µg/mL, na amostra T0 a 335,47µg/mL, na amostra T12 (Figura 10).

Com exceção da amostra T12, em que houve um comportamento no sentido de aumentar o teor de glicose, houve uma ligeira tendência dos teores desse açúcar em reduzir com o tempo da fermentação, semelhante ao observado nas análises físico-químicas (Figura 10). A redução no teor de açúcares simples, em especial a glicose,

está de acordo com o observado na literatura para o processo de fermentação de alimentos e bebidas (Silveira, 2001; Nakamura et al., 1986; Cereda e Silva, 1985).

Constataram-se diferenças significativas para o teor de sacarose nas amostras da bebida fermentada indígena “cauim”. Os valores variaram de 6,0µg/mL, na amostra T0 a 27,0µg/mL, na amostra T48 (Figura 10). A média observada foi de 13,2µg/mL.

Diferentemente do observado para os açúcares frutose e glicose, que em geral apresentaram tendência em reduzir seus teores com o decorrer do processo fermentativo, houve uma tendência dos teores de sacarose em aumentar (Figura 10). Esse comportamento, possivelmente, foi resultado da degradação ou conversão de outros açúcares, formando sacarose, que é utilizada em períodos mais avançados da fermentação.

Houve diferenças significativas entre as amostras para teor de maltose, que, em geral, apresentaram maiores valores absolutos em relação aos demais teores dos açúcares avaliados. Para essa característica, a média geral foi de 268,5392 e com valores observados variando de 195,0µg/mL no T0 a 425,0µg/mL no T36 (Figura 10).

Semelhante ao observado para sacarose houve um ligeiro aumento nos teores de maltose no decorrer do processo de fermentação da bebida “cauim”, o que pode ser resultado da degradação do amido ou da conversão de outros açúcares mais simples como a frutose e a sacarose.

4.2.3.4 Ácido lático e ácido acético

Houve diferenças significativas para os teores de ácido lático nas amostras analisadas. Com o decorrer do processo fermentativo, ou seja, o crescimento dos microrganismos, observa-se um aumento no conteúdo de ácido lático, proporcionado pelas bactérias do ácido lático que se encontravam presentes em todas as amostras analisadas (Figura 11). Para essa característica, a média geral observada foi de 448,88µg/mL, com os valores observados nas amostras variando de 336,09µg/mL, na amostra SF a 736,07µg/mL, na amostra T48 (Figura 11).

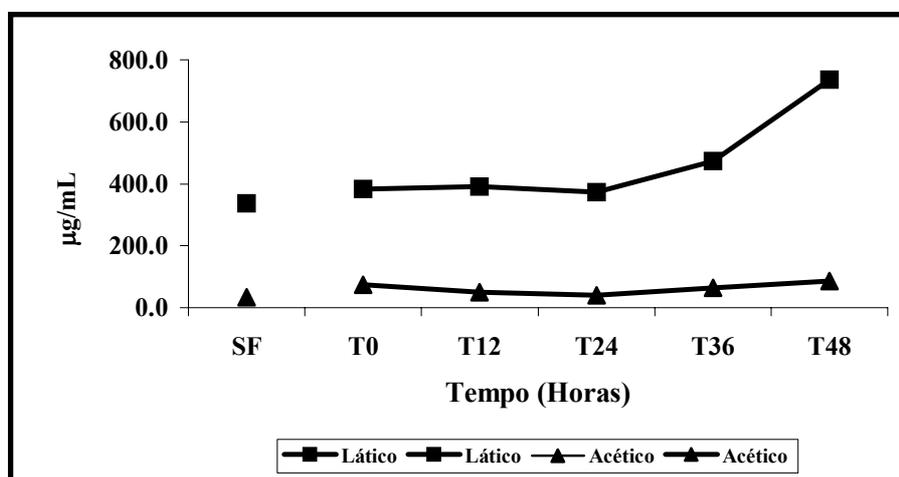


FIGURA 11 Teor de ácido láctico e ácido acético em amostras coletadas em diferentes períodos, durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtidos por meio de CLAE. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

Houve diferenças significativas para os teores de ácido láctico nas amostras analisadas. Com o decorrer do processo fermentativo, ou seja, o crescimento dos microrganismos, observa-se um aumento no conteúdo de ácido láctico, proporcionado pelas bactérias do ácido láctico que se encontravam presentes em todas as amostras analisadas (Figura 11). Para essa característica, a média geral observada foi de 448,88µg/mL, com os valores observados nas amostras variando de 336,09µg/mL, na amostra SF a 736,07µg/mL, na amostra T48 (Figura 11).

De acordo com os resultados encontrados, tanto para ácido láctico como para ácido acético, pode-se inferir que os açúcares contidos no substrato em fermentação estavam sendo transformados nesses ácidos, o que vai definindo as características organolépticas desejáveis para a bebida.

A produção desses ácidos no meio de fermentação propicia o enriquecimento da dieta desses povos por meio de uma diversidade de sabores, texturas e aromas, provenientes das transformações desses ácidos ou açúcares pelo próprio microrganismo ou por ação de suas enzimas (Walker, 1988).

Os ácidos láctico e acético, bem como alguns álcoois e fermentações alcalinas, vão atuar na preservação dos substratos a serem fermentados (Caplice & Fitzgerald, 1999; Blandino et al., 2003).

Detectou-se também a presença de ácido láctico em análise físico-química de acidez total titulável realizada com as amostras coletadas (Figura 12), confirmando os resultados encontrados acima descritos. Em ambas as análises, o comportamento da produção de ácido, principalmente o láctico, durante o desenvolvimento do processo fermentativo, aumenta em volume, com o tempo de fermentação, chegando a atingir seu maior nível na amostra T48 (horas de fermentação). Para essa análise, os valores começam a aumentar a partir da amostra T0 (hora de fermentação) até T48 (horas de fermentação).

Semelhante aos teores de ácido láctico, foram detectadas diferenças significativas para os teores de ácido acético nas amostras analisadas. Esses valores tendem a aumentar de acordo com o período de fermentação e população microbiana presente no substrato que está sendo fermentado (Figura 11). Para essa característica, a média geral observada foi de 58,46µg/mL, com os valores observados nas amostras variando de 33,38µg/mL, na amostra SF a 86,06µg/mL, na amostra T48 (Figura 11). Porém, a quantidade de ácido láctico presente na bebida foi superior à quantidade de ácido acético, o que já era esperado, de acordo com a identificação dos microrganismos presentes, sendo a grande maioria bactérias acidoláticas.

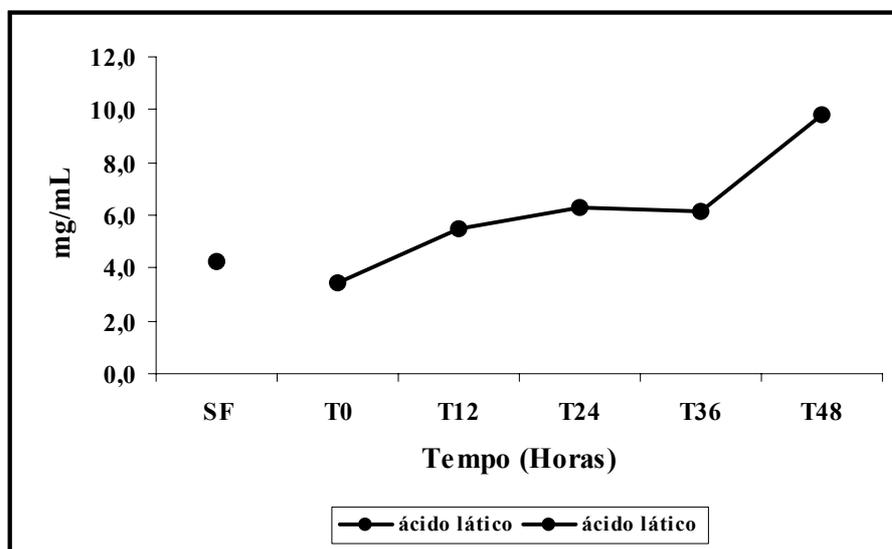


FIGURA 12 Acidez total titulável em amostras coletadas em diferentes períodos, durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”, obtido por meio de análise físico-química. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

4.4 Identificação dos microrganismos

Alimentos e bebidas fermentadas, em especial aquelas obtidas a partir de substratos ricos em amido, apresentam, durante seu processo fermentativo, elevado número de espécies de microrganismos que são os responsáveis pelas alterações físico-químicas desses produtos. No caso de bebida fermentada indígena chamada “cauim”, grande número de microrganismos foi isolado.

De um total de 355 isolados, 317 foram identificados quanto ao gênero e espécie (Tabela 4). Dos microrganismos crescidos nos meios de cultivo específico para isolamento, 88 morfotipos foram classificados. Do total de morfotipos, 51 foram isolados como leveduras e 37 de bactérias.

Nos tempos avaliados (SF, T0, T12, T24, T36 e T48), foi observada a presença de bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras (Tabela 4). Dessas amostras coletadas, a população de bactérias gram-positivas foi

identificada em 215 (59,9%), as leveduras em 132 (37,8) e as bactérias gram-negativas em 8 (2,3%) das amostras avaliadas (Tabela 4).

TABELA 4 Espécies de bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras isolados nas amostras coletadas em diferentes períodos, durante a preparação da bebida fermentada indígena “cauim”. 1 – sem fermentação; 0 hora; 12 horas; 24 horas; 36 horas; 48 horas após o início da fermentação.

TEMPO	BACTÉRIAS		LEVEDURAS
	GRAM POSITIVAS	GRAM NEGATIVAS	
SF	<i>Corynebacterium xerosis</i> (1)		<i>Candida sake</i> (1)
	<i>Lactobacillus pentosus</i> (17)		<i>Cryptococcus laurentii</i> (1)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (1)		<i>Trichosporon asahii</i>
	<i>Paenibacillus macerans</i> (1)		<i>Lipomyces starkeyi</i> } (1)
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (1)		<i>Lipomyces tetrasporus</i> }
	<i>Bacillus anthracis</i> (1)		<i>Candida blankii</i> } (1)
	<i>Bacillus pumilis</i> (1)		<i>Stephanoascus ciferrii</i> }
			<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (1)
			<i>Pichia guilliermondii</i> (1)
			<i>Bulleromyces albus</i> (1)
			<i>Cryptococcus albidus</i> (1)
			<i>Candida peltata</i> } (1)
			<i>Candida blankii</i> }

... Continua ...

TABELA 6, cont.

T0	<i>Corynebacterium xerosis</i> (1)	<i>Serratia plymuthica</i> (1)	<i>Cryptococcus laurentii</i> (1)
	<i>Lactobacillus pentosus</i> (11)		<i>Candida blankii</i> } (1)
	<i>Paenibacillus macerans</i> (1)		<i>Stephanoascus ciferrii</i> }
	<i>Bacillus stearothermophilus</i> (1)		<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (1)
	<i>Bacillus cereus</i> I (1)		<i>Bulleromyces albus</i> (1)
	<i>Brevibacillus brevis</i> (1)		<i>Cryptococcus albidus</i> (3)
	<i>Bacillus pumilis</i> (1)		<i>Cryptococcus humicola</i> (1)
			<i>Candida freyschussii</i> (1)
			<i>Clavispora lusitaniae</i> (1)
			<i>Cryptococcus laurentii</i> } (1)
			<i>Trichosporon asahii</i> }
			<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (1)
			<i>Pichia guilliermondii</i> (1)
			<i>Debaryomyces hansenii</i> (2)
			<i>Bulleromyces albus</i> (2)
			<i>Candida tenuis</i> (1)

... Continua ...

TABELA 6, cont.

T12	<i>Corynebacterium xerosis</i> (2)	<i>Serratia plymuthica</i> (1)	<i>Candida sake</i> (2)
	<i>Lactobacillus pentosus</i> (19)		<i>Cryptococcus laurentii</i> (1)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (3)		<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (1)
	<i>Paenibacillus macerans</i> (2)		<i>Bulleromyces albus</i> (2)
	<i>Bacillus anthracis</i> (1)		<i>Cryptococcus albidus</i> (2)
			<i>Cryptococcus humicola</i> (1)
			<i>Candida freyschussii</i> (1)
			<i>Clavispora lusitaniae</i> (2)
			<i>Cryptococcus laurentii</i> } (1)
			<i>Trichosporon asahii</i> } (1)
			<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (1)
			<i>Pichia guilliermondii</i> (1)
			<i>Debaryomyces hansenii</i> (1)
			<i>Sporobolomyces roseus</i> (2)
			<i>Dekkera anomala</i> (1)

... Continua ...

TABELA 6, cont.

T24	<i>Corynebacterium xerosis</i> (1)	<i>Serratia plymuthica</i> (1)	<i>Candida sake</i> (2)
	<i>Corynebacterium striatum</i> (1)		<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (1)
	<i>Corynebacterium vitarumen</i> (1)		<i>Bulleromyces albus</i> (1)
	<i>Lactobacillus pentosus</i> (20)		<i>Cryptococcus albidus</i> (1)
	<i>Lactobacillus planturum</i> (3)		<i>Candida freyschussii</i> (1)
	<i>Paenibacillus macerans</i> (1)		<i>Clavispora lusitaniae</i> (1)
	<i>Bacillus anthracis</i> (1)		<i>Criptococcus laurentii</i> } (1)
			<i>Trichosporon asahii</i> }
	<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (1)		
	<i>Pichia guilliermondii</i> (1)		
	<i>Debaryomyces hansenii</i> (2)		
T36	<i>Corynebacterium xerosis</i> (3)	<i>Serratia plymuthica</i> (1)	<i>Candida sake</i> (6)
	<i>Lactobacillus pentosus</i> (29)		<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (1)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (1)		<i>Bulleromyces albus</i> (2)
	<i>Paenibacillus macerans</i> (1)		<i>Cryptococcus Albidus</i> (2)
	<i>Bacillus cereus I</i> (1)		<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (1)
	<i>Bacilluslicheniformis</i> (1)		<i>Sporobolomyces roseus</i> (2)
	<i>Bacillus anthracis</i> (1)		<i>Clavispora lusitaniae</i> (1)
			<i>Dekkera anomala</i> (1)
	<i>Candida tenuis</i> (1)		
	<i>Debaryomyces hansenii</i> (3)		
	<i>Lipomyces starkeyi</i> (1)		
	<i>Pichia guilliermondii</i> (4)		
	<i>Trichosporonasahii</i> (1)		

... Continua ...

TABELA 6, cont.

T48	<i>Corynebacterium xerosis</i> (7)	<i>Enterobacter cloacae</i> (2)	<i>Candida sake</i> (5)
	<i>Corynebacterium floescens</i> (1)	<i>Enterobacter agglomerans</i> (1)	<i>Zygosaccharomyces fermentati</i> (1)
	<i>Corynebacterium vitarumen</i> (1)	<i>Pseudomonas maltophilia</i> (1)	<i>Bulleromyces albus</i> (3)
	<i>Lactobacillus pentosus</i> (76)		<i>Candida freyschussii</i> (1)
	<i>Lactobacillus plantarum</i> (6)		<i>Clavispora lusitaniae</i> (2)
	<i>Paenibacillus macerans</i> (1)		<i>Criptococcus laurentii</i> } (1)
	<i>Bacillus circulans 1</i> (2)		<i>Trichosporon asahii</i> }
	<i>Bacillus circulans 2</i> (1)		<i>Metschnikowia pulcherrima</i> (3)
	<i>Bacillus cereus 1</i> (1)		<i>Pichia guilliermondii</i> (6)
	<i>Bacillus cereus 2</i> (2)		<i>Debaryomyces hansenii</i> (8)
	<i>Bacillus licheniformis</i> (1)		<i>Sporobolomyces roseus</i> (2)
	<i>Bacillus anthracis</i> (1)		<i>Dekkera anomala</i> (2)
			<i>Candida tenuis</i> (9)
			<i>Lipomyces starkeyi</i> (1)
		<i>Trichosporon asahii</i> (1)	
		<i>Cryptococcus albidus</i> (3)	
		<i>Candida albicans</i> (6)	
		<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (2)	

Entre as bactérias gram-positivas, as espécies *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus plantarum* foram as mais freqüentes, estando em todos os períodos de avaliação em 161 (74,9%) e 11 (5,1%) das amostras avaliadas, respectivamente (Tabela 4). Para as leveduras, não houve o predomínio de uma espécie em específico em todos os períodos de avaliação. Em geral, as espécies *Candida sake* e *D. hansenii* foram as mais freqüentes, representando 6,3% dos isolados (Tabela 4). As oito espécies de bactérias gram-negativas identificadas pertencem a quatro espécies distintas que foram isoladas das amostras (T0, T12, T24, T36 e T48). As espécies *E. cloacae*, *E. agglomerans* e *Ps. maltophilia* só foram observadas nas amostras avaliadas após 48 horas de fermentação, enquanto que a espécie *Ser. Plymuthica* esteve presente nas amostras em T0, T12, T24 e T36 (Tabela 4). Nas amostras retiradas antes da adição do inoculo, não foi observada a presença de bactérias gram-negativas (Tabela 4).

Ducroq (1990) e Figueroa (1991), citados por Cereda et al. (2001), em estudo realizado sobre a fermentação da fécula de mandioca na Colômbia, confirmaram que a microbiota é composta, em parte, por *Lactobacillus*, sendo estes os responsáveis pela produção de ácidos que atacam os grânulos de amido. Semelhantemente, os resultados descritos nesse trabalho vêm confirmar os resultados obtidos por esses autores, havendo o predomínio de *Lactobacillus* em todas as amostras coletadas, por ser o “cauim” uma bebida fermentada a partir de substratos semelhantes (arroz e mandioca), variando apenas no modo de preparação de ambas.

Por haver predominância de bactérias produtoras de ácido láctico na bebida fermentada “cauim” e, de acordo com trabalho realizado por Brabet et al. (1994), que teve predominância semelhante em fécula de mandioca na Colômbia, pode se dizer que trata-se de uma fermentação homoláctica, em que o principal produto é o ácido láctico, que contribui com as características organolépticas da bebida. Esses mesmos autores concluíram que a seleção de tipos especiais de bactérias lácticas, como inoculante do processo de produção de fécula, poderá proporcionar melhorias na

qualidade do produto final, trazendo benefícios nutricionais. O mesmo poderia ser feito para melhorar a qualidade da bebida fermentada “cauim”, trazendo benefícios aos Tapirapé e indígenas, de modo geral.

Segundo Cereda et al. (2001), no Brasil, os cultivos de raízes sempre foram bastante populares e eram a base da subsistência dos indígenas. Esses mesmos autores relatam, ainda, que esses indígenas buscavam conseguir uma melhor conservação dos alimentos, principalmente raízes, que são perecíveis, alimentos e bebidas de melhor consistência, sabor e aroma. Entre essas tecnologias, destacava-se a da fermentação, pela qual obtinham-se alimentos e bebidas de milho e mandioca. Isso vem reforçar ainda mais o nosso objetivo para a realização deste trabalho, em busca de melhorar a qualidade de inóculo para a produção de alimentos e bebidas fermentadas pelos índios Tapirapé.

Muitos costumes e hábitos alimentares indígenas fazem parte da vida de muitos ribeirinhos ou comunidades que estabelecem um contato mais direto com estes povos. Assim, conhecer a fonte do inóculo, técnicas de preparo, recipientes e o ambiente de preparação da bebida, como foi desenvolvido neste estudo, pode levar a uma melhoria na produção de inóculo para divulgação da bebida e até mesmo contribuir para um melhor aproveitamento de nossa produção agrícola, que se perde antes de ser beneficiada ou comercializada “in-natura”, como é o caso das frutíferas (Wagley, 1988; Museu do índio, 2005).

Devido ao grande aumento populacional no mundo, a alimentação se torna cada vez mais escassa. Assim, aumenta a demanda de produtividade agrícola, mais florestas são destruídas para crescer a área agricultável. Além das técnicas de melhoramento genético que contribuem para uma melhor produtividade, mesmo assim, não será o suficiente para garantir alimento para todos. Portanto, pesquisas como esta poderão assegurar um melhor aproveitamento, principalmente de polpa de frutos que são descartados durante

as etapas de colheita, armazenamento, transporte e comercialização (Museu do índio, 2005).

Em processos fermentativos naturais, normalmente se encontram associações entre bactérias e leveduras e, às vezes, fungos (Gotcheva et al., 2000). Isto vem confirmar os resultados obtidos na identificação dos microrganismos presentes em bebida fermentada “cauim”, os quais estão de acordo com o que foi descrito por esses autores.

A predominância de *Lactobacillus* encontrada nesse estudo foi também detectada por Amoa-Awua et al., (1995), em estudo realizado com bebida fermentada produzida na África (Abgelima). Embora a relação entre as duas bebidas não seja tão semelhante considerando-se os substratos utilizados, torna-se evidente apresentarem resultados próximos, por ser bebida de fermentação láctica, preparadas de forma rudimentar.

A fermentação, além de promover inúmeras vantagens nutricionais, como anteriormente descritas, promove a desintoxicação (Holzapfel, 1997). Para os índios Tapirapé, não foi observado nenhum cuidado quanto aos microrganismos invasores ou contaminantes do processo de preparação da bebida, exceto o cozimento, mas, não o fazem com esse propósito. Caso a fermentação não promovesse essa desintoxicação, os usuários poderiam desencadear uma série de doenças provenientes da contaminação ocorrida durante preparo de alimentos ou bebidas fermentadas. Ao observando-se os resultados apresentados (Tabela 4), fica evidente essa inibição de microrganismos contaminantes no decorrer do processo fermentativo, quando a presença de bactérias gram-negativas começa a ser notada em maior quantidade, mais para o final do processo (T 48 horas de fermentação). Portanto, a presença de bactérias gram-negativas identificadas é contaminante do processo de preparação da bebida cauim, por se apresentarem em menor quantidade e não estarem frequentes em ambas as amostras coletadas para estudo.

As bactérias gram-positivas identificadas são em maior parte (59,9%) e são representadas, em sua maioria, pelo gênero *Lactobacillus*, que é responsável por desencadear uma gama de vantagens nutricionais que se encontram agregadas à bebida. Esse grupo de bactérias é responsável pelo abaixamento do pH dos substratos a serem fermentados, impedindo o crescimento de microrganismos indesejáveis ou contaminantes. Além disso, a produção de ácidos durante o desenvolvimento do processo fermentativo é que vai definir o sabor e o aroma da bebida como produto final de fermentação.

Apesar dos avanços científicos e tecnológicos alcançados, ainda não há informações disponíveis sobre a microbiota envolvida nos processos de fermentação de alimentos e bebidas produzidas por povos tradicionais ou indígenas, sendo, portanto, um dos principais objetivos da realização deste estudo.

5 CONCLUSÃO

A população microbiana da bebida fermentada indígena “cauim” foi composta, em maior parte, por bactérias gram-positivas (59,9%), seguida de leveduras (37,8%), e bactérias gram-negativas com apenas (2,3%).

Houve predomínio de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, com o domínio da espécie *Lactobacillus pentosus* (77,3%) sobre as demais bactérias identificadas. O gênero *Serratia* foi o mais encontrado entre as bactérias gram-negativas.

Os gêneros de leveduras mais freqüentes foram: *Candida*, *Cryptococcus*, *Lypomyces*, *Pichia* e *Trichosporon*.

Foram observados acréscimos nas concentrações de açúcares, glicose, sacarose e maltose e decréscimo na concentração de frutose durante o processo fermentativo. Maltose foi o açúcar encontrado em mais alta concentração.

Foram encontrados ácidos lático e acético durante o processo fermentativo. Os valores de pH variaram de 3,8 a 4,9 nas amostras avaliadas. Os valores de proteína bruta apresentaram média de 3,3% e de amido de 3,42% para as amostras analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIANUAL 99 - Anuário de agricultura Brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e comércio, 1999. p. 352-358.

ALMEIDA, E. G.; SOUZA-DIAS, M. A. G.; SCHWAN, R. F. Identification of micro-organisms involved in fermented beverages produced by Brazilian Amerindians TAPIRAPÉ. In: **Eleventh Internacional Congresso on Yeasts**. Rio de Janeiro, Brasil, 2004.

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

AMOA-AWA, W. K.; APPOH, F. E.; JAKOBSEN, M. Lactic Acid Fermentation of cassava dough into agbelima. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, 1995.

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

ASCHERI, D. P. R. **Acompanhamento do processo fermentativo através das características do polvilho e dos biscoitos elaborados**. 1992. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras, MG .

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

BALDUS, H. Os grupos de comer e os grupos de trabalho dos Tapirapé. In: **Ensaio de etnologia brasileira**. São Paulo: Ed. Nacional; Brasília: INL, 1979. p. 44-59. (Brasiliana, 101)

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

BATTCOCK, M.; AZAM-ALI, S. **Fermented fruits and vegetables**: a global perspective. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 1998. 96 p. (FAO Agricultural Services Bulletin, n. 134)

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

BILLINGS, T. On fermented foods. 1998. Disponível em: <<http://www.living-foods.com>>. Acesso em: 2004.

BLANDINO, A.; AL-ASSIERI, M. E.; PANDIELLA, S. S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. **Food Research International**, Amsterdam, v. 36, n. 6, p. 527-543, 2003.

BRABET, C.; CHUZEL, G.; DUFOUR, D.; RAIMBAULT, M.; GUIRAUD, J. Sour cassava starch production improvement in Colômbia. In: INTERNATIONAL MEETING ON CASSAVA FLOUR & STARCH, 1994, Cali, Colombia. **Anais...** Cali: CIAT, 1994.

BRASIL. Introdução Normativa DAS nº 22 de Abril de 2003. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

CAMARGO, R. Proteína de microrganismos. Substratos e microrganismos utilizados. In: CAMARGO, R. et al. **Tecnología dos produtos agropecuarios**. São Paulo: Nobel, 1986. Cap. 15, p. 285-298.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, 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.

CARDENAS, O. S.; BUCKLE, T. S. Sour cassava starch production: a preliminary study. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 45, n. 6, p. 1509-1528, Nov./Dec. 1980.

CEREDA, M. P. **Alguns aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca**. 1973. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Botucatu.

CEREDA, M. P. Avaliação da qualidade de duas amostras de fécula fermentada de mandioca (polvilho azedo). **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 305-320, mar. 1983.

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

CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. C.; VILPOUX, O.; NUNES, O. L. G. S. **Modificação de fécula por fermentação**. In: Biotecnologia industrial. LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. Processos fermentativos e enzimáticos. v. 3 cap. 20 p. 413 a 464.

CEREDA, M. P.; FIORETO, A. M. C. Potencial de utilização de águas de fecularia. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MANDIOCA, 2., 1983, Cruz das Almas. **Anais...** Cruz das Almas, 1983.

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

CEREDA, M. P.; LIMA, U. A. Aspectos sobre a fermentação da fécula de mandioca. III. Determinação dos ácidos orgânicos. **Turrialba**, São José, v. 35, n. 1, p. 19-24, ene./mar. 1985.

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 Press, 1962. v. 1, p. 477-512.

ESCALANTE, A.; RODRIGUEZ, M. E.; MARTINEZ, A.; LOPEZ-MUNGUIA A.; BOLIVAR, F.; GOSSET G. Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. **FEMS of Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 15, 2, p. 273-279 June 2004.

FILHO, W. G. V.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL. AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, V. A. **Biotecnologia na produção de alimentos**. 2001. v. 4. c4.

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

GASSEM, M. A. A. A microbiological study of Sobia: a fermented beverage in the Western province of Saudi Arabia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 18, n. 3, p. 173-177, Apr. 2002.

GOTCHEVA, V.; PANDIELLA, S. S.; ANGELOV, A.; ROSHKOVA, G. Z.; WEBB, C. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 36, n. 1/2, p. 127-130, Sept. 2000.

HAMMES, N. W.; WEISS, N.; HOLZAPFEL, W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: BALLOWS et al. (Ed.). **The Prokaryotes**. New York: Springer-Verlang, 1991. v. 2, p. 1535-1594.

HAN, B. Z.; ROMBOUITS, F. M.; NOUT, M. J. A. Chinese fermented soybean food. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 11, n. 1/2, p. 1-10, Apr. 2001.

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

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985. v. 1, 533 p.

INSTITUTO CAMÕES. Pesquisa em internet. Disponível em: <<http://www.Camões-Revista de letras e culturas lusófonas>>. Acesso em: 10 out. 2004.

KIMARYO, V. M.; MASSAWE, G. A.; OLASUPO, N. A.; HOZAPFEL, W. H. The use of a starter culture on the fermentation of cassava for the production of

“kivumde”, a traditional Tanzanian food product. **Journal Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 2/3, p. 179-190, June 2000.

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

LEHNINGER, A. L. **Princípios da bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1993.

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

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. Tradução e revisão técnica Cynthia Maria Kiaw. São Paulo. Prentice Hall. 10^a ed. 2004.

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

MARI/MEC/PNUD. **Comunidade Tapirapé: Xanetawa Parageta (Histórias das nossas aldeias)**. São Paulo, 1996.

MELOTTI, L. Contribuição para o estudo da composição química e valor nutritivo dos resíduos da industrialização da mandioca, *Manihot utilíssima*,

MIRANDA & AMORIM, L. **Atlas geográfico**. Mato Grosso – Cuiabá: Entrelinhas, 2000. 40 p.

MORENO-TERRAZAS, P. E.; LAPPE-OLIVEIRAS, R.; VAZQUEZ-JUAREZ, S.; HUERTA-OCHOA, I.; GUERRERO-LEGARRETA; VERNON-CARTER, E. J. **Identification of yeasts isolated from "tepache", a traditional fermented fruit beverage, through traditional and molecular taxonomy**. 2001. Session 88D, Food Microbiology: General. 2001 IFT Annual Meeting - New Orleans, Louisiana

NAKAMURA, I. M. **Contribuição ao estudo da fécula de mandioca fermentada**. 1975. 79 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas.

NAKAMURA, I. M.; MORAIS, I. O.; MARTUCCI, E. T. Considerações sobre a tecnologia da fécula de mandioca fermentada: produção, propriedades físico-químicas e aplicação. **Científica**, Jaboticabal, v. 4, n. 2, p. 196- 202, 1976.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Samogy method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 135, p. 136-175, 1944.

NOUT, M. J. R.; KIERS, J. L. Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millennium. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 98, n. 4, p. 1-17, 2005.

OLIVEIRA, A. J.; ALCARDE, V. E.; CANOILAS, L. M.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Cultivo de Microrganismos em Mandioca e Subprodutos da Industrialização. In: **Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas**. 2002. v. 4, p. 269-279.

OYEWOLE, O. B.; ODUNFA, S. A. Characterisation and distribution of lactic acid bacteria in cassava fermentation during fufu production. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 2, p. 145-152, Feb. 1990.

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

PELCZAR Jr, J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R.; **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2. ed. 1996. v. 1, 524 p.

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

PEREIRA, J. **Caracterização química, física, estrutural e sensorial do pão de queijo**. 2001. 222 p. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

PLATA-OVIEDO, M. S. V. **Secagem do amido fermentado de mandioca: modificação química relacionada com a propriedade de expansão e características físico-químicas**. 1998. 114 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas.

RIBEIRO, M. C.; SOARES, M. M. S. R. **Microbiologia prática: roteiro e manual – bactérias e fungos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 112 p.

RIVERA, H. H. P. **Fermentação de amido de mandioca (Manihot esculenta, Crantz): avaliação e caracterização do polvilho azedo**. 1997. 114 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

SCHWAN, R. F.; ROSE, A. H. Polygalacturonase production by *kluveromyces marxianus*: effect of médium composition. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 76, n. 1, p. 62-67, Jan. 1994.

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

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R. C.; REIS, M. S. Melhoria da Soja. In: Ed. : BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817 p.

SHIMADZU. **Application data book**. Japan: Shimadzu, 1998. 104 p. (Catálogo C190-E001).

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

STEINKRAUS, K. H. **Handbook of indigenous fermented foods**. 2. ed. rev. and exp. New Yoerk: Marcel Dekker, 1996.

STEINKRAUS, K. H. Lactic acid fermentation in the production of foods from vegetables, cereals and legumes. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 49, n. 3, p. 337-348, 1983.

STEINKRAUS, K. H. Nutritionally significant indigenous foods involving and alcoholic fermentation. In: GASTINEAU, C. F.; DARBY, W. J.; TURNER, T. B. (Ed.). **Fermented food beverages in nutrition**. New York: Academic Press, 1979.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; CASALI, A. K. . **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

WAGLEY, C. **Lágrimas de boas vindas; Os Índios Tapirapé do Brasil Central**. Belo Horizonte: Itatiaia; São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1988.

WALKER, G. M. **Yeast physiology and biotechnology**. Ed. John Wiley, 1998. 350 p.

(3º GRAU NOTÍCIAS). Pesquisa em internet. Disponível em:

<<http://www.kidlink.org/portuguese/kidproj/indios/2000/tapirape7lmayra.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2005.

<<http://www.ucm.es/info/museoafc/loscriminales/antropologia/bebidas>>. Acesso em: 28 jan. 2005.

<<http://www.unemat.br/~indigena/jornal9/noticia08.htm>>. Acesso em: 28 jan. 2005.

(kidlink, 2005). Pesquisa em Internet disponível em:

(Museu do índio, 2005). Pesquisa em Internet disponível em:

(TORAL, 1994), ANDRÉ AMARAL DE TORAL. Pesquisa em Internet disponível em: <<http://www.socioambiental.org/pib/epi/tapirape/tapirape.shtm>>. Acesso em: 28 jan. 2005.