

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

FERNANDA BARBOSA PILO

**Leveduras e bactérias lácticas associadas às *chichas*, bebidas
tradicionais produzidas no Equador**

Belo Horizonte

2014

FERNANDA BARBOSA PILÓ

Leveduras e bactérias lácticas associadas às *chichas*, bebidas tradicionais produzidas no Equador

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Microbiologia.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa
ICB/UFMG

Coorientador: Prof. Dr. Enrique Javier Carvajal Barriga - PUCE - Quito - Equador

Coorientadora: Profa. Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes - CEFET/MG

Belo Horizonte

2014

043

Piló, Fernanda Barbosa.

Leveduras e bactérias lácticas associadas às *chichas*, bebidas tradicionais produzidas no Equador [manuscrito] / Fernanda Barbosa Piló. – 2014.

93 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Carlos Augusto Rosa. Coorientador: Enrique Javier Carvajal Barriga. Coorientadora: Fátima de Cássia Oliveira Gomes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Bactérias. 3. Ácido láctico. 4. Alimentos Fermentados. 5. Chicha (Bebida). I. Rosa, Carlos Augusto. II. Barriga, Enrique Javier Carvajal. III. Gomes, Fátima de Cássia Oliveira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE FERNANDA BARBOSA PILO
Nº REGISTRO: 2010716889

Relatora e Suplente: Dra. Jandora Severo Poli

Suplente externo: Dra. Mariana de Lourdes Almeida Vieira

Co-orientadora: Fátima de Cássia Oliveira Gomes - (CEFET/MG),

Às 14:00 horas do dia 29 de abril de 2014, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Fernanda Badotti (FIOCRUZ/MG), Inayara Cristina Alves Lacerda (Faculdade de Farmácia/UFMG), Fabiana Ribeiro Viana (FUNED) e o Prof. Carlos Augusto Rosa - Orientador, para julgar o trabalho final "Leveduras e bactérias lácticas associadas à chicha, uma bebida tradicional produzida no Equador", da aluna **Fernanda Barbosa Piló**, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de abril de 2014.

Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes

Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Dra. Fernanda Badotti

Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda

Dra. Fabiana Ribeiro Viana

Prof. Carlos Augusto Rosa (Orientador)

Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

AGRADECIMENTOS

A meu orientador Carlos Rosa, por ter me apresentado com este projeto tão especial. Agradeço-lhe também pelos inúmeros conselhos, incontáveis conversas e, sobretudo, pela sua paciência inesgotável...

Ao meu coorientador Javier Carvajal, por ter aceitado de imediato fazer parte do projeto e por ter me recebido de braços abertos nas duas vezes em que estive em seu laboratório.

A minha coorientadora Fátima, por sua solicitude e por estar ao meu lado, em todos os momentos que precisei de sua ajuda.

Aos professores Luiz Rosa e Susana Johann, pela convivência e contribuições ao longo desses quatro anos.

Aos Doutores Jacques Nicoli, Inayara Lacerda, Fernanda Badotti e Fabiana Viana, por terem aceitado compor a banca examinadora.

Às Doutoras Jandora Poli e Mariana Vieira, por terem aceitado compor a banca como suplente interna e externa, respectivamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro durante todo o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro na realização do estágio de doutorado sanduíche no exterior.

Aos meus queridos companheiros do laboratório Colección de Levaduras Quito Católica (CLQCA)/Centro Neotropical para Investigación de la Biomasa da Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Bernardo, Carito, Carolin, Cris, Edgar, Geno, Michael, Nadia, Patricia, Sebastian e Silvy, por toda ajuda na execução do meu trabalho, pelas conversas e pelos momentos de descontração.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Adriana Lessa, Alexandre, Alice, Ana Paula, Ana Raquel, Arthur, Bárbara, Bia, Camila Carvalho, Camila de Ponzzes, Camila Gontijo, Camila Silva, Carla Lara, Carla Pataro, César, Cristiane Bigatti, Cristina Guamán, Débora, Denise, Diogo, Fran, Gabriela Montandon, Gabriella Bredder, Gislaine, Grazielle, Iara, Isabel, Isis, Jandora, Larissa, Laura, Letícia, Lília, Luciana, Maria Theresa, Mariana Costa, Mariana Rezende, Mariana Rocha, Mariana Vieira, Marina, Michelle, Monaliza, Natália, Nívea, Priscila Boggione, Priscila Carvalho, Rafael, Raquel, Renata, Silvana, Thelma, Valéria e Vívian, pela boa convivência, pela ajuda e por fazerem dos meus dias, dias melhores. Um agradecimento especial ao César, pela paciência e por ter disponibilizado um pouco do seu tempo para me ajudar na padronização de certa metodologia; ao Arthur, por seu bom humor cativante e por ter me ajudado durante um ano e meio no desenvolvimento do meu trabalho; à Larissa pela boa vontade em me ajudar na preservação dos micro-organismos; às Camilas, pelo otimismo e por sempre torcerem por mim; à Nati e Rê, pelos conselhos e pela amizade de longos anos; e, finalmente, às queridas amigas Iara, Mari Vieira e Quel, pela preocupação, pelas inúmeras conversas e, sobretudo, pela constante motivação.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, em especial Ariane, pela boa vontade e por toda ajuda durante esses quatro anos.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB), da Faculdade de Farmácia, Ana, Cosme, Elaine, Fernanda e Luciana, pela disposição, vontade em ajudar e pelas inúmeras conversas.

Ao Douglas e à Patrícia, da secretaria de Pós-Graduação e à Gina, da Secretaria de Microbiologia, pela atenção.

A meus pais e à Gra, pelas conversas, pelos conselhos e por estarem sempre ao meu lado.

À mamãe e Tia Luda, que disponibilizaram um pouco de seu tempo, para a correção do português.

Às minhas tias, Cláudia, Cleide, Cleuza, Luda e Pollyana; e à querida vovó Dulce, pelo carinho e preocupação durante toda essa longa jornada.

A meus tios, Délio, Delmo, Geraldo e José Eduardo, pelo constante interesse e pela preocupação.

A minhas queridas amigas Amanda, Anna Carolina, Anna Rita, Camila, Gabriela, Isabella, Juliana, Letícia e Tássia, pela preocupação e pelo incentivo.

Ao Bruno, pelo carinho, incentivo e paciência.

“O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. Todo caminho da gente é resvaloso. Mas; também, cair não prejudica demais - a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 FERMENTAÇÃO	19
2.2 BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONAIS	20
2.2.3 Chicha	22
2.2.3.1 Definição	22
2.2.3.2 Matéria-prima e processamento.....	24
2.2.3.3 Composição e valor nutricional	30
2.2.3.4 Armazenamento e conservação.....	30
2.3 MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONAIS.....	31
2.3.1 Leveduras associadas às fermentações tradicionais	17
2.3.2 Bactérias do ácido láctico associadas às fermentações tradicionais.....	20
2.3.3 Microbiota da <i>chicha</i>.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL.....	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	25
4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	26
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS	26
4.3.1 Isolamento de leveduras	26

4.3.2	Identificação de leveduras	27
4.3.2.1	Extração de DNA de leveduras.....	27
4.3.2.2	PCR <i>fingerprinting</i>	27
4.3.2.3	PCR com os iniciadores NL1 e NL4.....	28
4.3.2.4	Purificação dos amplicons	29
4.3.2.5	Reação de sequenciamento	29
4.4	ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)	29
4.4.1	Extração do DNA mitocondrial	29
4.4.2	Digestão do DNA mitocondrial	29
4.5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS	30
4.5.1	Isolamento de bactérias lácticas	30
4.5.2	Identificação de bactérias lácticas.....	30
4.5.2.1	Extração de DNA de bactérias lácticas.....	30
4.5.2.2	Agrupamento por RFLP	31
4.5.2.3	PCR com os iniciadores 27F e 1492R	31
4.5.2.4	Purificação dos amplicons e Sequenciamento	32
4.6	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	32
4.6.1	Determinação de pH	32
4.6.2	Determinação dos açúcares redutores totais (ART)	32
4.6.3	Dosagem de etanol	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	LISTA DE VERIFICAÇÃO DAS <i>CHICHAS</i>.....	33
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS	37
5.2.1	Isolamento e identificação de leveduras	41
5.2.2	Análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial	47
5.2.3	Isolamento e identificação de bactérias lácticas	51
5.3	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	56
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

APÊNDICE A. Lista de verificações aplicada durante as coletas das <i>chichas</i>	74
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coexistência entre BAL, leveduras e outros micro-organismos em algumas bebidas fermentadas tradicionais.....	17
Tabela 2. Distribuição e atividades principais de espécies de leveduras em bebidas e alimentos fermentados.	19
Tabela 3. Locais de coletas e matérias-primas das amostras de <i>chichas</i> do Equador.	34
Tabela 4. Contagens de leveduras e bactérias lácticas em <i>chichas</i> do Equador.	38
Tabela 5. Contagens de leveduras e bactérias lácticas em <i>chicha</i> de <i>jora</i> coletada em diferentes tempos de fermentação.	40
Tabela 6. Espécies e contagens populacionais de leveduras obtidas para as <i>chichas</i> de arroz, <i>morocho</i> , sete grãos, <i>yuca</i> e <i>jora</i>	44
Tabela 7. Ocorrência de leveduras em <i>chicha</i> de <i>jora</i> com diferentes tempos de fermentação.	46
Tabela 8. Perfis de restrição do mtDNA de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durante cinco dias de fermentação em uma amostra de <i>chicha</i> de <i>jora</i>	49
Tabela 9. Perfis de restrição do mtDNA de linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidos para as <i>chichas</i> de sete grãos, <i>yuca</i> e <i>jora</i>	50
Tabela 10. Espécies e contagens populacionais de bactérias do ácido láctico obtidas para as <i>chichas</i> de arroz, sete grãos, <i>yuca</i> e <i>jora</i>	55
Tabela 11. Parâmetros físico-químicos determinados para as amostras de <i>chichas</i> coletadas no Equador.	59
Tabela 12. Parâmetros físico-químicos determinados para uma <i>chicha</i> de <i>jora</i> durante cinco dias de fermentação.	62

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Chicha* de *jora* (milho) do Equador.....23
- Figura 2.** Estroma do fungo *Cyttaria hariotti* em *Nothofagus betuloides* (Foto: Diego Libkind).....24
- Figura 3.** Ingredientes utilizados no preparo da *chicha* de *jora*. (A) anis-estrelado (*Illicium verum*); (B) *naranjilla* (*Solanum quitoense*); (C) *cedrón* (*Aloysia citrodora*); (D) *hierba luisa* (*Cymbopogon citratus*).....26
- Figura 4.** Produção da *chicha* de *jora*. (A) adição da farinha de *jora* à água fria; (B) adição da mescla à infusão fervente de folhas de *cedrón* (cidrão); (C) cozimento da mistura; (D) filtração do mosto; (E) bebida filtrada e *afrecho* (farelo) obtido da filtração; (F) adição de pedaços de rapadura à bebida; (G) bebida após adição de rapadura; (H) *chicha* com 24 horas de fermentação.27
- Figura 5.** *Chicha* de *Yamor* (Equador).....28
- Figura 6.** Produção da *chicha* de *yuca*. (A) cozimento da mandioca já descascada; (B) mandioca cozida; (C) mandioca sendo amassada; (D) mastigação da mandioca; (E) mandioca com 24 horas de fermentação; (F) frutos de *Ungurahua*; (G) *chicha* de *yuca* pronta.....29
- Figura 7.** Mapa do Equador (Fonte: CNIB, PUCE). Áreas delimitadas por círculos indicam as províncias onde foram realizadas as coletas de amostras de *chichas*....25
- Figura 8.** Perfis de restrição do mtDNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos da *chicha* de *jora* em diferentes tempos de fermentação. Coluna: 1: 1Kb DNA ladder; 2-7: perfis encontrados com um dia de fermentação (2-4: perfil I; 5: perfil II; 6-7: perfil III); 8-10: perfis encontrados com dois dias de fermentação (8-9: perfil I; 10: perfil II); 11-15: perfis encontrados com três dias de fermentação (11-13: perfil II; 14-15: perfil III); 16-17: perfis encontrados com cinco dias de fermentação (16: perfil III; 17: perfil IV).48
- Figura 9.** Perfil de digestão de *Lactobacillus* spp. isolados de uma amostra de *chicha* de *jora*. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Lactobacillus casei* (*Hinfl*, *Haelll*, *MspI*); 5-7: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*Hinfl*, *Haelll*, *MspI*); 8-10: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*Hinfl*, *Haelll*, *MspI*).52

Figura 10. Perfil de digestão de *Lactobacillus* spp. isolados de uma amostra de chicha de sete grãos. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I); 5-7: perfil de *Lactobacillus fermentum* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I); 8-10: perfil de *Lactobacillus fermentum* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I); 11-13: *Lactobacillus fermentum* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I); 14-16: *Lactobacillus acidophilus* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I).53

RESUMO

As *chichas* são as bebidas tradicionais mais antigas da América do Sul. Essas bebidas, tradicionalmente produzidas principalmente a partir do milho, estiveram presentes em várias culturas indígenas, sobretudo na cultura Inca, onde notadamente tiveram um papel chave em celebrações religiosas. Apesar da importância histórica e cultural das *chichas* e de ainda estarem presentes nos hábitos alimentares das populações de diversos países latino-americanos, existem poucos estudos contemplando a diversidade microbiológica dessas bebidas. Este trabalho teve como objetivos identificar por métodos moleculares as leveduras e bactérias lácticas de diferentes *chichas* do Equador, bem como diferenciar molecularmente as linhagens da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e avaliar os parâmetros físico-químicos de pH, açúcares redutores totais, etanol e ácido láctico da bebida. Um total de quarenta e sete amostras de *chichas*, uma de arroz, duas de *morocho* (variedade de milho branco), três de sete grãos (sete variedades de milho), cinco de *yuca* (mandioca) e trinta e seis de *jora* (milho maltado), foram coletadas em duas regiões do Equador. As leveduras e bactérias do ácido láctico (BAL) foram isoladas em 45 e 42 amostras, respectivamente. As contagens de BAL ($1,93 \times 10^7$ a $6,97 \times 10^8$ UFC/mL) foram mais altas que as de leveduras ($3,0 \times 10^5$ a $1,12 \times 10^8$ UFC/mL). Dos 116 isolados de BAL identificados, obteve-se 11 espécies. *Lactobacillus fermentum* e *L. plantarum* foram as espécies de BAL mais prevalentes, encontradas em 61,1% e 55,5% das amostras, respectivamente. Os 295 isolados de leveduras obtidos foram identificados em 30 espécies. *Saccharomyces cerevisiae* foi a espécie de levedura mais prevalente, sendo encontrada em 78,7% das amostras, variando de $3,33 \times 10^4$ a $8,67 \times 10^7$ UFC/mL. Outras leveduras encontradas com maior frequência nas *chichas* analisadas compreenderam *Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora* spp., *Pichia kudriavzevii* e *Galactomyces geotrichum*. Dentre os 122 isolados de *S. cerevisiae*, 69 diferentes perfis moleculares de DNA mitocondrial (mtDNA) foram encontrados. Uma *chicha* de *jora* analisada em tempos diferentes de fermentação (0 a 5 dias) apresentou 16 isolados de *S. cerevisiae*, os quais foram agrupados em quatro diferentes perfis. Apenas um desses quatro perfis manteve-se até o final da fermentação. A *chicha* de sete grãos foi a que apresentou um maior número de perfis de restrição do mtDNA de linhagens de *S. cerevisiae* por amostra, no entanto, foi também a bebida com maior número de isolados de *S. cerevisiae* por

amostra. Os valores de pH obtidos, que variaram de 2,62 a 4,15, foram semelhantes aos encontrados para outras bebidas fermentadas tradicionais. A quantidade de açúcares redutores totais (ART) variou significativamente, de 1,63 g/L a 38,68 g/L, devido, possivelmente à variedade de ingredientes e à fermentação não controlada. O ácido láctico, que variou desde valores não detectáveis até 6,90 g/L, foi encontrado em 32 amostras. O etanol foi encontrado em 25 amostras, em baixas quantidades. Os valores de etanol variaram desde valores não detectáveis até 5,87% v/v. As diferentes *chichas* do Equador podem ser consideradas bebidas fermentadas ácidas, produzidas a partir de uma associação de bactérias do ácido láctico, sobretudo espécies de lactobacilos, com *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces*.

ABSTRACT

The *chicha* are the oldest traditional beverage of South America. These traditional beverages are produced mainly from maize, but can be made with other raw materials. The *chichas* have been present in many indigenous cultures, notably in the Inca culture, playing a key role in religious celebrations. Despite the historical and cultural importance of *chichas* and the fact that they are still present in food habits of the populations of several Latin American countries, there are few studies evaluating the microbial diversity of these beverages. This study aimed to identify yeasts and lactic acid bacteria associated with different *chichas* from Ecuador, by molecular methods, as well as evaluate the physical-chemical parameters of pH, total reducing sugars, ethanol and lactic acid of beverages. A total of forty-seven samples of *chichas* were collected in two regions of Ecuador [one *chicha* of rice, two *chichas* of *morocho* (variety of white maize), three *chichas* of seven grains (seven grain varieties), five *chichas* of *yuca* (cassava) and thirty-six *chichas* of *jora* (maize malted)]. The yeasts and lactic acid bacteria (BAL) were isolated in 45 and 42 samples, respectively. The counts of lactic acid bacteria (1.93×10^7 to 6.97×10^8 cfu/mL) were higher than those of yeasts (3.0×10^5 to 1.12×10^8 cfu/mL). From the 116 BAL isolates 11 different species were identified. *Lactobacillus fermentum* and *L. plantarum* were the most prevalent species of BAL being found in 61.1% and 55.5% of samples, respectively. The 295 yeast isolates obtained were shown to belong to 30 species. *Saccharomyces cerevisiae* is the most prevalent species of yeast, being found in 78.7% of samples, ranging from 3.33×10^4 to 8.67×10^7 cfu/mL. Other yeasts were also found in *chichas* included *Torulaspora delbrueckii*, *Hanseniaspora* spp., *Pichia kudriavzevii* and *Galactomyces geotrichum*. Among the 122 isolates of *S. cerevisiae*, 69 different molecular profiles of mitochondrial DNA (mtDNA) have been found. A *chicha* of *jora* analyzed at different fermentation times (0 to 5 days) presented 16 isolated from *S. cerevisiae*, which have been grouped into four different profiles. Only one of these four profiles could be found during all times of fermentation analyzed. The *chicha* of seven grains showed the greater diversity of *S. cerevisiae* strains per sample based on mtDNA restriction profiles. However, it was also the beverage with the highest number of *S. cerevisiae* isolates per sample. The pH values obtained, ranging from 2.62 to 4.15, were similar to those found for other traditional fermented beverages. The amount of total reducing sugars (TRS) varied

significantly, from 1.63 g/L to 38.68 g/L, possibly due to the variety of ingredients and uncontrolled fermentation. The lactic acid concentration values ranged from not detectable to 6.90 g/L and it was found in 32 samples. The ethanol was found in 25 samples in small amounts, ranged from undetectable amounts to 5.87% v/v. The different *chichas* of Ecuador can be considered acid fermented beverages produced from a combination of lactic acid bacteria, mainly lactobacilli species, with *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeasts.

1 INTRODUÇÃO

As *chichas* são bebidas tradicionais da América Latina, sobretudo dos países andinos da América do Sul, como Bolívia, Colômbia, Equador e Peru, que podem ser produzidas a partir de diversas matérias-primas, sendo o milho a mais comum. Apesar da *chicha* mais antiga ser preparada a partir da *jora* (milho maltado), hoje em dia o nome é considerado genérico e refere-se a uma multiplicidade de bebidas, fermentadas ou não, preparadas a partir de outras matérias-primas, tais como tubérculos (mandioca e batata-baroa), cereais (arroz, aveia e quinoa), frutos (abacaxi e banana) e cana-de-açúcar.

Essas bebidas são consumidas há centenas e, talvez até milhares de anos, pela população indígena da América do Sul. Por estarem presentes em cerimônias de adorações a deuses e por fazerem parte também da alimentação da população indígena, pode-se dizer que as *chichas* tiveram grande importância histórica nas culturas indígenas antigas, sobretudo, na cultura Inca.

O consumo de *chichas* ainda faz parte dos hábitos alimentares de grande parte das populações dos países latino-americanos, principalmente os andinos. As *chichas* são produzidas para o consumo familiar ou então em maior quantidade para a venda em mercados, bares e restaurantes e também para a comemoração de eventos religiosos e festividades, que ocorrem em datas especiais.

Apesar de terem sofrido algumas modificações nas receitas e na forma de produção, como a diminuição no tempo de preparo, a adição de ingredientes, como o açúcar, a substituição dos vasos de barro pelas panelas de alumínio e pelos baldes de plástico, essas bebidas são ainda produzidas em condições artesanais e com pouca tecnologia de produção. A fermentação predominante é a espontânea e os micro-organismos são responsáveis pela introdução de múltiplos sabores e aromas, que resultam na produção de uma bebida única. Os micro-organismos podem também ser responsáveis por características indesejáveis algumas vezes presentes na bebida, como a alta acidez.

Dos poucos trabalhos publicados sobre a microbiologia das *chichas*, a maioria contempla a caracterização de leveduras e bactérias de *chichas* de *jora* do Peru, e quase nada se tem descrito sobre a microbiota de *chichas* do Equador. O Equador é subdividido em três regiões geográficas e cada qual apresenta uma *chicha* característica, como, por exemplo, a de cana-de-açúcar, a de *jora* e a de *yuca*

(mandioca), típicas das regiões costeira, andina e amazônica, respectivamente. As *chichas* de *jora* e mandioca representam um importante legado deixado pelas culturas indígenas, pois ainda hoje são produzidas pela população indígena e mestiça do país.

Levando-se em conta o exposto acima, como a importância que as *chichas* representam para a história e cultura humana e a necessidade do conhecimento da microbiota dessas bebidas, e, ainda, tendo em vista o baixo número de estudos sobre a microbiota responsável pela fermentação, este trabalho visa à identificação molecular de espécies de leveduras e bactérias lácticas, de diferentes *chichas* do Equador bem como à caracterização físico-química dessas bebidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 FERMENTAÇÃO

A fermentação de alimentos é uma das tecnologias de processamento de alimentos mais antigas conhecidas pela humanidade. Os primeiros relatos do uso desta tecnologia datam de períodos anteriores ao nascimento de Cristo (FOX, 1993). Derivada da palavra latina *fervere*, a fermentação foi definida por Louis Pasteur como “La vie sans l’air” (a vida sem ar). Do ponto de vista bioquímico, a fermentação é um processo metabólico de obtenção de energia a partir de compostos orgânicos, sem o envolvimento de um agente oxidante externo (BOURDICHON et al., 2012).

Ao longo da história, a preparação dos alimentos e bebidas fermentados foi realizada de forma artesanal, sem conhecimento nenhum sobre o papel dos micro-organismos envolvidos (BLANDINO et al., 2003). No entanto, a partir da metade do século dezenove, duas mudanças significativas realizaram o entendimento do processo da fermentação. Essas mudanças compreenderam a Revolução Industrial, que resultou em um aumento populacional e, conseqüentemente, em uma maior produção de alimentos fermentados e o surgimento da Microbiologia como ciência, em meados de 1850, o que permitiu a formação da base biológica da fermentação e, assim, o conhecimento deste processo (CAPLICE & FITZGERALD, 1999).

Os alimentos fermentados devem ter começado como processos naturais nos quais a disponibilidade de nutrientes e as condições ambientais selecionaram micro-organismos particulares, os quais modificaram e preservaram o alimento (CAMPBELL-PLATT, 1994). Os principais papéis exercidos pela fermentação no processamento dos alimentos são: a preservação dos alimentos por meio da formação de metabólitos inibitórios como ácidos orgânicos, etanol e bacteriocinas; aumento da segurança do alimento por meio da inibição de patógenos ou remoção de compostos tóxicos; aumento do valor nutricional e conferência de qualidade organoléptica para o alimento (BOURDICHON et al., 2012).

Em países em desenvolvimento, a fermentação é especialmente importante, uma vez que reduz a perda de matérias-primas, aumenta a biodisponibilidade de micronutrientes e a qualidade das proteínas, aumenta a digestibilidade de carboidratos e, ainda, contribui substancialmente para a segurança alimentar, por

meio da eliminação de compostos cianogênicos (JESPERSEN, 2003; ROMANO et al., 2006). Algumas variedades de mandioca amarga contém o glicosídeo cianogênico linamarina, que ao ser hidrolisado no trato gastrointestinal, libera o cátion cianeto, o qual é absorvido no trato digestivo superior e bloqueia então a ação da enzima citocromo oxidase. Na fermentação, a enzima endógena linamarase hidrolisa a linamarina, tornando a mandioca segura para o consumo (CAMPBELL-PLATT, 1994).

Atualmente, a fermentação visa trazer sabores únicos e outros benefícios para os alimentos, de uma forma 100% natural. Dessa forma, são propostas duas abordagens. A primeira consiste em transformar um produto tradicional, de produção caseira, em um processo de larga escala. Como exemplos tem-se o *kefir*, bebida láctica fermentada, levemente alcoólica, tradicionalmente consumida por milhões de pessoas, sobretudo da Europa Oriental e o *kvass*, bebida originária da Rússia, produzida a partir das sobras de comida, sobretudo de pães. A segunda abordagem consiste em transferir um processo de fermentação de larga escala, bem sucedido, para outros alimentos. Como exemplo dessa abordagem tem-se novamente o *kefir*, cuja cultura tem sido utilizada na fermentação de outros substratos, como sucos de frutas, resultando no *kefir* de frutas. O *kombucha*, também se insere na segunda abordagem, uma vez que seus micro-organismos foram utilizados na fermentação do malte, originando as bebidas não alcoólicas *Bionade* (na Alemanha) e *Tumult* (na França) (HUGENHOLTZ, 2013).

2.2 BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONAIS

Alimentos fermentados indígenas ou tradicionais referem-se àqueles produtos que, desde o início da história, têm formado parte integral da dieta e que podem ser preparados nas próprias casas ou em pequena escala industrial, usando equipamentos e técnicas simples (AIDOO et al., 2006). Dentre as matérias-primas mais utilizadas nas fermentações indígenas ou tradicionais estão os cereais, os legumes e as raízes tuberosas (ROMANO et al., 2006).

Uma grande diversidade de alimentos tradicionais é produzida na África, Ásia e América (Central e do Sul). Estes alimentos são importantes na vida diária das populações e, de acordo com Lappe-Oliveras et al. (2008), exercem um papel importante na identificação cultural dos povos. Apesar da maioria dos alimentos

destes continentes serem ainda produzidos por meio de fermentação espontânea, alguns já são produzidos em escala industrial, o que contribui para o aumento do valor nutricional, da qualidade higiênica e da vida de prateleira dos alimentos fermentados, como salienta Lappe-Oliveras et al. (2008).

Dentre as bebidas alcoólicas fermentadas tradicionais produzidas na África, pode-se citar o *munkoyo*, o *busaa* e o *chikokivana*, à base de milho, o *agadagigi*, à base de banana, o *palm wine*, à base da seiva da palma e o *pito*, *dolo* e *burukutu*, à base de sorgo. As cervejas produzidas a partir do milho da Guiné (*Sorghum vulgare*) são as bebidas alcoólicas africanas mais estudadas. Já as bebidas *kaffir* e *doro* são provavelmente as únicas bebidas fermentadas tradicionais produzidas por processos industriais modernos (JESPERSEN, 2003).

Na Ásia, também são encontrados diversos alimentos e bebidas fermentados. Apesar de diversos produtos serem obtidos por fermentação natural, o uso de culturas iniciadoras é difundido. As bebidas fermentadas podem ser divididas em vinhos produzidos com iniciadores amilolíticos e bebidas fermentadas produzidas a partir de sucos açucarados. O primeiro grupo compreende *saké*, *yakju* e *takju*, *tapuy*, *ruou nep* e *jnard*. O segundo grupo inclui os vinhos de palma e *kombucha*, bebida à base de chá e de açúcar (AIDOO et al., 2006). O vinho de arroz, nome genérico que se refere a bebidas alcoólicas produzidas a partir de cereais, sobretudo o arroz, pode ser dividido em dois tipos de bebidas, os vinhos de arroz, propriamente ditos, e as cervejas de arroz. Os primeiros, conhecidos como *shaosingjiu* na China, *cheongju* na Coreia e *sake* no Japão, são bebidas mais claras, com teor alcoólico em torno de 15%. Já as cervejas de arroz correspondem às bebidas *takju* na coreia e *tapuy* nas Filipinas, bebidas turvas, de teor alcoólico inferior a 8%, que contêm sólidos em suspensão e leveduras vivas (RHEE et al., 2011).

Na Turquia, são também produzidas inúmeras bebidas fermentadas não alcoólicas, a partir de cereais, frutas, tubérculos e leite. Dentre estas bebidas, pode-se citar o *shalgam juice*, produzido a partir de uma mistura de nabos e cenoura preta, o *hardaliye*, à base de uva, o *boza*, à base de painço, milho, trigo ou arroz, o *ayran*, à base de iogurte e o *kefir*, uma bebida viscosa, carbonatada e levemente espumosa, produzida a partir da fermentação do leite de vaca, ovelha, cabra ou outro tipo de leite (ALTAY et al., 2013).

No México, desde períodos pré-Hispânicos, as civilizações fermentavam uma variedade de plantas nativas para a produção de bebidas alcoólicas. Os agaves

(*Agave* spp.) têm sido as plantas mais importantes e amplamente utilizadas no México. Dentre as bebidas alcoólicas fermentadas à base de agave, pode-se citar a *pulque*, bebida não destilada, que utiliza a seiva do agave como substrato, e o *mezcal*, a *tequila*, a *raicilla* e a *bacanora*, bebidas destiladas, produzidas a partir do mosto do agave. A bebida *pulque*, provavelmente a mais antiga e mais tradicional bebida alcoólica mexicana, é produzida atualmente em escala industrial, com o uso de culturas iniciadoras. *Tequila*, *mezcal*, *bacanora* e *raicilla* são nomes específicos de bebidas destiladas obtidas de espécies de *Agave*. Os processos de elaboração dos diferentes tipos de *mezcal* são mais tradicionais, feitos em pequenas destilarias, com baixos níveis de produção, em comparação com a indústria da *tequila* (LAPPE-OLIVERAS et al., 2008). No Sudeste do México, também são produzidas bebidas à base de milho, como o *pozol*. Essa bebida, produzida pela população indígena e mestiça, é preparada a partir da massa de milho fermentada e é similar à bebida *chicha*, da América Latina (SAINZ et al., 2001).

Na América do Sul, dentre as diversas bebidas fermentadas tradicionais, pode-se citar a cachaça, bebida alcoólica destilada, produzida a partir do suco da cana de açúcar, *chicha*, uma bebida fermentada à base de amido, *masato*, uma bebida obtida das raízes da mandioca, *champús*, uma bebida popular, à base de cereal e de baixo teor alcoólico, o *cauim*, uma bebida produzida a partir da fermentação da mandioca, arroz, milho ou amendoins, pelos índios brasileiros (tribo *Tapirapé* ou *Tapitiãwa*) e o *caxiri*, bebida alcoólica, produzida a partir da mandioca e da batata-doce, pelos povos indígenas brasileiros *Juruna* ou *Yudjá* (GOMES et al., 2010; RAMOS et al., 2010; SANTOS et al., 2012).

2.2.3 Chicha

2.2.3.1 Definição

A *chicha* é uma bebida fermentada alcoólica, clara, de coloração amarela e espumante, que lembra o sabor da sidra e que foi consumida pela população indígena andina por centenas de anos (STEINKRAUS, 1996) (Fig.1). A produção de *chicha* data de períodos anteriores à civilização Inca. Sabe-se que essa bebida teve um papel central no ritual Inca, na capital imperial de Cuzco e nas províncias e

continuou sendo importante durante os períodos coloniais e republicanos (ORLOVE & SCHMIDT, 1995).

A *chicha* é produzida nas regiões dos Andes e, algumas vezes, em regiões de baixa altitude do Equador, Brasil, Peru, Bolívia, Colômbia e Argentina (STEINKRAUS, 1996). Alguns autores acreditam que o nome *chicha* foi introduzido na América do Sul pelos espanhóis, uma vez que, anteriormente, a bebida era designada como *aqha* ou *asiva* (GOMES et al., 2010; VALLEJO et al., 2013). No entanto, existem algumas vertentes que explicam a origem desse nome. Uma delas acredita que o nome é proveniente da palavra *chichab*, língua original falada no território atual do Panamá, e que significa milho. Outra acredita que a palavra deriva do nome *Chibcha*, civilização que povoou a Colômbia e o Panamá. E, há ainda uma vertente que relaciona o nome à etnia boliviana nomeada *Chichas* (GOMES et al., 2010).



Figura 1. *Chicha de jora* (milho) do Equador.

O nome *chicha* é um nome genérico que compreende uma série de bebidas fermentadas ou não, que podem ser preparadas a partir de diversas matérias-primas, como cereais, incluindo o milho, e frutas (VALLEJO et al., 2013). Em alguns países andinos é produzida a *chicha morada*, bebida à base de milho roxo. O milho roxo é uma variedade pigmentada de *Zea mays* L., originário, principalmente, do Peru e Bolívia. Essa bebida é preparada fervendo-se o milho roxo com abacaxi, casca de marmelo, canela e cravo (LAGO et al., 2013; SCHWARZ et al., 2003).

2.2.3.2 Matéria-prima e processamento

Na região Central dos Andes é produzida uma *chicha* à base dos frutos da planta *Schinus molle* (Anacardiaceae) (Fig.2). O preparo dessa bebida consiste em uma fervura inicial, por meia hora, dos frutos sem casca. Ingredientes adicionais, como canela, cravo e cana-de-açúcar, são também utilizados. Depois de resfriada, a bebida é colocada em vasos e deixada em repouso, para fermentar (GOLDSTEIN & COLEMAN, 2004).

A comunidade *mapuche*, representada por indígenas que habitaram as florestas da Argentina e do Chile, produzia uma *chicha* a partir do estroma de fungos do gênero *Cyttaria* (Fig.2). Esses fungos são parasitas obrigatórios de diversas espécies de árvores do gênero *Nothofagus*. A *chicha* deve ter sido produzida, provavelmente, a partir da fermentação espontânea do suco obtido da maceração dos estromas dos fungos ou, simplesmente, deixando os estromas dos fungos imersos em água fervida resfriada. No entanto, esta tradição de preparo da *chicha* de *Cyttaria* foi perdida e, atualmente, os estromas são consumidos frescos, como parte da alimentação (GOMES et al., 2010).



Figura 2. Estroma do fungo *Cyttaria hariotti* em *Nothofagus betuloides* (Foto: Diego Libkind).

No Equador, como no restante da região andina, a *chicha* de milho mais comum é a *chicha* de *jora*. Esta *chicha* é preparada a partir do grão de milho

amarelo (*maíz amarillo*) maltado (germinado e seco) ou mastigado. No processo de produção da *chicha* de *jora*, a hidrólise do amido é obtida pelo processo de malteação dos grãos de milho ou pela ação das amilases salivares, no caso da mastigação (STEINKRAUS, 1996). A hidrólise do amido é requerida porque o grão, como de milho, arroz, trigo e cevada, não pode ser utilizado diretamente na produção da bebida, uma vez que seu sistema enzimático não está capacitado para transformar o amido, presente nas células do endosperma, em açúcares fermentáveis. A sacarificação ou hidrólise do amido pode ser ácida ou enzimática. A via da hidrólise enzimática inclui a utilização do malte. O processo de obtenção do malte ou malteação consiste nas etapas de maceração (embebição), germinação e secagem. Na maceração, ocorre a hidratação do grão, com a consequente ativação do metabolismo. Na germinação, ocorre a transformação das substâncias de reserva e na secagem, o objetivo principal é o encerramento dos processos químico-biológicos. Durante a germinação são formadas várias enzimas, como as β -glucanases, α -amilases, β -amilases, parte das hemicelulases e proteases, resultantes de modificações bioquímicas do grão. As α -amilases e β -amilases serão responsáveis pela hidrólise do amido (BELETI et al., 2012; FARIAS et al., 2009).

Para a preparação de malte de milho, o grão é primeiro embebido em água durante um dia. A maceração é necessária para alcançar uma umidade favorável à germinação dos grãos. Após um dia de imersão do milho em água, a água é drenada e o milho é colocado para germinar (em cestos de palha) durante um período de 13 dias. Uma vez germinado, o milho é colocado em esteiras de palha ou em lonas de plástico sob o sol, por dois dias, para secar completamente, interrompendo a atividade enzimática dentro do grão. Após a secagem, os grãos são moídos e a farinha obtida é utilizada na preparação de bebida. Hoje em dia, são usados moinhos para a moagem dos grãos. Antigamente, os grãos eram moídos em pedras, com o auxílio de outra pedra. Para a preparação da *chicha*, a farinha de *jora* é adicionada à água fria e, em seguida, esta mistura é transferida para uma panela com água quente, sendo fervida durante cerca de 20 minutos. Após a fervura, a mistura é filtrada e, em seguida, colocada em um recipiente para fermentar. O resíduo obtido a partir da filtração é denominado *afrecho* e serve como alimento para animais. Após mais um dia de fermentação, a bebida já está pronta para o consumo. Ingredientes adicionais como ervas (capim-cidreira, cidrão, folhas de laranja e de abacaxi), especiarias (cravo, canela, pimenta da Jamaica, anis), frutas [maracujá,

abacaxi, *naranjilla* (fruta da família Solanaceae, encontrada na região dos Andes)], açúcar, rapadura e também essências, como a essência de baunilha são comumente utilizados no preparo das *chichas* (Fig. 3). No entanto, existem variações nas receitas, quanto aos ingredientes utilizados, quantidade de ingredientes e mesmo, na forma de preparo da bebida. Alguns produtores costumam ferver a farinha de *jora* com outros ingredientes, como ervas e mesmo a rapadura. Outros fazem uma mistura de rapadura e ervas e, em seguida, adicionam essa infusão à farinha de *jora* e água. Há ainda aqueles que adicionam pedaços de frutas e rapadura na bebida, após a filtração. Uma das formas de preparo da *chicha* de *jora* é mostrada na Figura 4.

A presença dos espanhóis na região dos Andes trouxe profundas mudanças na produção da *chicha*. O que se verifica é que a maioria das mulheres (principais produtoras das bebidas) abandonou os vasos de barro e os substituíram por panelas de alumínio ou vasilhas de plástico (HAYASHIDA, 2008). Os vasos de barro anteriormente utilizados na fervura e na fermentação da *chicha* de *jora* foram substituídos, respectivamente, por panelas de alumínio e recipientes de plástico, frente à sua facilidade de manuseio e maior durabilidade. De acordo com Hayashida (2008), outras mudanças típicas incluíram o uso do açúcar, para adoçar ou aumentar o teor de álcool, e a redução de variedades nativas de milho.



Figura 3. Ingredientes utilizados no preparo da *chicha* de *jora*. (A) anis-estrelado (*Illicium verum*); (B) *naranjilla* (*Solanum quitoense*); (C) *cedrón* (*Aloysia citrodora*); (D) *hierba luisa* (*Cymbopogon citratus*).



Figura 4. Produção da *chicha* de *jora*. (A) adição da farinha de *jora* à água fria; (B) adição da mescla à infusão fervente de folhas de *cedrón* (cidrão); (C) cozimento da mistura; (D) filtragem do mosto; (E) bebida filtrada e *afrecho* (farelo) obtido da filtração; (F) adição de pedaços de rapadura à bebida; (G) bebida após adição de rapadura; (H) *chicha* com 24 horas de fermentação.

Outros tipos de *chichas* produzidas no Equador incluem a *chicha* de *morocho*, preparada com milho branco e a *chicha* de *Yamor*, ou de sete grãos, produzida com

sete variedades de milho, como *jora*, *maíz amarillo* (milho amarelo), *maíz blanco* (milho branco), *maíz negro* (milho preto), *chulpi* (milho chulpi), *morocho* (milho *morocho*) e *cangil* (milho de pipoca). A *chicha* de sete grãos é produzida na cidade de Otavalo, no norte do Equador, e é uma bebida muito famosa e apreciada em todo o país (Fig.5).



Figura 5. *Chicha* de *Yamor* (Equador).

A mandioca (*yuca*) também é uma importante matéria-prima para a produção da *chicha*. A *chicha* de *yuca* é produzida pela população indígena e mestiça na região amazônica do Equador. Essa bebida é produzida de forma peculiar, uma vez que é utilizada a mastigação. Para a produção, a mandioca, já descascada, é inicialmente cozida, por aproximadamente uma hora, em uma panela de alumínio. Depois de resfriada, a mandioca cozida é amassada com um bastão de madeira. Aos poucos vão sendo tomados pedaços da massa obtida e se prossegue à mastigação, que ocorre por três a cinco repetições, durante quinze minutos a cada vez. A massa obtida é colocada então em pote de plástico e deixada para fermentar. Após a fermentação, é feita uma mescla do suco de frutos da palma *Ungurahua* (*Oenocarpus bataua* subsp. *bataua*, Arecaceae) com a massa fermentada e, assim, a bebida está pronta para o consumo. Para o preparo do suco dos frutos, esses são inicialmente colhidos e então embebidos em água quente para a remoção do mesocarpo. As sementes são descartadas e, à mistura de água e mesocarpo, são adicionados pedaços de mandioca fermentada (MILLER et al., 2002). Na figura 6 está representado o fluxograma de produção de uma *chicha* de *yuca*, produzida pela comunidade *Guiyero*, na região amazônica do Equador.



Figura 6. Produção da *chicha* de *yuca*. (A) cozimento da mandioca já descascada; (B) mandioca cozida; (C) mandioca sendo amassada; (D) mastigação da mandioca; (E) mandioca com 24 horas de fermentação; (F) frutos de *Ungurahua*; (G) *chicha* de *yuca* pronta.

Nas crônicas dos espanhóis, há relatos do emprego de práticas pouco ortodoxas na elaboração da *chicha*. O uso de excremento humano e urina constituem parte de uma mesma prática. As vasilhas usadas na preparação das *chichas* eram herdadas de mães para filhas e as mulheres acreditavam que parte de suas mães ficavam nas vasilhas. Ao adicionar suas excretas nestes recipientes, as mulheres estariam de certa forma, juntando suas partes com as partes da mãe (Javier Carvajal, comunicação pessoal). Acredita-se que essa prática era de finalidade religiosa. A adição de fezes proporcionava uma bebida com maiores teores de etanol, uma vez que espécies de *Candida* presentes nas fezes humanas aumentariam a eficiência da fermentação. Apesar disso, essa prática é condenada pelos riscos e pelos traumas psicológicos que pode causar à saúde dos consumidores, não sendo praticada atualmente (GOMES et al., 2010; CHANG et al., 2012).

2.2.3.3 Composição e valor nutricional

A *chicha* apresenta uma série de propriedades nutricionais. O álcool e os açúcares livres são fonte de calorias e as vitaminas B presentes nas leveduras são nutrientes importantes. Além disso, acredita-se que seja uma bebida segura, devido à combinação de ácido láctico e etanol, os quais inibem o crescimento da maioria dos micro-organismos patogênicos (STEINKRAUS, 1996).

2.2.3.4 Armazenamento e conservação

Depois de preparada, a *chicha* é usualmente colocada em frascos de vidro, garrafas plásticas ou em refresqueiras para a sua venda. No entanto, é uma bebida perecível e tende a azedar em um período inferior a sete dias (JENNINGS, 2005). Decorrido esse período, a bebida é utilizada no preparo de alguns pratos tradicionais, como por exemplo, o *hornado* (carne de porco assada servida com batatas, milho, banana e salada de tomate, cebola e abacate) do Equador. O milho germinado pode ser conservado por semanas ou até por meses antes do preparo da *chicha*, no entanto, a vida útil da farinha é baixa, pois está mais sujeita ao ataque de insetos e torna-se rançosa mais rápido do que o grão de milho (JENNINGS, 2005).

2.3 MICROBIOTA ASSOCIADA ÀS BEBIDAS FERMENTADAS TRADICIONAIS

Geralmente, as fermentações naturais são conduzidas por leveduras, bactérias do ácido láctico e fungos, algumas vezes formando uma microbiota complexa que atua em cooperação (BLANDINO et al., 2003). A microbiota é responsável pela produção de diversos compostos químicos e voláteis que conferem características peculiares ao produto final (LAPPE-OLIVERAS et al., 2008).

Os tipos de fermentação mais conhecidos são a fermentação alcoólica, láctica e acética (SONI & SANDHU, 1990). A fermentação alcoólica, que ocorre em vinhos e cervejas, por exemplo, tem as leveduras como os micro-organismos predominantes e resulta na produção de etanol. A fermentação láctica ocorre, por exemplo, em cereais e leites fermentados, e é conduzida, principalmente, pelas bactérias lácticas. A fermentação acética resulta na produção de ácido acético pelas bactérias de *Acetobacter* spp., que convertem o etanol a ácido acético na presença de excesso de oxigênio (MCKAY & BALDWIN, 1990).

Alguns micro-organismos participam em paralelo do processo fermentativo, enquanto outros atuam de forma sequencial, com uma mudança da microbiota dominante, no decorrer da fermentação. O tipo de microbiota desenvolvida em cada fermentação vai depender de vários fatores, como atividade de água, pH, concentração de sal, temperatura e composição do substrato (BLANDINO et al., 2003).

Na bebida fermentada *cauim*, à base de mandioca, as bactérias do ácido láctico formam a microbiota dominante ao longo da fermentação. As contagens de leveduras aumentaram durante as primeiras 24 horas e depois permaneceram relativamente constantes até o final da fermentação (ALMEIDA et al., 2007). Na bebida asiática *jnard*, à base de grãos, o que se verificou foi uma predominância de fungos filamentosos (*Mucor* e *Rhizopus*) e leveduras (*Saccharomycopsis fibuligera*) no começo da fermentação e o desaparecimento total desta microbiota decorridas 12 horas de fermentação. Esses micro-organismos são então substituídos por espécies de leveduras como *Pichia anomala* (*Wickerhamomyces anomalus*), *S. cerevisiae* e *Candida glabrata* e por espécies de bactérias lácticas, como *Pediococcus pentosaceus* e *L. bifementans*. A fermentação de vinhos de palma é sempre uma fermentação alcoólica-láctica-acética, envolvendo principalmente leveduras e bactérias do ácido láctico. A espécie *S. cerevisiae* está sempre presente

na seiva fermentada, no entanto, espécies de bactérias lácticas como *L. plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* e outras espécies de bactérias como *Zymomonas mobilis* e *Acetobacter* spp. também podem ocorrer. A bebida *kombucha*, preparada com chá e açúcar, é caracterizada por uma associação entre bactérias *Acetobacter* spp. e diversas leveduras. A fermentação desta bebida é iniciada por leveduras osmotolerantes e depois dominada por espécies ácido-tolerantes (AIDOO et al., 2006).

Com relação às bebidas mexicanas à base de *Agave*, a maioria dos processos de produção envolve uma fermentação complexa, na qual, bactérias, principalmente do ácido láctico e acéticas, e leveduras, compreendendo espécies *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces*, estão presentes em populações mistas. A fermentação do agave é desenvolvida por uma sucessão de micro-organismos. Inicialmente, devido ao pH inicial neutro da seiva ou da pulque, há uma predominância de bactérias do ácido láctico, como *Leuconostoc* e espécies homo e heterofermentativas de *Lactobacillus*. Com o aumento da acidez, ocorre um aumento da população de leveduras que predominam sobre as bactérias lácticas. Depois há predominância de bactérias produtoras de dextranas (*Leuconostoc* spp.) que são sucedidas por bactérias produtoras de ácido acético (*Acetobacter* spp.) e, que por sua vez, são sucedidas por micro-organismos putrefativos. Como resultado da fermentação láctica, realizada pelas BAL, ocorre uma diminuição no teor de sólidos totais e açúcares redutores (como glicose e frutose), os quais foram utilizados na síntese de ácido láctico, etanol e dextranas. Outros compostos químicos presentes na seiva foram utilizados para a geração de compostos secundários, como ésteres, ácidos orgânicos e alcoóis superiores (LAPPE-OLIVERAS et al., 2008). As leveduras *Saccharomyces*, como *S. cerevisiae*, *S. bayanus* e *S. paradoxus* e as não *Saccharomyces*, como espécies de *Candida*, *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia* spp. e *Torulaspota delbrueckii*, são micro-organismos fermentativos que produzem etanol a partir de glicose, frutose e sacarose e sintetizam nutrientes, como aminoácidos e vitaminas e compostos voláteis aromáticos, os quais influenciam a qualidade e o perfil aromático da bebida (LAPPE-OLIVERAS et al., 2008). A presença de leveduras e bactérias lácticas nas bebidas fermentadas tradicionais pode ter um efeito nutricional importante, considerando-se a atividade probiótica destes micro-organismos (STEINKRAUS, 1997). A Tabela 1

mostra a coocorrência de leveduras e bactérias lácticas com outros micro-organismos em algumas bebidas fermentadas tradicionais.

Tabela 1. Coexistência entre BAL, leveduras e outros micro-organismos em algumas bebidas fermentadas tradicionais.

Nome da bebida	Substrato	Micro-organismos	Região
<i>dolo/pito</i>	sorgo	BAL, <i>Candida</i> spp., <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Kluyveromyces</i> spp., <i>Pichia anomala</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Torulaspota delbrueckii</i>	África subsaariana
<i>munkoyo/busaa</i>	milho	BAL, <i>Candida krusei</i>	Zâmbia/Quênia (África)
<i>palm wine</i>	seiva da palma	BAL, bactérias do ácido acético, <i>Candida</i> spp., <i>Kloeckera apiculata</i> , <i>Pichia</i> spp., <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	África Ocidental
<i>jnaard</i>	milho/arroz/trigo	<i>Mucor</i> spp., <i>Rhizopus</i> spp., <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , BAL	Ásia
<i>palm wine</i>	sucos açucarados	BAL, bactérias do ácido acético, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>Kodamaea ohmeri</i> e outras leveduras	Ásia
<i>tequila</i>	mosto do agave	BAL, não- <i>Saccharomyces</i> (<i>C. lusitaniae</i> , <i>K. marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i>) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	México
<i>pulque</i>	seiva do agave	BAL, <i>Zymomonas mobilis</i> , espécies não- <i>Saccharomyces</i> e <i>Saccharomyces</i> (<i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. paradoxus</i>)	México
<i>chicha</i>	milho	BAL, bactérias do ácido acético, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levedura predominante), <i>Aspergillus</i> spp.	Peru

Fonte: Blandino et al. (2003); Jespersen (2003); Aidoo et al. (2006); Lappe-Oliveras et al. (2008)

2.3.1 Leveduras associadas às fermentações tradicionais

As leveduras degradam principalmente os carboidratos, enquanto as bactérias possuem uma atividade proteolítica (CHAVAN & KADAM, 1989). Fungos pertencentes aos gêneros *Mucor* e *Rhizopus* são, normalmente, os principais produtores de enzimas para a produção de vinhos de arroz na Índia e Nepal (SHRESTHA et al., 2002). O fungo *Aspergillus oryzae*, também é essencial na produção de bebidas de vinho de arroz, como o sake. Este fungo produz enzimas amilolíticas, como a α -amilase e a amiloglicosidase, as quais hidrolisam o amido em dextrina, maltotriose, maltose e glicose, e proteolíticas, como as proteases, que hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos (AIDOO et al., 2006).

Uma grande diversidade de espécies e linhagens de leveduras é encontrada em alimentos e bebidas fermentados. No entanto, a biodiversidade de espécies é maior, sobretudo, nos estágios iniciais da fermentação, uma vez que a maioria destes produtos é fabricada por meio de fermentação espontânea. A população de leveduras encontrada está intimamente relacionada às matérias-primas, às condições do processamento e, além disso, pode ter a sua composição influenciada pela ocorrência de outros micro-organismos. No processo de vinificação tradicional, a fermentação espontânea é conduzida por diferentes espécies de leveduras, originárias das uvas e dos equipamentos (ROMANO et al., 2006). A variedade e a proporção de diferentes leveduras no mosto do vinho estão atreladas a vários fatores, como localização geográfica, condições climáticas, variedade da matéria-prima e danos físicos causados nas matérias-primas por fungos, insetos e pássaros (PRETORIUS et al., 1999). Entre as espécies de leveduras presentes em alimentos e bebidas fermentados, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* parece ser prevalente (JESPERSEN, 2003).

As espécies não-*Saccharomyces*, anteriormente consideradas como espécies deterioradoras de alimentos e bebidas fermentadas, têm sido incorporadas, secundariamente, como culturas iniciadoras, na fermentação de cervejas (BOKULICH & BAMFORTH, 2013). *Dekkera bruxellensis*, por exemplo, é utilizada na produção de uma cerveja belga. Essa levedura produz ácido acético que, em quantidades moderadas, confere um sabor único às cervejas (BOURDICHON et al., 2012). *Brettanomyces* spp., além de outras leveduras e bactérias do ácido láctico têm sido empregada, pelos mestres cervejeiros da América, durante a maturação ou

refermentação em garrafas. Há ainda, casos raros de realização de fermentação de cervejas inteiramente por *Brettanomyces* spp. (BOKULICH & BAMFORTH, 2013).

Quando as leveduras são abundantes, sozinhas ou em populações mistas com fungos filamentosos ou bactérias do ácido láctico, elas têm um impacto significativo nos parâmetros de qualidade dos alimentos, como sabor, textura, odor e valor nutricional (AIDOO et al., 2006). A inoculação de *S. cerevisiae*, em contagens de 10^6 UFC/g, em cultura pura ou em combinação com espécies de *Candida*, em massa de milho, mostrou um aumento das propriedades organolépticas desta massa fermentada (NYAKO & DANSO, 1991). Além disso, culturas mistas de *S. cerevisiae* e *Lactobacillus brevis*, usados para a fermentação do *ogi* nigeriano, resultaram em um produto com aroma muito semelhante ao *ogi*, produzido tradicionalmente (TENIOLA & ODUNFA, 2001).

Algumas possíveis funções das leveduras envolvidas na fermentação de alimentos e bebidas fermentados tradicionais já foram relatadas. Estas funções compreendem a fermentação de carboidratos, com a formação de alcoóis, a produção de compostos aromáticos, como ésteres, alcoóis e ácidos orgânicos, a estimulação de bactérias do ácido láctico por meio do fornecimento de metabólitos essenciais, a inibição de fungos produtores de micotoxinas, por meio de competição por nutrientes e produção de compostos tóxicos, a degradação de micotoxinas, a degradação de compostos cianogênicos, a produção de enzimas, como celulasas e pectinases e as propriedades probióticas (JESPERSEN, 2003). A Tabela 2 mostra a distribuição e as principais funções de algumas espécies de leveduras em bebidas fermentadas.

A função mais estudada de leveduras em alimentos e bebidas fermentados é a conversão de carboidratos em alcoóis e outros compostos aromáticos (ROMANO et al., 2006). Annan et al. (2003) identificaram um total de 76 compostos aromáticos em massa de milho fermentada espontaneamente, em Gana, na África. Os compostos incluíram 21 carbonilas, 19 alcoóis, 17 ésteres, 12 ácidos, um furano, cinco compostos fenólicos, um alqueno e um composto não identificado.

Tabela 2. Distribuição e atividades principais de espécies de leveduras em bebidas e alimentos fermentados.

Gêneros de leveduras mais frequentes	Origem (Alimentos e bebidas)	Funções Principais
<i>Saccharomyces</i>	Vinho, cerveja, massas azedas, sidra, cereja, queijo, bebidas e alimentos fermentados indígenas.	Fermentação de açúcares; produção de metabólitos secundários; atividades pectinolíticas e glicosidásicas; efeito inibitório em fungos produtores de micotoxinas; degradação de algumas frações da caseína; desenvolvimento de CO ₂ e atividades lipolíticas, proteolíticas e de urease.
<i>Hanseniaspora</i> (<i>Kloeckera</i>)	Vinho, sidra, bebidas e alimentos fermentados indígenas.	Atividades proteolíticas, glicosidásicas e pectinolíticas e produção de metabólitos secundários.
<i>Candida</i> spp.	Vinho, massas azedas, bebidas e alimentos fermentados indígenas.	Atividades proteolíticas, glicosidásicas e pectinolíticas; produção de metabólitos secundários e efeito inibitório em fungos produtores de micotoxinas.

Fonte: Romano et al. (2006)

2.3.2 Bactérias do ácido láctico associadas às fermentações tradicionais

As bactérias lácticas constituem um grupo diverso de micro-organismos Gram-positivos, catalase-negativos, não esporulados, fermentativos e que produzem ácido láctico como principal produto final (AGUIRRE & COLLINS, 1993). Estes micro-organismos, encontrados comumente associados a plantas, carne e leite, são importantes no processamento de vários produtos, como as bebidas alcoólicas. No entanto, estes micro-organismos podem ser um problema como contaminantes, por meio da produção de compostos indesejáveis denominados *off-flavours* (CARR et al., 2002).

As bactérias do ácido láctico (BAL) são agrupadas em homofermentativos ou heterofermentativos, de acordo com o metabolismo de carboidratos. O primeiro grupo corresponde às BAL que produzem o ácido láctico como o maior produto da fermentação da glicose. Esse grupo usa a via Embden-Meyerhof-Parnas para converter um mol de glicose em dois mols de lactato. Já o segundo grupo, o dos heterofermentativos, compreende as BAL que produzem outros produtos além do ácido láctico, a partir da fermentação da glicose. Esses produtos compreendem dióxido de carbono, ácido acético e etanol. Os heterofermentativos usam a via hexose-monofosfato ou a via da pentose e geram metade da energia gerada por homofermentativos (CARR et al., 2002; ROSS et al., 2002). Os gêneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, além de alguns lactobacilos, estão incluídos no grupo dos homofermentativos. Os gêneros *Leuconostoc*, *Weisella* e também alguns lactobacilos estão inseridos no grupo dos heterofermentativos (ROSS et al., 2002).

As bactérias do gênero *Lactobacillus* foram divididas nos subgrupos Thermobacteria, Streptobacteria e Betabacteria de acordo com Orla e Jensen (HAMMES & VOGEL, 1995). As Thermobacteria incluem bactérias de grande importância em bebidas fermentadas. Os micro-organismos deste grupo são comumente encontrados em batatas, grãos, ervas e produtos lácteos. Alguns exemplos de espécies incluídas em Thermobacteria são *Lactobacillus delbrueckii*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*. Dentro do subgrupo Streptobacteria, estão compreendidas as espécies *L. plantarum*, *L. casei* e *L. lactis*. As bactérias pertencentes à espécie *L. plantarum* são encontradas associadas naturalmente ao repolho e aos queijos. *L. casei* está associada ao leite e *L. lactis* aos queijos. Entre

as Betabacteria, pode-se citar espécies de *L. fermentum* e *L. brevis*, importantes na produção de alimentos fermentados, e *L. hilgardii* e *L. fructivorans* associados às uvas e conservas (CARR et al., 2002).

Os lactococos têm sido utilizados como culturas iniciadoras de vários produtos lácteos, como iogurte e queijos. As espécies de *Leuconostoc* são encontradas comumente na superfície e dentro de frutas e vegetais e em produtos lácteos. Esse gênero exerce um papel proeminente na fermentação de diversos produtos vegetais e animais. O gênero *Pediococcus*, comumente associado a várias plantas, também exerce um importante papel na fermentação de produtos de origem animal e vegetal (CARR et al., 2002).

Nout & Sarkar (1999) salientaram que as BAL são frequentemente encontradas associadas às fermentações da mandioca e cereais. Dentre as bactérias que foram encontradas na *pulque*, uma bebida à base da seiva do *agave*, estão espécies de *Lactobacillus* spp., como *L. delbrueckii* e *Lactobacillus vermiforme* e espécies do gênero *Leuconostoc* (LAPPE-OLIVERAS, 2008). Em outro trabalho avaliando a microbiota, Escalante et al. (2004) verificaram que as espécies do gênero *Lactobacillus* foram as bactérias mais dominantes (80,97%) na bebida *pulque*. Esses mesmo autores identificaram os lactobacilos como *L. acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus acetotolerans*, *L. hilgardii* e *L. plantarum*.

A fermentação láctica confere uma série de vantagens aos produtos fermentados, como aumento da segurança, da vida de prateleira, da aceitabilidade e do valor nutricional (OYEWOLE, 1997). O efeito preservativo da fermentação láctica pode ser atribuído à antibiose mediada pelas bactérias do ácido láctico, a qual compreende a produção de ácidos (como ácido láctico, acético e propiônico), peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Os ácidos orgânicos atuam na membrana plasmática, interferindo na manutenção do potencial da membrana e inibindo o transporte ativo. Esses compostos têm um amplo espectro de ação e inibem tanto bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, quanto bolores e leveduras. O peróxido de hidrogênio pode se acumular, dado que as bactérias lácticas não possuem catalase e causar um efeito inibitório a alguns micro-organismos (ROSS et al., 2002; BLANDINO et al., 2003). As bacteriocinas, que são peptídeos e proteínas antimicrobianas, provocam a despolarização da membrana celular ou inibição da síntese da parede celular. Esses compostos, que vão desde um estreito espectro até um amplo espectro de atuação (ex.: nisinas), apresentam atividade contra os micro-

organismos patogênicos *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (ROSS et al., 2002). O aumento da segurança e da palatabilidade dos alimentos fermentados está relacionado à produção de uma série de enzimas pelas bactérias lácticas, como as proteases, amilases e lipases, as quais são responsáveis pela hidrólise dos substratos em produtos não tóxicos e com texturas e aromas desejáveis (STEINKRAUS, 1997).

Nas fermentações de cervejas e vinhos, as BAL exercem dois papéis: tanto de micro-organismos benéficos, quanto de agentes deterioradores (BOKULICH & MILLS, 2012). A deterioração ocorre por meio de acidificação, formação de ranço e produção de diacetil, o qual confere à cerveja um intenso aroma de manteiga artificial. Muitas linhagens ainda podem produzir exopolissacarídeos (EPS) na cerveja, dando uma consistência oleosa ou, em casos extremos, formando limo. Dentre as BAL que representam maior ameaça à cerveja estão *L. brevis* e espécies do gênero *Pediococcus*. Como micro-organismos benéficos, as BAL acidificam o mosto, aumentando a extração de açúcares, fermentabilidade, estabilidade da espuma, cor e flavor da cerveja (BOKULICH & BAMFORTH, 2013). Nas fermentações alcoólicas tradicionais, as BAL fornecem um ambiente favorável para estágios tardios de fermentação, incluindo a produção de álcool, contribuindo para o sabor e aroma da bebida (RHEE et al., 2011).

2.3.3 Microbiota da *chicha*

Nas *chichas* do Equador, Cox et al. (1987) encontraram BAL, leveduras e espécies de *Bacillus* como os micro-organismos associados a essas bebidas. Soriano (1938), ao avaliar a microbiota de *chichas* da Argentina, encontrou leveduras e bactérias do ácido láctico como os micro-organismos fermentadores primários. Gomez (1949) encontrou uma microbiota complexa em *chichas* da Colômbia, que compreendeu leveduras e bactérias lácticas, como também, fungos filamentosos e bactérias do ácido acético. Em *chichas* do Peru, assim, como nas *chichas* da Colômbia, foram encontradas leveduras, bactérias e fungos filamentosos (BLANDINO et al., 2003). Em trabalho mais recente, Vallejo et al. (2013) identificaram as leveduras obtidas de *chichas* de *jora*, de 10 *chicherías* (casas produtoras de *chichas*) no Peru, como pertencentes à espécie *Saccharomyces*

cerevisiae. *S. cerevisiae* foi apontada como a principal levedura responsável pela fermentação de *chichas* de *jora* peruanas (VALLEJO et al. 2013).

A microbiota presente na *chicha* pode ser proveniente de diversos ambientes, como matéria-prima, utensílios e equipamentos utilizados na produção. Além disso, pode ser carregada por insetos ou manipuladores. As BAL encontradas nas *chichas* podem ter sido introduzidas a partir das matérias-primas, visto que muitas espécies são comumente encontradas em vegetais e plantas, bem como também transferidas a partir de humanos e animais, hospedeiros naturais destas bactérias (COX et al., 1987). As leveduras presentes nessas bebidas são provenientes de diferentes fontes, tais como manipuladores, matérias-primas, utensílios e equipamentos utilizados na preparação das bebidas. As vasilhas de barro e as colheres de madeira, utilizadas no preparo das *chichas*, oferecem um micro-habitat ideal para as leveduras, que se infiltram nas minúsculas cavidades desses utensílios (CARVAJAL, 2012). Chang et al. (2012) recuperaram dois isolados de leveduras de vasilhas antigas de *chichas*, obtidas de túmulos profundos do sítio arqueológico de La Florida, em Quito, Equador, os quais foram identificados como *Candida theae*, espécie nova, pertencente ao clado *Lodderomyces*.

O conhecimento da microbiota das *chichas*, sobretudo do Equador, onde quase não se tem estudos, torna-se extremamente importante para o entendimento do processo fermentativo desta bebida. O presente estudo pode permitir também a seleção daqueles micro-organismos mais prevalentes, para serem utilizados como iniciadores na produção da bebida. Isto poderia resultar em uma bebida mais padronizada, com equilíbrio na produção de álcool e ácido láctico, e assim com melhores características sensoriais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar as populações de bactérias lácticas e leveduras associadas às diferentes *chichas* do Equador e determinar as características físico-químicas dessas bebidas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar amostras de *chichas* de diferentes regiões do Equador, visando caracterizar os principais micro-organismos destas bebidas tradicionais da América do Sul;
- Quantificar e identificar, por testes fisiológicos e moleculares, as leveduras encontradas nas amostras de *chichas*;
- Diferenciar as linhagens de *S. cerevisiae* por análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial;
- Quantificar e identificar, por testes moleculares, as bactérias lácticas presentes nas *chichas*;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos das amostras de *chichas* coletadas, como pH, açúcares redutores totais, etanol e ácido láctico;
- Elaborar uma lista de verificação para as amostras de *chichas*, contemplando matérias-primas, preparo das bebidas, tempo de fermentação e local de coleta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Quarenta e sete amostras de *chichas* foram coletadas em duas regiões do Equador, na região amazônica, dentro do Parque Nacional de Yasuní (na província de Orellana) e na região serrana, nas províncias de Pichincha, Imbabura e Chimborazo, durante os períodos de agosto a outubro de 2010 e abril a setembro de 2012. O Equador continental pode ser dividido em três diferentes regiões climáticas: a costa plana do Pacífico, a região dos Andes e a região Amazônica. A costa plana do Pacífico é quente durante todo o ano, com uma estação chuvosa entre dezembro e maio. Na região Andina, o clima é tipicamente frio, com variações de acordo com a altitude, e a região Amazônica é quente e úmida (JAMES et al., 2009). A figura 7 mostra as províncias do Equador. As áreas delimitadas por círculos indicam as províncias onde foram realizadas as coletas.

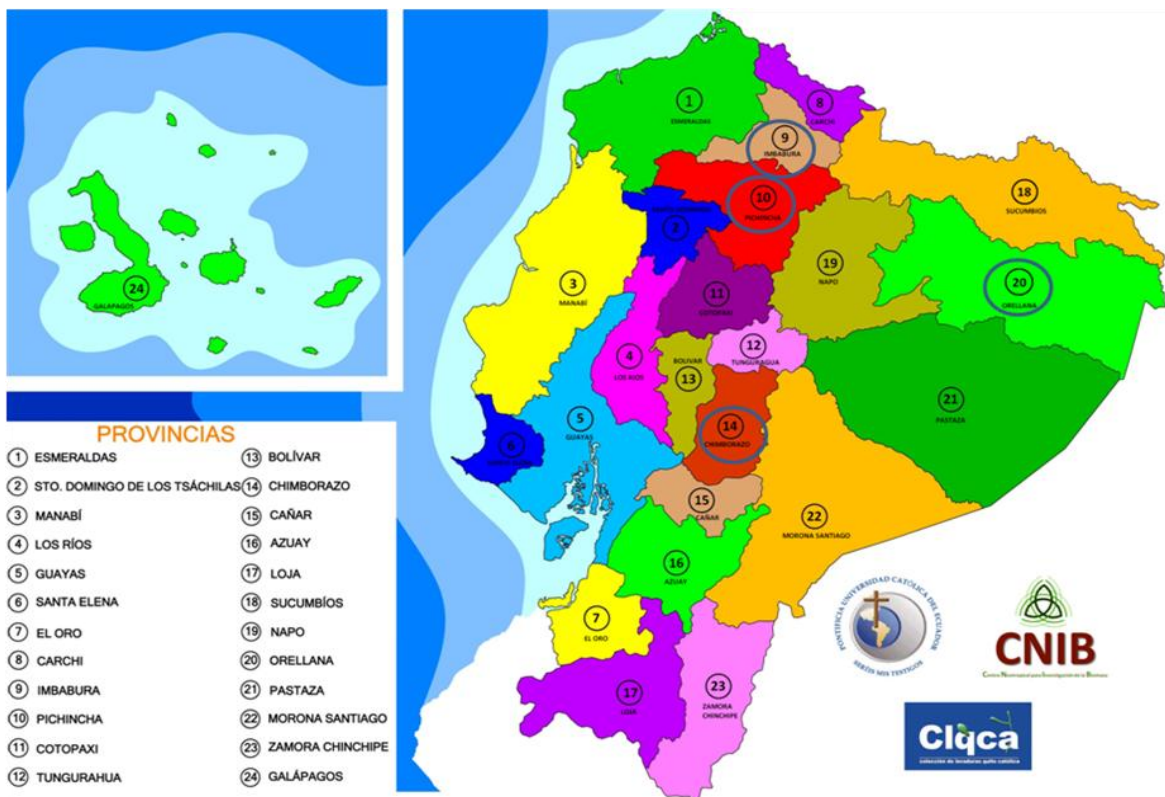


Figura 7. Mapa do Equador (Fonte: CNIB, PUCE). Áreas delimitadas por círculos indicam as províncias onde foram realizadas as coletas de amostras de *chichas*.

As amostras coletadas incluíram uma *chicha* de arroz, duas *chichas* de *yuca* (mandioca), duas *chichas* de *morocho*, três *chichas* de sete grãos e 36 *chichas* de *jora*. Excepcionalmente, uma *chicha* de *jora* foi coletada em tempos sucessivos de fermentação (0 a 5 dias) e, assim, foi contabilizada como uma única amostra. Além das *chichas* foram também coletadas três amostras de mandioca fermentada, que seriam utilizadas para a produção da *chicha* de *yuca*, no Parque Nacional de *Yasuní*. Todas as amostras foram coletadas em garrafas estéreis, de 100 mL e, logo em seguida, acondicionadas em gelo até o momento da análise. Durante a realização das coletas, foi também preenchida uma lista de verificações, constituída por quatro itens, sobre informações das bebidas (Apêndice A).

4.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a realização das análises microbiológicas, uma alíquota de 25 mL de *chicha* foi adicionada a um frasco contendo 225 mL de água peptonada esterilizada 0,1%. O frasco foi homogeneizado e as diluições decimais (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) foram preparadas em tubos de ensaio contendo 9 mL deste mesmo diluente. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em triplicata. Para o isolamento dos micro-organismos, 0,1 mL de diluições decimais apropriadas (10^{-4} e 10^{-5} para leveduras e 10^{-5} e 10^{-6} para bactérias lácticas) foi inoculado nos meios de cultura.

4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

4.3.1 Isolamento de leveduras

O isolamento de leveduras foi realizado pelo método de plaqueamento em superfície, empregando-se os meios ágar extrato de malte-extrato de levedura (YM - extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5 %, glicose 1%, ágar 2% e cloranfenicol 0,02%) e ágar lisina (YCB 1,17%, lisina 0,056%, ágar 2% e cloranfenicol 0,02%). As placas foram incubadas a 25°C por cinco dias. A contagem dos isolados foi expressa em UFC/mL. Cada morfotipo diferente foi contado e pelo menos um representante de cada foi purificado para posterior identificação. As leveduras purificadas foram crescidas em caldo GYMP (glicose 2,0%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1% e fosfato de sódio monobásico 0,2%) a 25°C por

24 horas e então congeladas em freezer a -86°C , após a adição de 20% de glicerol esterilizado, para posterior identificação.

4.3.2 Identificação de leveduras

As leveduras foram agrupadas, inicialmente, de acordo com a similaridade nos testes fisiológicos utilizados para a identificação (KURTZMAN et al., 2011). As leveduras com perfis morfológicos e fisiológicos idênticos foram então caracterizadas molecularmente utilizando a técnica de PCR *fingerprinting*. Isto foi feito para agrupar as leveduras de acordo com os perfis moleculares, para posterior identificação utilizando o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

4.3.2.1 Extração de DNA de leveduras

O DNA total de cada isolado das leveduras foi extraído utilizando fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1). As leveduras, depois de serem crescidas em ágar YM ou ágar Sabouraud (extrato de levedura 0,5%, peptona 1,0%, glicose 2% e ágar 2%), foram ressuspendidas em 100 μL de tampão de lise (Tris-HCl 0,05 M, EDTA 0,005 M, NaCl 0,1 M e SDS 1%). Os tubos, contendo essa suspensão, foram incubados em banho-maria a 65°C por 35 minutos. Decorrido esse tempo foi adicionado 100 μL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) aos tubos e esses levados ao vórtex por três minutos e centrifugados por 15 minutos. O sobrenadante foi então retirado e transferido para outro tubo, onde foi adicionado 100 μL de etanol 70% gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13000 rpm por três minutos. O etanol foi removido e os tubos foram secos *overnight*. Concluída essa etapa, o DNA foi ressuspendido em 100 μL de TE (Tris-HCL 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) e armazenado em freezer a -20°C .

4.3.2.2 PCR *fingerprinting*

O iniciador utilizado para a PCR *fingerprinting* foi o microsatélite (GTG)₅ (LIECKFELDT et al., 1993). Para a reação, foram utilizados 2,5 μL de tampão 10X

(MBI Fermentas), 1 μL de dNTP 0,1 mM (Invitrogen, EUA), 1,5 μL de MgCl_2 1,5 mM (MBI Fermentas, EUA), 2 μL do iniciador $(\text{GTG})_5$ $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen, EUA), 0,2 μL de Taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) e 1 μL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 25 μL . A PCR foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler®pro, Alemanha) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, 40 ciclos de desnaturação a 93°C por 45 segundos, anelamento a 50°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, seguidos de extensão final a 72°C por seis minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa, Espanha) a 1,5% em tampão TBE 0,5X (54 g de Tris Base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) a 80 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium, EUA) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat, França).

4.3.2.3 PCR com os iniciadores NL1 e NL4

Um isolado de cada perfil molecular obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA conforme descrito por Lachance et al. (1999). Para a reação de PCR foram utilizados os iniciadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'). Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 μL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 μL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen), 3 μL de MgCl_2 1,5 mM (MBI Fermentas), 1 μL do iniciador NL1 $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen), 1 μL do iniciador NL4 $10 \mu\text{mol}^{-1}$ (Invitrogen) 0,2 μL de taq DNA polimerase 1 U (MBI Fermentas) e 1 μL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 μL . A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler®pro) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos, trinta e cinco ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento a 54°C por 25 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa) a 1% em tampão TBE 0,5X a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium) e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat).

4.3.2.4 Purificação dos amplicons

Os amplicons (produtos de PCR) obtidos foram purificados mediante técnica com EDTA e etanol absoluto. Inicialmente foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto a 45 µL dos produtos de PCR. Os tubos foram homogeneizados e, então, centrifugados a 13000 rpm por 25 minutos, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi retirado. Imediatamente depois adicionou-se 120 µL de etanol 70% gelado aos tubos e esses foram homogeneizados e centrifugados a 13000 rpm por dez minutos. O etanol foi removido e os tubos foram secos *overnight*. Decorrida essa etapa, o DNA foi ressuspensionado em 10 µL de água deionizada, os tubos levados ao vórtex por 15 segundos e incubados em banho-maria a 37°C por 15 minutos. A dosagem de DNA foi realizada em NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, USA).

4.3.2.5 Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se o aparelho ABI3130 do serviço da Valid Biotecnologia, do Laboratório de Genética Animal, na Escola de Veterinária da UFMG. O programa BLAST nucleotídeo-nucleotídeo (BLASTn) versão 2.215 do BLAST 2.0 disponível no portal NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), foi utilizado para a comparação das sequências obtidas com aquelas já depositadas no GenBank.

4.4 ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL (mtDNA)

4.4.1 Extração do DNA mitocondrial

A extração do DNA mitocondrial (mtDNA) dos isolados obtidos de *S. cerevisiae* foi realizada conforme metodologia descrita em Querol et al. (1992) e modificada conforme Foschino et al. (2004). O DNA foi ressuspensionado em 25 µL de TE, e armazenado em freezer a -20°C.

4.4.2 Digestão do DNA mitocondrial

A cada tubo contendo 10 µL do DNA extraído foi adicionado 10 µL de mistura contendo 2 µL de tampão 10X, 1 µL de RNase A (Invitrogen), 1 µL de *Hinf*I (Invitrogen) e 6 µL de água deionizada. Os tubos foram então incubados a 37°C por seis horas. Os fragmentos de restrição do mtDNA foram separados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa) a 1,5% em tampão TBE 0,5X a 80 V. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium) e visualizados sob UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat).

4.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

4.5.1 Isolamento de bactérias lácticas

O isolamento de bactérias lácticas foi realizado pelo método de plaqueamento em superfície, empregando-se o ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe, Difco, EUA) e M-17 (Difco, EUA), ambos com 0,01% de cicloheximida. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas, em jarras de anaerobiose (BD Biosciences, EUA). A contagem dos isolados foi expressa em UFC/mL. Cada morfotipo diferente foi contado e pelo menos um representante de cada foi purificado para posterior identificação. As bactérias lácticas purificadas foram crescidas em caldo MRS a 37°C por 24 horas, em anaerobiose, e então congeladas em freezer a -86°C, após a adição de 20% de glicerol estéril, para posterior identificação.

4.5.2 Identificação de bactérias lácticas

Os morfotipos obtidos foram identificados, inicialmente, por meio de coloração de Gram e por teste de catalase. Os isolados com morfologia idêntica foram agrupados por meio da técnica de polimorfismo do fragmento de restrição (RFLP), para posterior identificação utilizando o sequenciamento parcial da região 16S do rRNA.

4.5.2.1 Extração de DNA de bactérias lácticas

O DNA total das bactérias lácticas foi extraído a partir de uma adaptação do método descrito por Hoffman & Winston (1987). As colônias previamente crescidas

em ágar MRS foram ressuspensas em tubos de 1,5 mL contendo 100 µL de TE. A seguir, foi adicionado 100 µL de fenol:clorofórmio:álcool-isoamílico (25:24:1) e 0,3 gramas de pérolas de vidro à suspensão. Os tubos, contendo essa mistura, foram então levados ao vórtex por três a quatro minutos e centrifugados a 13000 rpm por cinco minutos. Decorrido o tempo, retirou-se o sobrenadante, transferindo-o para outro tubo. Então, adicionou-se ao tubo um volume de etanol a 96% correspondente ao volume de sobrenadante recuperado. Os tubos foram então homogeneizados por inversão e centrifugados a 13000 rpm por dois minutos. A fase líquida foi descartada e o DNA foi ressuspensado em 20 µL de TE.

4.5.2.2 Agrupamento por RFLP

Inicialmente, os isolados foram submetidos a uma reação de PCR, para amplificação da região 16S do rRNA, utilizando-se os iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') conforme Lane (1991). Depois, os amplicons obtidos foram tratados com as três enzimas de restrição, *Hinf*I (Invitrogen), *Hae*III (Invitrogen) e *Msp*I, segundo metodologia de Brightwell et al. (2006), com algumas modificações. Para a reação de digestão, foram adicionados a cada tubo 2 µL de tampão 10X, 1 µL de enzima, DNA ≤ 1500 ng/µL e água q.s.p. 20 µL. Os tubos foram incubados a 37°C por três horas.

Os fragmentos de restrição obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose (Pronadisa) a 1,5% em tampão TBE 0,5X a 100 V. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium) e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat).

4.5.2.3 PCR com os iniciadores 27F e 1492R

Um isolado de cada perfil molecular obtido foi selecionado e submetido ao sequenciamento da região 16S do rRNA. Para a reação, foram utilizados os iniciadores 27F e 1492R. Os ensaios foram realizados utilizando-se 5 µL de tampão 10X (MBI Fermentas), 1 µL de dNTP 0,05 mM (Invitrogen), 3 µL de MgCl₂ 1,5 mM (MBI Fermentas), 1 µL do iniciador 27F 10 µmol⁻¹ (Invitrogen), 1 µL do iniciador 1492R 10 µmol⁻¹ (Invitrogen), 0,25 µL de taq DNA polimerase 1U (MBI Fermentas) e

1 µL de DNA. O volume final da reação foi completado com água deionizada, para 50 µL. A reação foi realizada em um termociclador Eppendorf (Mastercycler®pro) e apresentou as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por dois minutos, trinta ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por um minuto e meio, seguidos de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação foram aplicados em gel de agarose (Pronadisa) a 1% em tampão TBE 0,5X a 120 V para a obtenção de bandas. Os géis foram corados com solução de Gelred (Biotium) e visualizados sob luz UV por meio de um sistema de captação de imagem (Vilber Lourmat).

4.5.2.4 Purificação dos amplicons e Sequenciamento

A purificação dos amplicons e a reação de sequenciamento foram realizadas, respectivamente, como nos itens 4.3.2.4 e 4.3.2.5.

4.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.6.1 Determinação de pH

As amostras foram analisadas diretamente por meio de pHmetro Mettler Toledo, calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e pH 7,0.

4.6.2 Determinação dos açúcares redutores totais (ART)

A determinação dos açúcares redutores totais foi realizada por meio da metodologia do ácido 3,5 dinitrossalicílico (DNS), desenvolvida por Miller (1959).

4.6.3 Dosagem de etanol

O teor de etanol foi determinado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um cromatógrafo modelo Agilent, equipado com uma coluna Rezex ROA (300 x 7,8 mm). Outros compostos, como dextrina, maltotriose, maltose, glicerol, ácido láctico e ácido acético também foram determinados por HPLC.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 LISTA DE VERIFICAÇÃO DAS *CHICHAS*

Os resultados da lista de verificação das *chichas* (Apêndice A), contemplando os itens 1, 2 e 4, foram compilados na Tabela 3. O que se verifica é que praticamente todas as receitas das bebidas contêm pelo menos um ingrediente a mais do que o substrato principal. Os ingredientes são bem variados, mas pode-se dizer que há uma predominância das ervas, como a capim-cidreira e o cidrão, ambos presentes em 20 das 47 amostras e também de rapadura, encontrada em 30 amostras. As matérias-primas adicionadas à *chicha* de forma complementar ao substrato principal e de forma intencional podem proporcionar uma bebida sensorialmente mais aceita (com aromas e sabores desejáveis) e, também, com melhores propriedades nutricionais. O uso das ervas aromáticas pelos produtores é justificado (dados não mostrados) por conterem aromas perfumados, os quais são transferidos à bebida, e também por apresentarem propriedades benéficas ao organismo, como a ajuda na digestão (propriedades medicinais). Os açúcares e a rapadura, além de proporcionarem um sabor doce à *chicha*, acabam por acelerar a fermentação, tendo em vista o fornecimento de carboidratos simples (dissacarídeos) ao mosto. Além das contribuições nas propriedades sensoriais, nutricionais e, possivelmente, medicinais, as matérias-primas utilizadas na produção das *chichas*, sobretudo aquelas adicionadas no período pós-cocção, podem contribuir com a microbiota dessas bebidas, visto que muitos micro-organismos habitam a superfície de folhas e frutos (CARVAJAL BARRIGA et al., 2011) e podem estar, eventualmente, presentes nos demais adjuntos.

Com relação às *chichas* de *yuca* (mandioca), também existe uma variação nas matérias-primas. As *chichas* produzidas pela comunidade *Guiyero* têm como substrato principal, unicamente a mandioca; já as *chichas* da comunidade *Timbaco*, são produzidas a partir da fermentação da mandioca com a batata-doce.

Tabela 3. Locais de coletas e matérias-primas das amostras de *chichas* do Equador.

Amostra	Local de Coleta	<i>chicha</i>	Outras matérias-primas
1 (NI) ^a	Quito (Pichincha)	arroz	NI ^b
2 (1)	Yasuní (Orellana)	<i>yuca</i>	suco de sementes <i>ungurahua</i>
3 (4)	Yasuní (Orellana)	<i>yuca</i>	suco de sementes <i>ungurahua</i>
4 (4)	Yasuní (Orellana)	<i>yuca</i>	-
5 (1)	Yasuní (Orellana)	<i>yuca</i>	-
6 (3-4)	Yasuní (Orellana)	<i>yuca</i> ^c	batata-doce
7 (8 h)	Quito (Pichincha)	<i>morocho</i>	abacaxi, açúcar, canela, cravo, capim-cidreira, folha de laranja, pimenta-da-Jamaica, rapadura
8 (2)	Quito (Pichincha)	<i>morocho</i>	abacaxi, canela, cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, <i>naranjilla</i> , rapadura
9 (NI)	Otavaló (Imbabura)	sete grãos (milho)	rapadura
10 (NI)	Otavaló (Imbabura)	sete grãos	-
11 (NI)	Otavaló (Imbabura)	sete grãos ^d	-
12 (1)	Riobamba (Chimborazo)	<i>jora</i> (milho)	-
13 (1)	Riobamba (Chimborazo)	<i>jora</i>	rapadura
14 (1)	San Antonio (Pichincha)	<i>jora</i>	-
15 (1)	San Antonio (Pichincha)	<i>jora</i>	rapadura
16 (1)	Mercado Iñaquito - Quito	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura
17 (1)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	canela, cidrão, capim-cidreira, rapadura

Tabela 3. Continuação.

Amostra	Local de Coleta	<i>chicha</i>	Outras matérias-primas
18 (1)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	canela, cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, pimenta-da-Jamaica, rapadura
19 (1)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura
20 (1)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	canela, cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, maracujá, rapadura
21 (1)	Parroquia La Magdalena - Quito	<i>jora</i>	NI
22 (1)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, rapadura
23 (1)	Mercado de Sangolquí (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, pimenta-da-Jamaica, rapadura
24 (2)	Riobamba (Chimborazo)	<i>jora</i>	rapadura
25 (2)	San Antonio (Pichincha)	<i>jora</i>	rapadura
26 (2)	Mercado Central - Quito	<i>jora</i>	canela, ervas, rapadura
27 (2)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	ervas, rapadura
28 (2)	Feira de Salgolquí (Pichincha)	<i>jora</i>	canela, cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura, suco de maracujá
29 (3)	Quito (Pichincha)	<i>jora</i>	cana-de-açúcar, milho branco
30 (3)	Mercado Iñaquito - Quito	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura
31 (3)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura
32 (3)	Mercado de Sangolquí (Pichincha)	<i>jora</i>	anís, canela, cidrão, cravo, capim-cidreira, folha de laranja, pimenta-da-Jamaica, rapadura
33 (4)	Mercado Santa Clara - Quito	<i>jora</i>	rapadura
34 (4)	Mercado Santa Clara - Quito	<i>jora</i>	abacaxi, ervas, rapadura

Tabela 3. Continuação.

Amostra	Local de Coleta	<i>chicha</i>	Outras matérias-primas
35 (4)	Mercado Santa Clara - Quito	<i>jora</i>	ervas aromáticas, rapadura
36 (4)	Parroquia El Inca - Quito	<i>jora</i>	açúcar, aveia, canela, cidrão, cravo, capim-cidreira, rapadura
37 (4)	Mercado Iñaquito - Quito	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura
38 (4)	Mercado de La Magdalena - Quito	<i>jora</i>	abacaxi, açúcar, canela, cidrão, capim-cidreira, essência de baunilha, folha de laranja, <i>naranjilla</i>
39 (4)	Parroquia La Magdalena - Quito	<i>jora</i>	camomila, cidrão, cravo, capim-cidreira, folha de laranja, pimenta-da-Jamaica, rapadura
40 (5)	Feira de Salgolquí (Pichincha)	<i>jora</i>	anís estrelado, canela, cidrão, cravo, capim-cidreira, folha de laranja, pimenta-da-Jamaica
41 (6)	Parroquia El Inca - Quito	<i>jora</i>	açúcar, cravo, capim-cidreira, rapadura
42 (7)	San Antonio (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, rapadura
43 (7)	Restaurante Achiote - Quito	<i>jora</i>	NI
44 (8)	Mercado Iñaquito - Quito	<i>jora</i> ^e	cravo, molhos doces, pimenta
45 (8)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, capim-cidreira, folha de laranja, rapadura
46 (NI)	Riobamba (Chimborazo)	<i>jora</i>	rapadura
47 (0-5 ^f)	El Tingo (Pichincha)	<i>jora</i>	cidrão, rapadura

a números entre parênteses referem-se ao tempo de fermentação

b a sigla NI refere-se a não informado

c *chicha* de *yuca* coletada na comunidade *Timbaco*; as demais *chichas* de *yuca* foram coletadas na comunidade *Guiyero*

d amostra correspondente à *chicha madre* de sete grãos (inóculo da *chicha*)

e amostra correspondente a *chicha* usada no preparo do *ají* (molho picante)

f amostra coletada em diferentes tempos de fermentação (de 0 a 5 dias)

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS

A Tabela 4 mostra as contagens de leveduras e bactérias do ácido láctico, obtidas para 46 amostras, não incluindo a amostra coletada em diferentes tempos de fermentação. As leveduras e BAL foram encontradas em 45 e 42 amostras, respectivamente. As contagens de bactérias lácticas foram mais altas, para todas as amostras, variando de $1,93 \times 10^7$ a $6,97 \times 10^8$, enquanto que as contagens de leveduras variaram de $3,0 \times 10^5$ a $1,12 \times 10^8$. Cox et al. (1987), ao analisarem também diferentes *chichas* do Equador, dentre elas as de banana, *jora*, mandioca, *morocho* e *Yamor* (sete grãos), obtiveram contagens entre $1,5 \times 10^6$ e $3,5 \times 10^7$ para as leveduras, sendo, portanto, similares às obtidas neste trabalho. Almeida et al. (2007), ao estudarem o *cauim*, bebida indígena brasileira fermentada, preparada a partir da mandioca, também verificaram uma preponderância de BAL durante todo o período de fermentação (até 48 horas).

A Tabela 5 mostra também as contagens de leveduras e BAL, mas para a *chicha* coletada em diferentes tempos de fermentação. Como se pode notar, as BAL estavam presentes em todos os tempos de fermentação, inclusive no tempo zero, que representa a *chicha* recém-preparada, sempre em contagens superiores às contagens de leveduras. Altay et al. (2013), caracterizando a microbiota do *boza*, uma bebida fermentada não alcoólica, típica da Turquia, obtiveram também contagens de BAL superiores às contagens de leveduras, durante toda a fermentação, que variaram de $2,94 \times 10^5$ a $4,6 \times 10^8$ e de $2,24 \times 10^5$ a $8,40 \times 10^7$, respectivamente. As contagens de BAL, ligeiramente superiores às contagens de leveduras, são indício da importância que as bactérias lácticas têm na fermentação das *chichas*. Ainda pela Tabela 5, pode-se constatar que as BAL foram os micro-organismos que iniciaram o processo fermentativo; as leveduras apareceram, com 24 de fermentação, possivelmente, após a criação de condições favoráveis pelas BAL, como a acidificação do meio. Lappe-Oliveras et al. (2008) verificaram que as BAL e as leveduras foram os micro-organismos predominantes na seiva e no *pulque* do México e, também, que as BAL iniciavam o processo fermentativo.

Tabela 4. Contagens de leveduras e bactérias lácticas em *chichas* do Equador.

Amostra	Tempo de fermentação (dias)	Leveduras (UFC/mL)	Bactérias lácticas (UFC/mL)
arroz			
1	NI ^a	2,43x10 ⁷	8,60x10 ⁷
<i>yuca</i>			
2	1	2,87x 10 ⁷	4,17x10 ⁸
3	4	3,56x10 ⁷	6,17x10 ⁸
4	3	6,00x10 ⁷	6,97x10 ⁸
5	1	1,12x10 ⁸	1,31x10 ⁹
6	3-4	1,83x10 ⁷	3,84x10 ⁸
<i>morocho</i>			
7	8horas	1,40x10 ⁷	4,99x10 ⁷
8	2	7,66x10 ⁵	2,40x10 ⁷
sete grãos			
9	NI	5,73x10 ⁷	2,80x10 ⁸
10	NI	1,02x10 ⁷	4,50x10 ⁸
11	NI	1,94x10 ⁷	3,37x10 ⁸
<i>jora</i>			
12	1	7,50x10 ⁶	3,73x10 ⁸
13	1	7,37x10 ⁶	-
14	1	9,73x10 ⁶	3,37x10 ⁷
15	1	8,37x10 ⁶	2,50x10 ⁷
16	1	1,04x10 ⁷	4,47x10 ⁸
17	1	6,15x10 ⁶	8,12x10 ⁷
18	1	2,27x10 ⁶	1,78x10 ⁸
19	1	1,02x10 ⁷	6,10x10 ⁷
20	1	6,03x10 ⁶	3,23x10 ⁷

Tabela 4. Continuação.

Amostra	Tempo de fermentação (dias)	Leveduras (UFC/mL)	Bactérias lácticas (UFC/mL)
21	1	1,37x10 ⁶	-
22	1	2,23x10 ⁶	1,73x10 ⁸
23	1	3,93x10 ⁷	1,90x10 ⁸
24	2	6,16x10 ⁷	2,94x10 ⁸
25	2	3,50x10 ⁷	1,63x10 ⁸
26	2	1,75x10 ⁷	1,40x10 ⁸
27	2	4,59x10 ⁶	1,93x10 ⁷
28	2	1,07x10 ⁶	4,52x10 ⁸
29	3	3,32x10 ⁷	3,97x10 ⁸
30	3	6,86x10 ⁶	4,47x10 ⁸
31	3	2,46x10 ⁶	1,66x10 ⁸
32	3	2,90x10 ⁷	9,80x10 ⁷
33	4	2,06x10 ⁷	2,86x10 ⁸
34	4	6,33x10 ⁵	2,47x10 ⁸
35	4	6,65x10 ⁷	1,09x10 ⁸
36	4	6,67x10 ⁵	5,42x10 ⁸
37	4	1,07x10 ⁶	1,75x10 ⁸
38	4	4,45x10 ⁶	1,00x10 ⁸
39	4	7,00x10 ⁵	1,21x10 ⁸
40	5	1,23x10 ⁶	3,09x10 ⁸
41	6	-	-
42	7	2,10x10 ⁶	2,26x10 ⁸
43	7	3,00x10 ⁵	-
44	8	2,07x10 ⁶	3,22x10 ⁸
45	8	1,33x10 ⁶	4,17x10 ⁸
46	NI	1,47x10 ⁷	1,35x10 ⁸

a NI refere-se a não informado

Tabela 5. Contagens de leveduras e bactérias lácticas em *chicha* de *jora* coletada em diferentes tempos de fermentação.

Amostra	Tempo de fermentação (dias)	Leveduras (UFC/mL)	Bactérias lácticas (UFC/mL)
47	0	-	$3,33 \times 10^5$
47	1	$9,66 \times 10^5$	$5,36 \times 10^7$
47	2	$9,99 \times 10^4$	$8,74 \times 10^7$
47	3	$5,67 \times 10^5$	$1,83 \times 10^8$
47	5	$7,56 \times 10^6$	$4,70 \times 10^8$

5.2.1 Isolamento e identificação de leveduras

A partir das 47 amostras de *chichas* coletadas, foram obtidos 328 isolados de leveduras e oito isolados de fungos filamentosos. No entanto, só foram identificados 295 isolados, pois os demais não sobreviveram ao transporte e armazenamento. Os 295 isolados foram identificados em 30 espécies de leveduras (Tabela 6).

Saccharomyces cerevisiae foi a espécie mais prevalente, ocorrendo em 37 das 47 amostras. *Torulaspora delbrueckii* foi a segunda espécie mais frequente, ocorrendo em 20 amostras. *Pichia kudriavzevii*, além de *S. cerevisiae* e *T. delbrueckii*, foi encontrada em três dos cinco tipos de *chichas*. As leveduras *Candida tropicalis*, *Dekkera bruxellensis*, *Pichia fermentans*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces ludwigii* foram encontradas em dois tipos de *chichas*. As demais espécies ocorreram em somente um tipo de *chicha*. López-Arboleda et al. (2010), que identificaram leveduras obtidas de três *chichas* (milho, abacaxi e batata-baroa) da Colômbia, também encontraram uma grande riqueza de espécies, sendo as mais frequentes, *Aureobasidium pullulans*, *C. maltosa*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Cr. arboriformis*, *Debaromyces hansenii*, *D. anomala*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *H. uvarum*, *Kazachstania exigua*, *Kluyveromyces marxianus*, *P. fermentans*, *P. guilliermondii*, *P. kluyveri*, *Rhodotorula glutinis*, *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* e *Yarrowia lypolitica*. Osorio-Cadavid et al. (2008), ao identificarem as leveduras associadas à bebida *champús*, uma bebida tradicional fermentada, à base de cereais, típica da Colômbia, encontraram *Galactomyces geotrichum*, *Hanseniaspora* spp., *Issatchenkia orientalis* (*Pichia kudriavzevii*), *P. fermentans*, *P. kluyveri* e *S. cerevisiae* como as espécies dominantes.

A espécie *S. cerevisiae* é comumente encontrada em alimentos e bebidas fermentados tradicionais, onde se tem demonstrado ser muito importante, sobretudo na fermentação de cereais e bebidas alcoólicas (JESPERSEN, 2003). Vallejo et al. (2013), trabalhando com *chichas* do Peru, identificaram *S. cerevisiae* com a levedura responsável pela fermentação dessas bebidas, apesar dos isolados obtidos apresentarem características fenotípicas diferentes das linhagens conhecidas de *S. cerevisiae*. Na *chicha* avaliada durante cinco dias de fermentação no presente trabalho, *S. cerevisiae* mostrou ser a levedura responsável pela fermentação alcoólica desta amostra, pois foi a primeira levedura a aparecer na bebida (com 24 horas de fermentação) e permaneceu durante os períodos de 48 h, 3 dias e 5 dias

de fermentação (Tabela 7). *S.cerevisiae* apresentou as maiores contagens até o 4º dia; já no 5º dia, *T.delbrueckii* apresentou contagens ligeiramente superiores à *S. cerevisiae*. De acordo com Lurton et al. (1995), *S. cerevisiae* permite não só a produção de etanol em bebidas alcoólicas, bem como de compostos secundários, tais como glicerol, ésteres e alcoóis, responsáveis pelo aroma que caracteriza o produto final.

As espécies *D. anomala*, *D. bruxellensis*, *I. orientalis* (*P.kudriavzevii*), *Pichia anomala* (*Wicherhanomyces anomalus*), *Pichia galeiformis*, *Saccharomyces bayanus*, *S´codes ludwigii*, *Zygorulaspora delbrueckii*, além de *S. cerevisiae*, são leveduras resistentes ao etanol e também que produzem grande quantidade deste composto (STRATFORD, 2006). Diferentemente, as leveduras apiculadas, como *Hanseniaspora/Kloeckera*, apresentam um baixo poder fermentativo (ROMANO et al., 2006). Rodríguez et al. (2009) relataram que a presença de *C. tropicalis* em bebidas fermentadas pode estar relacionada com a capacidade destes micro-organismos de degradar carboidratos complexos. Essa espécie foi encontrada nas chichas de arroz e yuca, no presente trabalho. *Pichia fermentans* e *P. kluyveri* são também importantes espécies fermentativas, assim como *T. delbrueckii*, uma espécie osmotolerante, que já foi isolada de diversas bebidas fermentadas, como o pito, uma bebida africana à base de milho (SEFA-DEDEH et al., 1999), bem como também do vinho e da champagne (HEARD & FLEET, 1993). *Rhodotorula mucilaginosa* é uma levedura ubíqua, que pode ser isolada de diversas fontes, como ar, água, solo, alimentos e bebidas; além disso, coloniza humanos e outros mamíferos (WIRTH & GOLDANI, 2012). Com relação às bebidas fermentadas, *Rh. mucilaginosa* já foi isolada da pulque, do mezcal e do boza (BOTES et al., 2007; LAPPE-OLIVERAS et al., 2008). No presente trabalho, *Rh. mucilaginosa* foi isolada da chicha de arroz e de uma amostra de chicha de jora, com cinco dias de fermentação.

Dentre as cinco *chichas* analisadas, pode-se dizer que a *chicha* de *jora* foi a que apresentou maior riqueza de espécies (22) de leveduras, seguida da *chicha* de *yuca* (7) e da *chicha* de arroz (5). As *chichas* de *morocho* e de sete grãos, apresentaram quatro espécies cada uma. A *chicha* de *jora* é preparada de diferentes modos, e, normalmente, é utilizada uma ampla variedade de matérias-primas, tais como frutas, ervas, especiarias, rapadura e açúcar. As *chichas* de sete grãos e de mandioca são produzidas com poucas matérias-primas, como sete variedades de

farinha de milho, e mandioca e suco das sementes de palma, respectivamente. Entretanto, as variações na microbiota dos diferentes tipos de *chichas* podem ser explicadas, não somente devido à utilização de diferentes matérias-primas, mas também pela metodologia de fabricação e pelas condições da fermentação.

Tabela 6. Espécies e contagens populacionais de leveduras obtidas para as *chichas* de arroz, *morocho*, sete grãos, *yuca* e *jora*.

Espécies	<i>chicha</i> de arroz (n=1) ^a	<i>chicha</i> de <i>morocho</i> (n=2)	<i>chicha</i> de sete grãos (n=3)	<i>chicha</i> de <i>yuca</i> (n=5)	<i>chicha</i> de <i>jora</i> (n=36)
<i>Candida californica</i>	-	-	-	-	4,00x10 ^{5b} (1) ^c
<i>Candida humilis</i>	-	-	-	-	4,73x10 ⁶ (1)
<i>Candida intermedia/C.pseudointermedia</i>	-	-	-	1,33x10 ⁵ (1)	-
<i>Candida sake</i>	-	4,00x10 ⁵ (1)	-	-	1,00x10 ⁵ (1)
<i>Candida solani</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁵ (1)
<i>Candida sorboxylosa</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁴ - 4,67x10 ⁵ (3)
<i>Candida tropicalis</i>	1,67x10 ⁶ (1)	-	-	3,33x10 ⁴ - 9,00x10 ⁶ (3)	-
<i>Candida vinaria</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁴ (1)
<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-	-	8,66x10 ⁵ (1)
<i>Dekkera anomala</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁵ (1)
<i>Dekkera bruxellensis</i>	-	-	1,66x10 ⁵ (1)	-	8,00x10 ⁵ - 4,00x10 ⁶ (2)
<i>Galactomyces candidum</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁴ - 6,67x10 ⁴ (2)
<i>Galactomyces geotrichum</i>	-	-	-	-	2,00x10 ⁵ - 1,00x10 ⁶ (5)
<i>Hanseniaspora meyeri</i>	1,40x10 ⁷ (1)	-	-	-	-
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	-	-	-	3,33x10 ⁴ (1)	-
<i>Hanseniaspora</i> spp.	-	-	-	-	3,33x10 ⁴ - 5,22x10 ⁷ (9)

Tabela 6. Continuação.

Espécies	<i>chicha</i> de arroz (n=1)	<i>chicha</i> de morocho (n=2)	<i>chicha</i> de sete grãos (n=3)	<i>chicha</i> de <i>yuca</i> (n=5)	<i>chicha</i> de <i>jora</i> (n=36)
<i>Kazachstania exigua</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁵ - 5,67x10 ⁷ (3)
<i>Kloeckera apis</i>	5,0x10 ⁶ (1)	-	-	-	-
<i>Kodamaea ohmeri</i>	-	-	-	3,33x10 ⁴ (1)	-
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁴ (1)
<i>Pichia fermentans</i>	-	3,33x10 ⁵ (1)	-	-	1,00x10 ⁵ - 1,63x10 ⁶ (5)
<i>Pichia kluyveri</i>	-	-	-	-	6,67x10 ⁵ (1)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	-	-	2,66x10 ⁵ - 6,60x10 ⁵ (3)	6,70x10 ⁴ - 7,67x10 ⁶ (4)	3,33x10 ⁵ - 1,18x10 ⁷ (2)
<i>Pichia manshurica</i>	-	-	6,66x10 ⁴ (1)	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1,67x10 ⁷ (1)	-	-	-	3,33x10 ⁴ (1)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	3,33x10 ⁴ - 5,64x10 ⁷ (3)	1,53x10 ⁷ - 8,67x10 ⁷ (5)	3,33x10 ⁴ - 3,86x10 ⁷ (29)
<i>Saccharomycodes ludwigii</i>	-	7,00x10 ⁶ (1)	-	-	2,00x10 ⁵ - 1,77x10 ⁶ (2)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	-	3,33x10 ⁵ - 7,00x10 ⁶ (2)	-	1,67x10 ⁵ - 8,00x10 ⁶ (4)	3,33x10 ⁴ - 1,16x10 ⁷ (14)
<i>Zygoascus hellenicus</i>	-	-	-	-	3,33x10 ⁴ (1)
<i>Zygoturulaspora florentina</i>	2,0x10 ⁶ (1)	-	-	-	-

a número de amostras de *chichas*

b contagens populacionais (UFC/mL)

c número de amostras em que a levedura foi encontrada

Tabela 7. Ocorrência de leveduras em *chicha* de *jora* com diferentes tempos de fermentação.

Amostra	Substrato	Tempo de fermentação ^a	Espécie
1	<i>jora</i>	0	-
2	<i>jora</i>	1	<i>S. cerevisiae</i> (6,66x10 ⁵) ^b
3	<i>jora</i>	2	<i>S. cerevisiae</i> (9,99x10 ⁴)
4	<i>jora</i>	3	<i>S. cerevisiae</i> (4,34x10 ⁵), <i>T. delbrueckii</i> (3,33x10 ⁴)
5	<i>jora</i>	5	<i>S. cerevisiae</i> (4,56x10 ⁶), <i>T. delbrueckii</i> (5,06x10 ⁶), <i>Rh. mucilaginosa</i> (3,33x10 ⁴)

a dias de fermentação

b contagens populacionais (UFC/mL)

5.2.2 Análise do perfil de restrição do DNA mitocondrial

Os 122 isolados de *S. cerevisiae* obtidos foram agrupados em 69 perfis moleculares distintos. Para a *chicha* de *yuca* (duas amostras analisadas) foram obtidos 11 isolados de *S. cerevisiae* e três perfis moleculares. Para a *chicha* de sete grãos, foram obtidos 28 isolados de *S. cerevisiae*, os quais foram agrupados em 19 diferentes perfis. Nas amostras de *chicha* de *jora*, a partir dos 83 isolados de *S. cerevisiae*, foram obtidos 47 perfis de restrição. Badotti et al. (2010) encontraram 32 diferentes padrões de restrição do mtDNA a partir de 74 isolados de *S. cerevisiae* de cachaça. Querol et al. (1994) encontraram um total de 39 linhagens de *S. cerevisiae* em duas dornas de fermentação espontânea de vinho, sendo que 19 padrões foram encontrados na primeira dorna e 20, na segunda. Romano et al. (2006) salientaram que a biodiversidade de linhagens de *S. cerevisiae* é comumente observada em fermentações espontâneas e, por isso, tem sido investigada intensivamente.

A *chicha* de *jora* analisada em diferentes tempos de fermentação (amostra 47 na Tabela 5) apresentou 16 isolados de *S. cerevisiae*, os quais foram agrupados em 4 perfis moleculares distintos. A Figura 8 mostra os perfis de restrição do mtDNA encontrados nessa amostra. No primeiro dia de fermentação foram encontrados três padrões moleculares (I, II e III) de *S. cerevisiae*. No segundo, terceiro e quinto dias, foram encontrados apenas dois perfis. O perfil molecular I estava presente no primeiro e segundo dias; o perfil II no primeiro, segundo e terceiro dias; o perfil III no primeiro, terceiro e quinto dias de fermentação. Um quarto perfil molecular foi encontrado somente no quinto dia de fermentação. Apenas a linhagem de *S. cerevisiae* com o perfil molecular III permaneceu no processo de fermentação, até o quinto dia. As contagens obtidas para os padrões variaram de $3,33 \times 10^4$ a $2,33 \times 10^6$ (Tabela 8). Os perfis II e III, encontrados em três tempos de fermentação, apresentaram um aumento nas contagens, com o decorrer da fermentação. Diferentemente, o perfil I apresentou um decréscimo nas contagens e, assim, com três dias, já não pôde mais ser detectado. O perfil IV, apesar de ter aparecido somente com cinco dias, apresentou as contagens mais elevadas. Esta variação de linhagens, observada no presente trabalho e muito comum em fermentações espontâneas, pode ocasionar variações sensoriais na bebida.

Para a *chicha* de *yuca*, observou-se um aumento no número de perfis de restrição do mtDNA com o decorrer da fermentação (Tabela 9). A *chicha* de sete

grãos foi a que apresentou um maior número de perfis por amostra, no entanto, foi também a bebida com maior número de isolados por amostra. Na *chicha* de *jora*, o número de perfis por amostra variou de 1 a 5. O que se verifica, é que, em geral, quanto maior o número de isolados por amostra, maior o número de perfis de restrição de mtDNA obtidos.

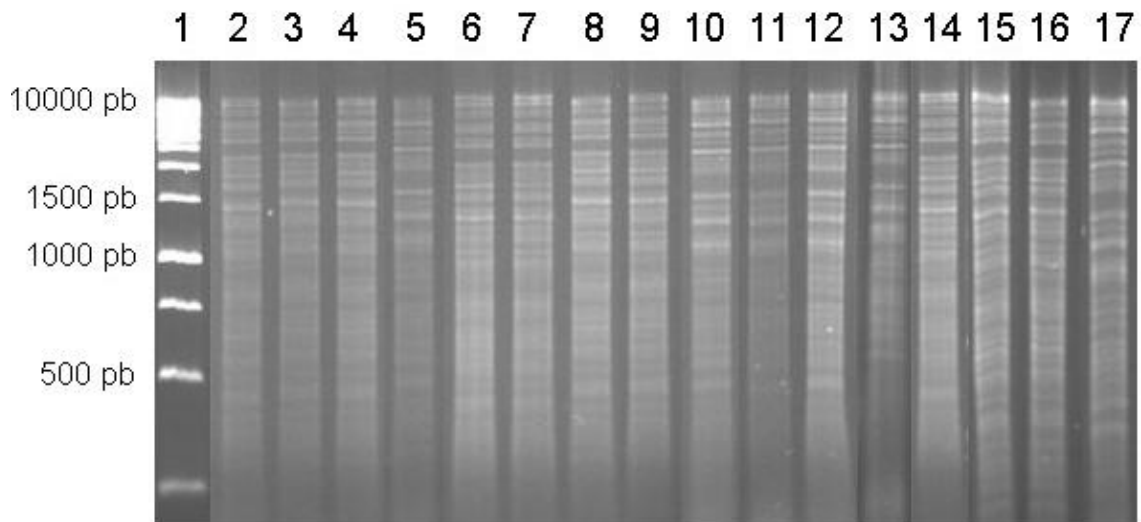


Figura 8. Perfis de restrição do mtDNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos da *chicha* de *jora* em diferentes tempos de fermentação. Coluna: 1: 1Kb DNA ladder; 2-7: perfis encontrados com um dia de fermentação (2-4: perfil I; 5: perfil II; 6-7: perfil III); 8-10: perfis encontrados com dois dias de fermentação (8-9: perfil I; 10: perfil II); 11-15: perfis encontrados com três dias de fermentação (11-13: perfil II; 14-15: perfil III); 16-17: perfis encontrados com cinco dias de fermentação (16: perfil III; 17: perfil IV).

Tabela 8. Perfis de restrição do mtDNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante cinco dias de fermentação em uma amostra de *chicha de jora*.

Tempo de fermentação ^a	Padrões ^b			
	1	2	3	4
0	-	-	-	-
1	$3,33 \times 10^5$	$3,33 \times 10^4$	$3,33 \times 10^5$	-
2	$6,66 \times 10^4$	$3,33 \times 10^4$	-	-
3	-	$9,99 \times 10^4$	$4,34 \times 10^5$	-
5	-	-	$2,23 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$

a dias de fermentação

b contagens dos padrões de restrição do mtDNA de linhagens de *S. cerevisiae* (UFC/mL)

Tabela 9. Perfis de restrição do mtDNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* obtidos para as *chichas* de sete grãos, *yuca* e *jora*.

Amostra	<i>chicha</i> de sete grãos nº de isolados/nº de perfis	<i>chicha</i> de <i>yuca</i> nº de isolados/nº de perfis	<i>chicha</i> de <i>jora</i> nº de isolados/nº de perfis
1	10/6 (ND)	6/2 (1) ^a	3/3 (1)
2	15/7 (ND)	5/3 (4)	1/1 (1)
3	7/7 (ND)	-	2/2 (1)
4	-	-	1/1 (1)
5	-	-	5/5 (1)
6	-	-	4/3 (1)
7	-	-	1/1 (1)
8	-	-	3/3 (1)
9	-	-	3/3 (1)
10	-	-	2/2 (1)
11	-	-	3/3 (1)
12	-	-	1/1 (2)
13	-	-	2/1 (2)
14	-	-	1/1 (2)
15	-	-	5/4 (2)
16	-	-	1/1 (3)
17	-	-	5/4 (3)
18	-	-	3/2 (3)
19	-	-	4/3 (3)
20	-	-	1/1 (4)
21	-	-	1/1 (4)
22	-	-	1/1 (4)
23	-	-	1/1 (4)
24	-	-	6/5 (5)
25	-	-	3/3 (7)
26	-	-	1/1 (8)
27	-	-	2/1 (8)
28	-	-	1/1 (ND)
29	-	-	16/4

a números entre parênteses referem-se ao tempo de fermentação

5.2.3 Isolamento e identificação de bactérias lácticas

A partir das 47 amostras de *chichas* coletas, foram obtidos 450 isolados de bactérias lácticas. No entanto, somente foram identificados os isolados da coleta de 2010 (166), visto que mais da metade dos isolados de 2012 não sobreviveram ao transporte e armazenamento. Dentre os 166 isolados, 116 foram identificados em 11 espécies de BAL (Tabela 10).

Os isolados que apresentaram igual perfil morfológico e provenientes de uma mesma amostra foram agrupados e então caracterizados molecularmente a partir da análise de restrição de enzimas (*Hinfl*, *HaeIII* e *MspI*). Alguns exemplares de perfis moleculares obtidos são mostrados nas Figuras 9 e 10. As espécies obtidas foram identificadas por meio de sequenciamento da região 16S do rRNA.

Dentre os dois gêneros de BAL obtidos, *Lactobacillus* e *Streptococcus*, o primeiro foi predominante, representando 10 das 11 espécies identificadas. Na bebida *cauim*, o gênero *Lactobacillus* também foi o mais comum obtido dentre as demais bactérias isoladas, sendo as espécies *L. pentosus* e *L. plantarum*, as mais preponderantes (ALMEIDA et al., 2007). Dentre os lactobacilos obtidos no presente trabalho, *Lactobacillus fermentum* (onze amostras), *Lactobacillus plantarum* (dez), *Lactobacillus casei/L.paracasei* (sete) e *Lactobacillus brevis* (cinco) foram os mais prevalentes. As demais espécies foram encontradas em três, duas ou uma amostra. *L. fermentum* e *L. plantarum* foram as únicas BAL encontradas em mais de dois tipos de *chichas*; o primeiro foi encontrado nos quatro tipos de *chichas* analisadas e o segundo, em três tipos de *chichas*. *L. brevis*, *L. casei/L.paracasei*, *L.delbrueckii*, *L.diolorans* e *L. hilgardii* foram isolados em dois tipos de *chichas*; *Lactobacillus acidophilus*, *L. parabuchneri*, *L. vaginalis* e *Streptococcus gallolyticus*, em somente um tipo.

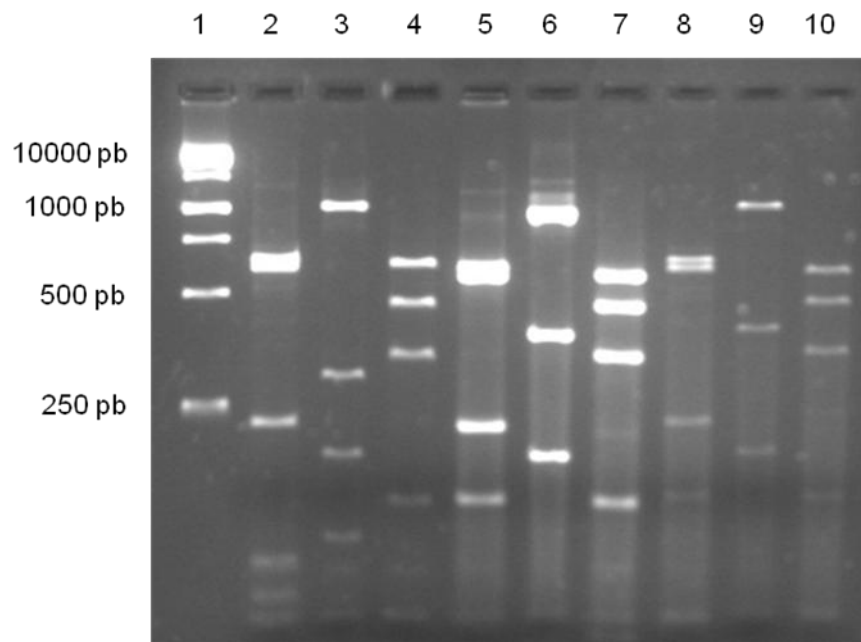


Figura 9. Perfil de digestão de *Lactobacillus* spp. isolados de uma amostra de *chicha de jora*. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Lactobacillus casei* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I); 5-7: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I); 8-10: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*Hinf*I, *Hae*III, *Msp*I).

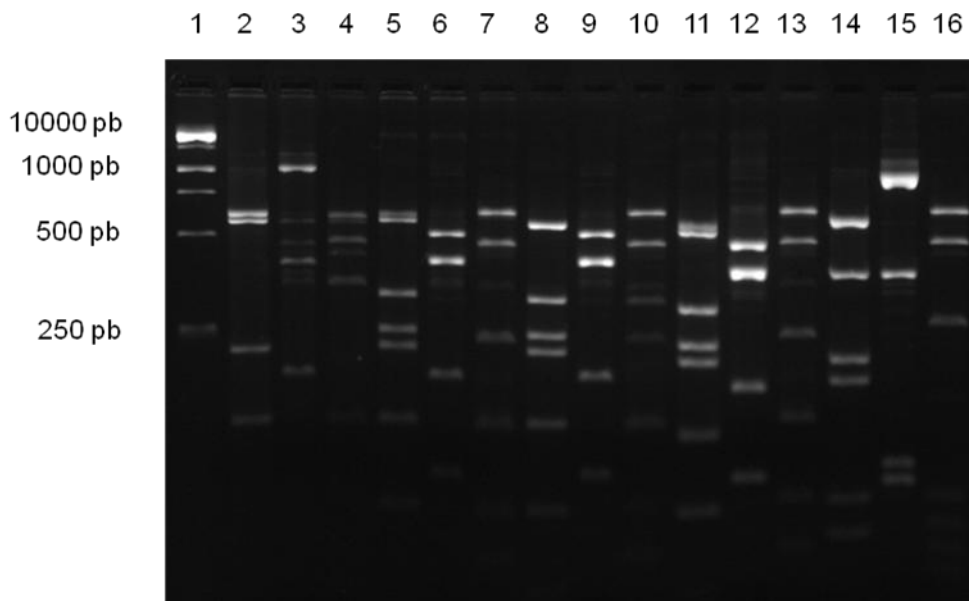


Figura 10. Perfil de digestão de *Lactobacillus* spp. isolados de uma amostra de *chicha* de sete grãos. Canaletas: 1: 1 kb DNA padrão de peso molecular; 2-4: perfil de *Lactobacillus plantarum* (*Hinfl*, *Haelll*, *Mspl*); 5-7: perfil de *Lactobacillus fermentum* (*Hinfl*, *Haelll*, *Mspl*); 8-10: perfil de *Lactobacillus fermentum* (*Hinfl*, *Haelll*, *Mspl*); 11-13: *Lactobacillus fermentum* (*Hinfl*, *Haelll*, *Mspl*); 14-16: *Lactobacillus acidophilus* (*Hinfl*, *Haelll*, *Mspl*).

As BAL encontradas no presente trabalho já foram relatadas em outros trabalhos de fermentações de alimentos e bebidas. *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* e *L. hilgardii* já foram isoladas de *chichas* do Equador, em trabalho realizado anteriormente (COX et al., 1987). A espécie *L. plantarum* também é encontrada frequentemente em fermentações de vegetais como azeitonas, repolho, pepinos, berinjelas e alcaparras, e também no mosto do vinho. *L. brevis*, também já foi encontrado nestas mesmas fermentações, com exceção de azeitonas; *L. fermentum*, em fermentações de berinjelas e alcaparras e *L. hilgardii* na fermentação do mosto do vinho (RODRÍGUEZ et al., 2009). *L. delbrueckii* é uma espécie importante na produção de diversas bebidas alcoólicas como a cerveja, o uísque e o rum (CARR et al., 2002) As bactérias do grupo *Lactobacillus casei*, que incluem as espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* possuem um importante

valor comercial para a indústria alimentícia, devido ao seu emprego na produção de leites fermentados e como culturas iniciadoras na fabricação de queijos. Além disso, podem ser encontradas em produtos vegetais, ensilagens, na boca e trato intestinal (BURITI & SAAD, 2007). *L. vaginalis* já foi isolado da microbiota humana (CARR et al., 2002) e de fezes de animais carnívoros (ENDO et al., 2010), como também de fermentações de massas azedas (MORONI et al., 2011). Além de serem encontrados associados a vegetais e plantas, os lactobacilos podem também ser transferidos aos alimentos a partir de humanos e animais, hospedeiros naturais dessas bactérias. Os estreptococos também são, em sua maioria, comensais de animais de sangue quente e aves, sendo comumente encontrados no trato intestinal desses animais (VOS et al., 2009). A espécie *S. gallolyticus* que, no presente trabalho, foi encontrada somente em *chicha* de *yuca*, é frequentemente isolada do trato intestinal de animais (OSAWA et al., 1995).

Dentre as *chichas* analisadas, pode-se dizer que as *chichas* de sete grãos e *jora* foram as que apresentaram maior riqueza de espécies de BAL, com oito, cada uma, seguidas da *chicha* de *yuca* (quatro espécies). A *chicha* de arroz apresentou uma única espécie, *L. fermentum*. Ramos et al. (2011), que trabalharam com uma bebida à base de arroz, produzida por índios brasileiros, encontraram vários lactobacilos, como *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. vermiforme*, *L. sakei* e *L. brevis*, porém nenhum *L. fermentum*, ao contrário do encontrado neste trabalho. No entanto, *L. fermentum* já foi isolado da bebida *sake* (à base de arroz), já em estado de deterioração (VOS et al., 2009). A presença do grande número de ingredientes nas *chichas* de *jora* e sete grãos, além da manipulação constante dessas bebidas, pode ter contribuído para a maior riqueza de BAL nessas bebidas. As *chichas* de *jora* e de sete grãos estão sujeitas a uma manipulação constante, visto que as bebidas são transferidas periodicamente dos barris de fermentação para vasilhas menores, para facilitar a venda e o manejo da bebida.

Tabela 10. Espécies e contagens populacionais de bactérias do ácido láctico obtidas para as *chichas* de arroz, sete grãos, *yuca* e *jora*.

Espécies	<i>chicha</i> de arroz (n=1) ^a	<i>chicha</i> de sete grãos (n=3)	<i>chicha</i> de <i>yuca</i> (n=5)	<i>chicha</i> de <i>jora</i> (n=9)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	1,76x10 ⁷ - 1,23x10 ⁸ ^b (3) ^c	-	-
<i>Lactobacillus brevis</i>	-	-	6,70x10 ⁶ - 1,07x10 ⁸ (3)	1,99x10 ⁷ - 9,00x10 ⁷ (2)
<i>Lactobacillus casei/L. paracasei</i>	-	3,30x10 ⁶ - 1,50x10 ⁸ (3)	-	3,30x10 ⁶ - 2,23x10 ⁸ (4)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	-	3,30x10 ⁶ - 1,33x10 ⁷ (2)	-	1,20x10 ⁸ (1)
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	-	3,30x10 ⁶ (1)	-	1,27x10 ⁷ (1)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	6,7x10 ⁷ (1)	8,00x10 ⁷ - 1,80x10 ⁸ (3)	3,30x10 ⁶ - 2,36x10 ⁸ (5)	1,63x10 ⁷ - 1,67x10 ⁷ (2)
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	-	3,30x10 ⁶ (1)	-	1,33x10 ⁶ - 5,33x10 ⁷ (2)
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	-	-	-	1,33x10 ⁶ (1)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	1,00x10 ⁷ - 1,00x10 ⁷ (2)	1,00x10 ⁷ - 1,27x10 ⁸ (3)	1,07x10 ⁷ - 3,06x10 ⁸ (5)
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-	3,30x10 ⁶ - 3,30x10 ⁶ (2)	-	-
<i>Streptococcus gallolyticus</i>	-	-	1,10x10 ⁸ - 1,73x10 ⁸ (2)	-

a número de amostras de *chichas*

b contagens populacionais (UFC/mL)

c número de amostras em que a bactéria do ácido láctico foi encontrada

5.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os parâmetros físico-químicos de 46 amostras analisadas são mostrados na Tabela 11. Os valores de pH encontrados variaram de 4,15, na amostra 2, uma *chicha* de *yuca* com um dia de fermentação até 2,62, na amostra 44, uma *chicha* de *jora* com 8 dias de fermentação. Estes resultados eram esperados, pois com o decorrer da fermentação, ocorre a síntese de ácidos orgânicos, que levam à acidificação do meio. Almeida et al. (2007) também encontraram valores de pH similares no *cauim*; o intervalo obtido foi de 3,64, com 48 horas de fermentação a 5,2, no tempo zero de fermentação.

Os açúcares redutores totais apresentaram uma grande variação, possivelmente devido aos diferentes tempos de fermentação das amostras e, também, às diferentes matérias-primas utilizadas. O valor mais baixo encontrado foi de 1,63 g/L, correspondente a uma *chicha* de *jora* e o maior valor foi 38,68 g/L, para a *chicha* de arroz.

O etanol foi obtido em 25 das 46 amostras. Três das 25 amostras apresentaram valores muito baixos, inferiores a 0,5% v/v. De acordo com o Decreto nº 6.871, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as bebidas são classificadas como alcoólicas quando apresentam graduação alcoólica acima de meio por cento em volume (BRASIL, 2009). Desta forma, levando-se em conta a legislação brasileira, pode-se dizer que 22 amostras, que incluem a *chicha* de arroz, as *chichas* de *yuca*, as *chichas* de sete grãos e dezesseis *chichas* de *jora* inserem-se na definição de bebidas alcoólicas. Os teores de etanol obtidos, para as bebidas classificadas como fermentadas alcoólicas, variaram de 0,54% v/v até 5,97% v/v, sendo o primeiro valor referente à *chicha* de arroz e o segundo, a uma *chicha* de *jora*, com um dia de fermentação.

Por meio de análise por HPLC foi possível também determinar a concentração de alguns carboidratos, ácidos orgânicos e glicerol presentes nas bebidas. A concentração dos carboidratos variou significativamente entre as diferentes amostras e, mesmo em uma mesma amostra (Tabela 12). Essa variação pode estar relacionada com a eficiência da comunidade microbiana na utilização destes açúcares.

Os ácidos orgânicos contribuem para o sabor final da bebida. No entanto, quando presentes em grandes quantidades (ex.: ácido acético), podem resultar em sabores indesejáveis. Para o vinho, o valor máximo de ácido acético não pode ser superior a 1,0 - 1,5 g/L, variando de acordo com a legislação do país (ROMANO et al., 2006). Esse ácido foi encontrado em seis das 46 amostras de *chicha*, sendo que três apresentaram valores superiores a 1,0 g/L. O ácido láctico foi encontrado em 32 das 46 amostras analisadas, sendo o valor máximo encontrado de 6,90 g/L. Almeida et al. (2007) encontraram valores bem menores na bebida *cauim*; os valores de ácido láctico obtidos variaram de 0,019 (no tempo zero) a 0,075 g/L (48 horas).

O glicerol é um álcool de grande importância nas bebidas alcoólicas, uma vez que fornece um aroma doce e contribui para a viscosidade do produto final (ROMANO et al., 2006). O maior valor de glicerol obtido foi de 3,65 g/L, em uma *chicha* de *jora*, com 4 dias de fermentação. Nos vinhos, níveis de entre 1g/L e 15 g/L são frequentemente encontrados e os níveis mais elevados contribuem para a suavidade e viscosidade da bebida (SCANES et al., 1998).

Altay et al. (2013) obtiveram resultados dos parâmetros físico-químicos bem similares aos encontrados no presente trabalho para o *shalgam juice*, bebida fermentada não alcoólica, produzida a partir da fermentação láctica da cenoura preta. De acordo com os autores, o pH dessa bebida varia entre 3,15 e 4,25 e os principais produtos obtidos da fermentação são ácido láctico (5,18 a 8,05 g/L), ácido acético (0,57 a 0,83 g/L), etanol, encontrado em baixas quantidades (0,79 a 6,41%), além de compostos aromáticos voláteis. Com relação à bebida *boza*, uma bebida produzida a partir da fermentação de BAL e leveduras, o pH varia entre 3,16 a 4,63 e o teor de etanol desde valores não detectáveis até 0,39%. A utilização de diferentes matérias-primas e, em diferentes quantidades, bem como variações no tempo de fermentação e na temperatura são fatores importantes que podem afetar os parâmetros físico-químicos, proporcionando variações de composição (ALTAY et al., 2013).

As *chichas* de mandioca e de sete grãos foram as bebidas que apresentaram os maiores teores de dextrinas. Os valores encontrados variaram de 43,79 g/L a 59,73 g/L para a *chicha* de *yuca* e de 44,36 g/L a 53,08 g/L para a *chicha* de sete grãos. As dextrinas são polissacarídeos de glicose resultantes da hidrólise do amido por enzimas celulares. A maltose (dissacarídeo), a maltotriose (trissacarídeo) e a glicose (monossacarídeo) são açúcares também formados a partir da degradação do

amido. Visto que a mandioca é um substrato rico em amido e a *chicha* de sete grãos, produzida a partir de sete variedades de milho, a quantidade inicial de amido presente nessas amostras era bem alta. As enzimas celulares das *chichas* de *yuca* e de sete grãos correspondem, respectivamente, às enzimas salivares, e às enzimas do malte de milho, estas últimas formadas durante o processo de malteação. Com relação ainda a essas bebidas, verificou-se também um aumento gradual no teor de etanol, para a *chicha* de *yuca*, com o decorrer da fermentação e também um aumento de etanol na primeira *chicha* de sete grãos (amostra 9) em relação à segunda *chicha* (amostra 10). De acordo com a Tabela 3, a amostra 9 continha rapadura, ao contrário da amostra dez. Isto pode ter contribuído para o aumento de açúcares fermentáveis no meio, gerando assim maiores quantidades de etanol.

Para a *chicha de jora* analisada em diferentes tempos de fermentação, o que se percebe é uma diminuição gradual do pH, com o passar dos dias, e um aumento nas quantidades de ácido láctico. Os compostos como glicerol, ácido acético e etanol somente foram detectados com cinco dias de fermentação.

Por meio dos parâmetros físico-químicos obtidos foi possível inferir que a fermentação das *chichas* do Equador é primariamente uma fermentação láctica, dada a alta concentração de ácido láctico nas bebidas.

Tabela 11. Parâmetros físico-químicos determinados para as amostras de *chichas* coletadas no Equador.

<i>Chicha</i>	Tempo de fermentação ^a	pH	Açúcares redutores totais (g/L)	Dextrina (g/L)	Maltotriose (g/L)	Maltose (g/L)	D-Glicose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (%v/v)
<i>arroz</i>											
1	ND	3,48±0,01	38,68±0,64	24,67±14,22	-	0,86±0,70	1,50±0,39	-	-	-	0,54±1,92
<i>yuca</i>											
2	1	4,15±0,01	34,83±4,51	59,73±62,08	20,67±17,19	17,33±13,04	2,60±1,05	1,40±0,19	4,72±1,10	-	2,28±12,00
3	4	3,94±0,00	7,93±0,03	43,79±21,07	0,74±2,09	-	1,67±0,46	1,34±0,19	4,58±2,44	-	3,15±3,02
4	3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	3-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>morocho</i>											
7	8 hours	3,79±0,01	9,17±0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	2	3,84±0,02	7,82±0,23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Sete grãos</i>											
9	ND	3,71±0,03	14,71±0,62	53,08±11,33	0,60±0,35	0,99±0,01	72,69±23,84	2,59±0,85	6,90±2,11	-	2,99±1,13
10	ND	3,30±0,01	7,48±0,21	57,73±53,20	-	-	-	-	5,76±6,95	-	0,71±3,84
11	ND	3,31±0,00	2,76±0,07	44,36±29,72	-	-	-	2,13±1,00	6,66±1,03	-	1,98±12,02
<i>jora</i>											
12	1	3,79±0,01	12,42±0,14	3,25±3,49	-	-	20,44±58,92	1,12±0,30	1,70±0,95	-	1,07±4,65
13	1	3,64±0,02	9,11±0,09	2,63±6,52	-	-	19,20±41,39	1,27±2,49	2,11±3,36	-	1,87±21,52
14	1	3,23±0,03	6,81±0,13	16,12±7,48	1,10±1,15	1,69±0,37	0,95±1,51	3,35±1,71	4,50±2,18	1,05±14,80	5,97±18,63
15	1	3,23±0,01	20,6±0,11	8,46±11,09	0,99±1,73	1,12±1,51	12,36±14,48	1,99±2,47	1,93±1,82	-	2,75±36,97
16	1	3,20±0,01	6,97±0,07	6,26±1,01	-	-	21,61±4,47	-	2,17±0,76	-	-
17	1	3,89±0,01	6,98±0,14	22,67±0,67	-	-	42,16±16,07	-	1,47±12,71	-	-
18	1	3,56±0,02	5,78±0,23	16,26±6,32	-	-	30,04±8,53	0,96±0,32	2,17±0,74	-	0,65±1,91

Tabela 11. Continuação.

<i>Chicha</i>	Tempo de fermentação ^a	pH	Açúcares redutores totais (g/L)	Dextrina (g/L)	Maltotriose (g/L)	Maltose (g/L)	D-Glicose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (%v/v)
19	1	3,89±0,01	7,19±0,09	24,00±6,97	-	-	42,96±18,17	-	2,46±1,27	-	0,46±7,81
20	1	3,87±0,01	7,12±0,03	20,43±4,67	-	-	25,71±5,27	-	1,90±0,57	-	-
21	1	4,13±0,03	3,40±0,18	10,27±4,13	-	1,28±1,15	42,01±9,06	-	-	-	-
22	1	3,73±0,02	7,26±0,03	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
23	1	3,62±0,01	5,84±0,09	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24	2	3,45±0,00	36,24±0,10	22,79±36,04	0,73±0,81	-	27,80±31,37	2,04±1,65	3,77±2,92	1,03±14,53	2,76±15,70
25	2	3,30±0,00	10,08±0,03	12,97±5,52	1,50±0,48	2,53±0,60	8,56±2,73	0,83±0,21	3,79±0,42	-	1,21±1,49
26	2	3,34±0,02	1,63±0,02	18,76±2,28	-	-	0,53±0,41	-	2,23±1,23	0,89±0,07	0,20±27,33
27	2	3,88±0,01	7,17±0,12	19,79±2,86	-	-	23,83±9,70	-	1,80±1,79	-	-
28	2	3,47±0,01	4,77±0,04	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
29	3	3,55±0,09	34,20±1,87	17,43±23,91	-	-	17,15±24,15	2,51±2,91	1,94±1,95	-	2,40±13,53
30	3	3,24±0,01	6,94±0,06	6,67±0,80	-	-	23,73±2,33	-	2,27±0,06	-	-
31	3	3,68±0,00	6,92±0,06	7,65±8,05	1,82±1,38	3,57±1,85	32,65±8,80	-	1,83±2,00	-	0,37±25,85
32	3	3,93±0,01	6,64±0,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33	4	2,84±0,01	6,93±0,05	16,98±3,55	-	-	82,60±12,88	1,53±0,58	3,74±0,95	0,21±3,65	1,51±8,12
34	4	3,49±0,01	6,94±0,03	17,63±3,96	0,64±0,41	-	39,57±12,95	3,65±0,17	2,91±0,43	-	3,02±3,75
35	4	3,05±0,01	6,89±0,04	26,13±2,34	0,56±1,08	0,83±1,85	37,57±9,94	1,80±0,57	1,59±0,80	-	1,47±8,97
36	4	3,37±0,01	1,66±0,19	21,43±0,43	-	-	45,15±10,35	-	3,03±0,62	-	-
37	4	3,37±0,01	6,97±0,05	7,53±0,69	-	0,96±0,53	18,00±2,79	-	1,95±0,77	-	-
38	4	3,56±0,02	3,31±0,09	19,61±9,10	-	-	53,88±21,24	-	1,95±1,64	-	-
39	4	3,36±0,02	5,66±0,10	10,86±7,08	-	-	34,55±14,63	1,61±0,62	1,58±0,69	-	1,38±4,43
40	5	4,04±0,01	10,91±0,31	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
41	6	4,14±0,00	6,56±0,06	29,21±4,20	-	-	45,48±15,46	-	-	-	-

Tabela 11. Continuação.

<i>Chicha</i>	Tempo de fermentação ^a	pH	Açúcares redutores totais (g/L)	Dextrina (g/L)	Maltotriose (g/L)	Maltose (g/L)	D-Glicose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (%v/v)
42	7	3,01±0,01	7,91±0,07	1,42±1,30	-	-	-	-	3,40±0,95	16,55±0,28	1,71±23,18
43	7	3,20±0,01	2,65±0,06	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
44	8	2,62±0,00	1,86±0,15	14,83±2,79	-	-	-	-	3,51±0,28	-	1,21±4,75
45	8	3,02±0,01	2,06±0,18	10,47±2,35	-	-	0,80±0,49	2,66±0,42	5,88±1,01	0,88±0,55	3,02±1,77
46	ND	3,39±0,00	16,70±0,59	10,06±5,37	0,95±0,20	1,55±0,24	24,50±2,46	3,38±1,10	3,79±1,09	-	4,22±3,81

a dias de fermentação

b ND refere-se a não determinado

Tabela 12. Parâmetros físico-químicos determinados para uma *chicha de jora* durante cinco dias de fermentação.

Amostra	Tempo de fermentação	pH	Açúcares redutores totais (g/L)	Dextrina (g/L)	Maltotriose (g/L)	Maltose (g/L)	D-Glicose (g/L)	Glicerol (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (%v/v)
47	0	7,50±0,01	1,76±0,07	ND ^a	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
47	1	4,27±0,01	6,23±0,02	13,00±0,66	0,43±3,89	2,89±1,37	26,37±12,35	-	1,53±1,20	-	-
47	2	4,18±0,02	6,48±0,07	14,06±3,92	-	3,89±0,81	35,40±17,41	-	1,83±2,11	-	-
47	3	4,02±0,03	7,14±0,07	10,95±1,82	4,56±1,61	6,32±0,87	42,69±13,26	-	2,41±2,10	-	-
47	5	3,57±0,02	7,08±0,04	12,06±0,65	5,71±0,72	2,46±1,26	30,14±1,57	1,35±1,17	3,73±0,77	0,70±0,10	0,89±8,20

a dias de fermentação

b ND refere-se a não determinado

6 CONCLUSÕES

- A partir das amostras de *chichas* coletadas, encontrou-se uma grande riqueza de espécies de leveduras e bactérias do ácido láctico. A associação desses microorganismos, oriundos das matérias-primas, equipamentos e utensílios, bem como de insetos, animais e dos produtores das bebidas, pode ter importante papel na produção dessas bebidas e, possivelmente, também na qualidade das *chichas*.
- Um elevado número de padrões moleculares de *Saccharomyces cerevisiae* foi encontrado neste trabalho, o que já era esperado, visto que a maioria das bebidas é fermentada espontaneamente, ou seja, sem o uso de culturas iniciadoras. Na *chicha* de *jora* avaliada em diferentes tempos de fermentação (0 a 5 dias), o padrão que permaneceu até o 5º dia de fermentação corresponde, provavelmente, à linhagem mais adaptada às condições da fermentação e à principal responsável pela condução da fermentação alcoólica nesta amostra.
- A grande variação dos parâmetros físico-químicos, sobretudo dos açúcares, encontrada nas *chichas* do presente trabalho, pode estar relacionada às diferentes matérias-primas utilizadas, métodos de produção das bebidas, microbiota, bem como condições de fermentação.
- As *chichas* de arroz, *yuca* e sete grãos podem ser consideradas bebidas fermentadas alcoólicas, de acordo com a legislação brasileira. Já as *chichas* de *jora* podem ser classificadas como fermentadas ou não fermentadas e ainda como fermentadas alcoólicas ou não alcoólicas, visto que em algumas amostras não houve detecção de leveduras ou BAL e ainda, presença de etanol ou ácido láctico.
- Por fim, as diferentes *chichas* do Equador podem ser consideradas, primariamente, bebidas fermentadas ácidas, produzidas a partir de uma associação de bactérias do ácido láctico, sobretudo de lactobacilos, com *Saccharomyces cerevisiae* e leveduras não-*Saccharomyces*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, M.; COLLINS, M.D. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 62, p. 473-477, 1993.
- AIDOO, K.E.; ROB NOUT, M.J.; SARKAR, P.K. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Research*, v. 6, p. 30-39, 2006.
- ALMEIDA, E.G.; RACHID, C.C.T.C.; SCHWAN, R.F. Microbial population present in fermented beverage 'cauim' produced by Amerindians. *International Journal of Food Microbiology*, v. 120, p. 146-151, 2007.
- ALTAY, F.; KARBANCIUGLU-GÜLER, F.; DASKAYA-DIKMEN, C.; HEPERKAN, D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology*, v.167, p. 44-56, 2013.
- ANNAN, N.T.; POLL, L.; JAKOBSEN, M.; SEFA-DEDEH, S. Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. *Journal of Applied Microbiology*, v. 94, p. 462-474, 2003.
- BADOTTI, F.; BELLOCH, C. ROSA, C.A.; BARRIO, E.; QUEROL, A. Physiological and molecular characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* cachaça strains isolated from different geographic regions in Brasil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 26, p. 579-587, 2010.
- BELETI, M.A.; DUARTE, F.; GEORG-KRAEMER, J.E. A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3,1-4) – β -glucanases e degradação de β -glucanos durante a malteação. *Ciência Rural*, v.42, p. 467-473, 2012.
- BLANDINO, A.; AL-ASEERI, M.E.; PANDIELLA, S.S.; CANTERO, D.; WEBB, C. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, v. 36, p. 527-543, 2003.

BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W. The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 77, p. 157-172, 2013.

BOKULICH, N.A.; MILLS, D.A. Differentiation of mixed lactic acid bacteria communities in beverage fermentations using targeted terminal restriction fragment length polymorphism. *Food Microbiology*, v. 31, p. 126-132, 2012.

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

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C.; FRISVAD J.C.; GERDS, M.L.; HAMMES, W.P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I.B.; PRAJAPATI, J.B.; SETO, Y.; SCHURE, E.T.; BOVEN, A.V.VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E.B. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International Journal of Food Microbiology*, v.154, p. 87-97, 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jun. 2009.

BRIGHTWELL, G.; BOEREM, J.; MILLS, J.; MOWAT, E.; PULFORD, D. Identifying the bacterial community on the surface of IntraloxTM belting in a meat boning room by culture-dependent and culture-independent 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, v. 109, p. 47-53, 2006.

BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 57, p. 373-379, 2007.

CAMPBELL-PLATT, G. Fermented foods – a world perspective. *Food Research International*, v.27, p. 253-257, 1994.

CAPLICE, E. FITZGERALD, G.F. Food fermentation: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 50, p. 131-149, 1999.

CARR, F.J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 28, p. 281-370, 2002.

CARVAJAL BARRIGA, E.J.; LIBKIND, D.; BRIONES, A.I.; IRANZO, J. U.; PORTERO, P., ROBERTS, I.; JAMES, S.; MORAIS, P.B.; ROSA, C.A. Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. In: GRILLO, O. (Ed.). *Changing Diversity in Changing Environment*. InTech, p. 55-86, 2011.

CARVAJAL, J. Arqueología microbiana. *Nuestra Ciencia*, n. 14, p. 3-7, 2012.

CHANG, C-F.; LIN, Y-C.; CHEN, S-F.; CARVAJAL BARRIGA, E.J.; BARAHONA, P.P.; JAMES, S.A.; BOND, C.J.; ROBERTS, I.N.; LEE, C-F. *Candida theae* sp. nov., a new anamorphic beverage-associated member of the *Lodderomyces* clade. *International Journal of Food Microbiology*, v. 153, p. 10-14, 2012.

CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. Nutritional improvement of cereals by sprouting. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 28, p. 348-400, 1989.

COX, L.J.; CAICEDO, B.; VANOS, V.; HECK, E.; HOLFSTAETTER, S.; CORDIER, J.L. A catalogue of some Ecuadorean fermented beverages, with notes on their microflora. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 3, p. 143-153, 1987.

ENDO, A.; FUTAGAWA-ENDO, Y.; DICKS, L.M.T. Diversity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in feces of herbivores, omnivores and carnivores. *Anaerobe*, v. 16, p. 590-596, 2010.

ESCALANTE, A.; RODRÍGUEZ, M.E.; MARTÍNEZ, A.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A.; BOLÍVAR, F.; GOSSET, G. Characterization of bacterial diversity in *Pulque*, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters*, v. 235, p. 273-279, 2004.

FARIAS, D.; MARGARITES, A.C.; REINEHR, C.O.; COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V.; BERTOLIN, T.E. Potencial amilolítico do grão de milho maltado no processo de sacarificação do mesmo cereal. *Ciência e Agrotecnologia*, v.33, p. 855-862, 2009.

FOSCHINO, R., GALLINA, S., ANDRIGHETTO, C., ROSSETI, L., GALLI, A. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for italian sweet baked products. *FEMS Yeast Research*, v. 4, p. 609-618, 2004.

FOX, P.F. Cheese: an overview. In: FOX, P.F (Ed.). *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*. London England: Chapman and Hall, p. 1-36, 1993.

GOLDSTEIN, D.J.; COLEMAN, R.C. *Schinus molle* L. (Anacardiaceae) *chicha* production in the Central Andes. *Economy Botany*, v. 58, p. 523-529, 2004.

GOMES, F.C.O.; LACERDA, I.C.A.; LIBKIND, D.; LOPES, C.A.; CARVAJAL, J.; ROSA, C. A. Traditional foods and beverages from South America: microbial communities and production strategies. In: KRAUSE, J.; FLEISHER, O. (Org.). *Industrial Fermentation: Food Processes, Nutrient Sources and Production Strategies*. Hauppauge NY: Nova Science Publishers. Inc., 2010, v. 1, p. 1-15.

GOMEZ, P.J. La Chicha, su fabricación y algunas sugerencias técnicas adicionales a las disposiciones legales en actual vigencia. Notas Agronomicas. *Estación Agrícola Experimental de Palmira*, v. 2, p. 20-42, 1949.

HAMMES, W.P.; VOGEL, R.F. The genus *Lactobacillus*. In: WOODS, B.J.B.; HOLZAPFEL, W.H. (Ed). *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Aspen Publishers, Gaithersburg, p. 19-54, 1995.

HAYASHIDA, F.M. Ancient beer and modern brewers: ethnoarchaeological observations of *chicha* production in two regions of the North Coast of Peru. *Journal of Anthropological Archaeology*, v. 27, p. 161-174, 2008.

HEARD, G.M., FLEET, G.H. Yeasts-growth during fermentation. In: Fleet, G.H. (Ed.). *Wine Microbiology and Biotechnology*. Australia: Harwood Academic Press, pp. 27–54, 1993.

HOFFMAN, C.S.; WINSTON, F. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, v. 57, p. 267-272, 1987.

HUGENHOLTZ, J. Traditional biotechnology for new foods and beverages. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, p. 155-159, 2013.

JAMES, S.A.; CARVAJAL B., E.J.; BOND, C.J.; CROSS, K.; NÚÑEZ, N.C.; PORTERO, P.B.; ROBERTS, I.N. *Candida carvajalis* sp. nov., an ascomycetous yeast species from the Ecuadorian Amazon jungle. *FEMS Yeast Research*, v.9 p.784-788, 2009.

JENNINGS, J. La chichera e el patrón: chicha and the energetics of feasting in the prehistoric Andes. *Archaeological Papers of the American Anthropological Association*, v. 14, p. 241-259, 2005.

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

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. 5 ed. Amsterdam: Elsevier. 2011.

LACHANCE, M-A.; BOWLES, J.M.; STARMER, W.T.; BARKER, J.S.F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from

Australian *Hibiscus* flowers. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p. 172-177, 1999.

LAGO, C.; LANDONI, M.; CASSANI, E.; DORIA, E.; NIELSEN, E.; PILU, R. Study and characterization of a novel functional food: purple popcorn. *Molecular Breeding*, v.31, p. 575-585, 2013.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. New York: Wiley, 1991. p. 115-175.

LAPPE-OLIVERAS, P.; MORENO-TERRAZAS, R.; ARRIZÓN-GAVIÑO, J.; HERRERA-SUÁREZ, T.; GARCÍA-MENDOZA, A.; GSCHAEDLER-MATHIS, A. Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled *Agave* beverages. *FEMS Yeast Research*, v. 8, p. 1037-1052, 2008.

LIECKFELDT E.; MEYER, W.; BÖNER, T. Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA and PCR fingerprinting. *Journal of Basic Microbiology*, v. 33, p. 413-426, 1993.

LÓPEZ-ARBOLEDA, W.A.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; MAMBUSCAY-MENA, L.A.; OSORIO-CADAVID, E. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, v.XII, p. 176-186, 2010.

LURTON, L., SNAKKERS, G.; ROULLAND, C.; GALY, B. Influence of the fermentation yeast strain on the composition of wine spirits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 67, p. 485-491, 1995.

MCKAY, L.; BALDWIN, K.A. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, v.87, p. 3-14, 1990.

MILLER, C. Fruit production of the *Ungurahua* palm (*Oenocarpus bataua* subsp. *bataua*, Arecaceae) in an indigenous managed reserve. *Economy Botany*, v.56, p. 165-176, 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORONI, A. V.; ARENDT, E.K.; DAL BELLO, F. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiology*, v. 28, p. 497-502, 2011.

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

NYAKO, K.O.; DANSO, K.O. Role of added yeast in the acceptability of naturally fermented corn dough. In: WESTBY, A.; REILLY, P.J.A (Ed.). *Proc. Regional Workshop Traditional African Foods: Quality and Nutrition*. International Foundation for Science, Stockholm, 1991.

ORLOVE, B; SCHMIDT, E. Swallowing their pride: indigenous and industrial beer in Peru and Bolivia. *Theory and Society*, v.24, p. 271-298, 1995.

OSAWA, R; FUJISAWA, T.; SLY, L.I. *Streptococcus gallolyticus* sp.nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Systematic and Applied Microbiology*, v.18, p. 74-78, 1995.

OSORIO-CADAVID, E.; CHAVES-LÓPEZ, C.; TOFALO, R.; PAPARELLA, A. SUZZI, G. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiology*, v. 25, p. 771-777, 2008.

OYEWOLE, O.B. Lactic fermented foods in Africa and their benefits. *Food Control*, v. 8, p. 289-297, 1997.

PRETORIUS, I.S.; VAN DER WESTHUIZEN, T.J.; AUGUSTYN, O.P.H. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. *South African Journal of Enology and Viticulture*, v. 20, p. 61-74, 1999.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMÓN, D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, v. 21, p. 315-323, 1994.

QUEROL, A.; BARRIO, E.; RAMON, D.A. A comparative study of different methods of yeast strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 15, p. 439-446, 1992.

RAMOS, C.L.; ALMEIDA, E.G.; FREIRE, A.L.; SCHWAN, R.F. Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian amerindians. *Food Microbiology*, v.28, p. 1380-1386, 2011.

RAMOS, C.L.; ALMEIDA, E.G.; PEREIRA, G.V.M.; RAMOS, P.G.; DIAS, E.S.; SCHWAN, R.F. Determination of dynamic characteristics of microbiota in a fermented beverage produced by Brazilian Amerindians using culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, v. 140, p. 225-231, 2010.

RHEE, S.J.; LEE, J-E.; LEE, C-H. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories*, v. 10, p. 1-13, 2011.

RODRÍGUEZ, H.; CURIEL, J.A.; LANDETE, J.M.; RIVAS, B.; FELIPE, F.L.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; MANCHEÑO, J.M.; MUÑOZ, R. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v. 132, p. 79-90, 2009.

ROMANO, P.; CAPECE, A.; JESPERSEN, L. Taxonomic and ecological diversity of food and beverages yeasts. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. (Ed.). *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer-Verlag, p. 13-53, 2006.

ROSS, R.P.; MORGAN, S.; HILL, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, v. 79, p. 3-16, 2002.

SAINZ, T.; WACHER, C.; ESPINOZA, J.; CENTURIÓN, D.; NAVARRO, A.; MOLINA, J.; INZUNZA, A.; CRAVIOTO, A.; ESLAVA, C. Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, v. 71, p. 169-176, 2001.

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

SCANES, K.T.; HOHMANN, S.; PRIORI, B.A. Glycerol production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and its relevance to wine: a review. *South African Society for Enology and Viticulture*, v. 19, p. 17-24, 1998.

SCHWARZ, M.; HILLEBRAND, S.; HABBEN, S.; DEGENHARDT, A.; WINTERHALTER, P. Application of high-speed countercurrent chromatography to the large-scale isolation of anthocyanins. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, p. 179-189, 2003.

SEFA-DEDEH, S.; SANNI, A.I.; TETTEH, G.; SAKYI-DAWSON, E. Yeasts in the traditional brewing of 'pito' in Ghana. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 15, p. 593-597, 1999.

SHRESTHA, H.; NAND, K.; RATI, E.R. Microbiological profile of murcha starters and physico-chemical characteristics of poko, a rice based traditional fermented food product of Nepal. *Food Biotechnology*, v. 16, p. 1-15, 2002.

SONI, S.K.; SANDHU, D.K. Indian fermented foods: microbiological and biochemical aspects. *Indian Journal of Microbiology*, v. 30, p.135-157, 1990.

SORIANO, S. Estudio del proceso de fermentación de la Chicha. *Revista del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene*, v. 8, p. 231-322, 1938.

STEINKRAUS, K. *Handbook of indigenous fermented foods*. 1996.

STEINKRAUS, K.H. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*, v. 8, p. 311-317, 1997.

STRATFORD, M. Food and beverage spoilage yeasts. In: QUEROL, A.; FLEET, G. H. (Ed). *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer-Verlag, p. 335-379, 2006.

TENIOLA, O.D.; ODUNFA, S.A. The effects of processing methods on the level of lysine, methionine and the general acceptability of *ogi* processed using starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, v. 63, p. 1-9, 2001.

VALLEJO, J.A.; MIRANDA, P.; FLORES-FÉLIX, J.D.; SÁNCHEZ-JUANES, F.; AGEITOS, J.M.; GONZÁLEZ-BUITRAGO, J.M.; VELÁZQUEZ, E.; VILLA, T.G. Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Systematic and Applied Microbiology*, v.36, p. 560-564, 2013.

VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D.; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W.; RAINEY, F.A.; SCHLEIFER, K-H.; WHITMAN, W.B. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer, 2009. 1476 p.

WIRTH, F.; GOLDANI, L. Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, v. 2012, p.1-8, 2012.

APÊNDICE A. Lista de verificações aplicada durante as coletas das *chichas*.

QUESTIONÁRIO CHICHA

dia coleta:

Amostra:

1) Ingredientes:

2) Tempo de fermentação:

3) Como se produz (fervura, filtragem, adição de ingredientes):

4) Local de coleta: