

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL  
CAMPUS LARANJEIRAS DO SUL - PR  
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**LUAN GABRIEL TECHI DINIZ**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA VEGANA COM KEFIR DE  
ÁGUA**

**LARANJEIRAS DO SUL  
2023**

**LUAN GABRIEL TECHI DINIZ**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA VEGANA COM KEFIR DE  
ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Engenharia de  
Alimentos da Universidade Federal da  
Fronteira Sul (UFFS), como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Larissa Canhadas Bertan

**LARANJEIRAS DO SUL**

**2023**

## **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Diniz, Luan Gabriel Techí  
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA VEGANA COM KEFIR  
DE ÁGUA / Luan Gabriel Techí Diniz. -- 2023.  
44 f.:il.

Orientadora: Doutora Larissa Canhadas Bertan

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Engenharia de Alimentos, Laranjeiras do  
Sul, PR, 2023.

1. Tremoço, extrato vegetal, vegano e plant based..  
I. Bertan, Larissa Canhadas, orient. II. Universidade  
Federal da Fronteira Sul. III. Título.


**LUAN GABRIEL TECHI DINIZ**

**DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA VEGANA COM KEFIR  
DE ÁGUA**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de  
Engenharia de Alimentos da  
Universidade Federal da Fronteira  
Sul (UFFS), como requisito para  
obtenção do título de Bacharel em  
Engenharia de Alimentos


Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 05/12/2023.

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
 **LARISSA CANHADAS BERTAN**  
Data: 21/03/2024 20:03:58-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Canhadas Bertan – UFFS**  
**Orientadora**

Documento assinado digitalmente  
 **EDUARDA MOLARDI BAINY**  
Data: 25/03/2024 15:34:54-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eduarda Molardi Bainy – UFFS**  
**Avaliador**

Documento assinado digitalmente  
 **ERNESTO QUAST**  
Data: 26/03/2024 10:12:08-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Prof. Dr. Ernesto Quast – UFFS**  
**Avaliador**

Dedico este trabalho aos meus pais, que não pouparam esforços para que eu pudesse concluir meus estudos sempre no apoio para a conclusão do curso.

A minha namorada Gessica que sempre esteve comigo nos melhores e piores momentos que passamos dentro e fora da Universidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por proporcionar momentos que pudesse aperfeiçoar a minha trajetória profissional a partir dessa Universidade.

A minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Larissa Canhadas Bertan, por acreditar em mim, desde o início da minha caminhada na Universidade, há praticamente 5 anos, obrigado pela paciência e ensinamentos dentro e fora da faculdade.

Ao Prof. Luciano Tormen, com a ajuda nas análises de projetos de iniciação científica desde o início também na trajetória acadêmica, preocupação com a realização deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Cátia Tavares dos Passos por sugestões, análises tanto microbiológicas quanto sensoriais já realizadas juntos desde o início da caminhada.

As minhas colegas de laboratório que passaram a trabalhar comigo, Eliane Pompeu, Jaine Paré, Gessica Andrade, Flávia, Ana Camila, Yara Prock e ao colega Jefferson que trabalhamos juntos, pela paciência, colaboração, amizade e por todo o auxílio, principalmente nas análises.

A todos os professores da graduação, aos técnicos, servidores e funcionários e ao Curso de Engenharia de Alimentos pela ajuda mútua e convívio, que me auxiliaram no crescimento e amadurecimento.

À Universidade Federal da Fronteira Sul por todo o aprendizado e pelas experiências vividas.

À Fundação Araucária pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa.

## RESUMO

Novas necessidades alimentares estão surgindo devido a diversos fatores, sendo eles biológicos, culturais, ideológicos e/ou por mera preferência. Dentro dessas necessidades, atualmente, se enquadra o público vegetariano, vegano e/ou que apresentam alguma restrição fisiológica ao consumo do leite. Logo, tais aspectos fazem com que aumentem a necessidade de desenvolvimento de novos produtos e/ou que ocorra uma diversificação dos ingredientes utilizados em produtos já consolidados no mercado. O tremoço é uma leguminosa que apresenta concentração elevada de proteína, ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, fibra alimentar, açúcares e vitaminas do complexo B. Com isso, pode ser considerada uma matéria-prima promissora para ser utilizada no desenvolvimento de produtos para o público supracitado. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi elaborar e caracterizar uma bebida fermentada vegana a partir de grãos de kefir de água. O projeto foi desenvolvido em cinco etapas, sendo elas: (i) retirada do alcaloide presente no tremoço, (ii) elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço (EVHT), (iii) ativação da cultura de kefir, (iv) elaboração da bebida fermentada e (v) caracterização centesimal da semente de tremoço (não tratada e tratada), do extrato base, do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço e da bebida fermentada. O tratamento utilizando 0,5% de ácido tartárico com trocas de água a cada 30 minutos e fervura por tempo superior a 4 horas foi eficiente para retirada do alcaloide, porém foi necessário um tratamento adicional com carbonato de cálcio para retirar o sabor ácido da semente de tremoço. A melhor proporção para elaboração do EVHT foi de 1:10 (m/m) (semente de tremoço tratada e água). A utilização de bicarbonato de sódio na ativação dos grãos de kefir não provocou diferença no crescimento dos microrganismos. O processo fermentativo promoveu um crescimento de grãos de kefir de 27,46 g/100 g, um rendimento de 96,08 g/100 g, sólidos solúveis de 8,53° Brix, concentração de ácido láctico de 1,36 g/100 mL, concentração de etanol de 0,20 g/100 mL e concentração de dióxido de carbono de 2,49 %. A fermentação do EVHT provocou redução nos teores de proteínas, lipídeos e carboidratos. Assim, foi possível observar que a utilização de EVHT como substrato para a produção de bebida fermentada com cultura de kefir de água foi uma alternativa viável para atendimento de um nicho específico de mercado. Palavras-chave: Tremoço, extrato vegetal, vegano e *plant based*.

## ABSTRACT

New dietary needs are arising due to various factors, whether biological, cultural, ideological, and/or mere preference. Among these needs, the vegetarian, vegan, and/or those with physiological restrictions on milk consumption are currently included. Consequently, these aspects increase the need for the development of new products and/or the diversification of ingredients used in already established market products. Lupin is a legume that has a high concentration of protein, unsaturated and polyunsaturated fatty acids, dietary fiber, sugars, and B-complex vitamins. Therefore, it can be considered a promising raw material for use in developing products for the aforementioned audience. In light of the above, the aim of this study was to create and characterize a vegan fermented beverage using water kefir grains. The project was developed in five stages, namely: (i) removal of the alkaloid present in lupin, (ii) preparation of the water-soluble lupin vegetable extract (EVHT), (iii) activation of the kefir culture, (iv) preparation of the fermented beverage, and (v) centesimal characterization of lupin seeds (untreated and treated), the base extract, the water-soluble lupin vegetable extract, and the fermented beverage. The treatment using 0.5% tartaric acid with water changes every 30 minutes and boiling for more than 4 hours was effective in removing the alkaloid. However, an additional treatment with calcium carbonate was necessary to remove the acidic taste of the lupin seeds. The best ratio for preparing the EVHT was 1:10 (m/m) (treated lupin seeds and water). The use of sodium bicarbonate in activating kefir grains did not cause a difference in the growth of microorganisms. The fermentation process resulted in kefir grain growth of 27.46 g/100 g, a yield of 96.08 g/100 g, soluble solids of 8.53° Brix, lactic acid concentration of 1.36 g/100 mL, ethanol concentration of 0.20 g/100 mL, and carbon dioxide concentration of 2.49%. Fermentation of EVHT led to a reduction in protein, lipid, and carbohydrate content. Thus, it was observed that the use of EVHT as a substrate for producing fermented beverages with water kefir culture was a viable alternative to meet a specific market niche.

Keywords: Lupine, plant extract, vegan and plant based.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1.** Fluxograma de retirada dos alcaloides e neutralização da acidez dos grãos de tremoço.

**Figura 2.** Fluxograma das etapas do processo de extração dos alcaloides.

**Figura 3.** Processo de extração dos alcaloides das sementes de tremoço (a) Trituração, (b) Adição de 20 ml de  $H_2SO_4$  a 1%, (c) fervura, (d) Alcalinizando com  $NH_4OH$  diluído até pH básico, (e) acréscimo de 20 ml de  $CHCl_3$  em balão de separação, (f) fração adicionada em cápsula de porcelana, (g) evaporação em banho maria, (h) cápsulas previamente preparadas 5 ml de  $H_2SO_4$  a 1%, (f) Adição dos reativos de Dragendorff, Bouchardat (Wagner) e Meyer

**Figura 4.** Resultado dos testes da presença de alcaloides na (a) amostra controle (b) amostra tratada com ácido tartárico.

**Figura 5.** Extrato vegetal hidrossolúvel proporção 1:10

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Contagem de bactérias ácido acéticas (BAA), de bactérias ácido lácticas (BAL) e de leveduras (LEV) no kefir de água, com e sem adição de bicarbonato, durante 12 dias de fermentação. Os resultados estão expressos em  $\log_{10}$  UFC/mL.

**Tabela 2.** Caracterização físico-química do extrato vegetal hidrossolúvel fermentado

**Tabela 3.** Resultados das análises centesimais dos grãos de tremoço (não tratado e tratado para retirada dos alcaloides), a formulação controle (apenas com grãos de tremoço e água), a formulação escolhida no planejamento (não fermentada e fermentada).

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
EVHT	Extrato Vegetal Hidrossolúvel de Tremoço
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 MERCADO VEGANO	16
2.2 Bebidas Fermentadas com Kefir	17
2.3 Tremoço	18
<b>3 Objetivos</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos	19
<b>4 METODOLOGIA</b>	<b>20</b>
4.1 Retirada, extração e identificação da presença de alcaloides nos grãos de tremoço	20
4.1.1 Tratamento para retirada dos alcaloides dos grãos de tremoço	20
4.1.2 Extração dos alcaloides dos grãos de tremoço tratados	21
4.1.3 Identificação dos alcaloides	23
4.2 Testes de ativação das culturas de kefir em meio utilizando ou não bicarbonato de sódio	24
4.2.1 Análise de Contagem de microrganismos	24
4.3 Elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço	25
4.4 Elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço fermentado (EVHT)	25
4.4.1 Análise físico-químicas do EVHT fermentado	26
4.4.1.1 Determinação do PH	26
4.4.1.2 Crescimento celular dos grãos de kefir no EVHT	26
4.4.1.3 Rendimento da bebida fermentada de kefir no EVHT	26
4.4.1.4 Determinação de sólidos solúveis	26
4.4.1.5 Determinação de ácido láctico por acidez titulavel	27
4.4.1.6 Análise de etanol	27
4.4.1.7 Determinação de CO <sub>2</sub>	27
4.5 Caracterização centesimal dos grãos de tremoço (não tratado e tratados). extrato BASE (grãos de tremoço e água), extrato otimizado (não fermentado e fermentado)	27
<b>5 Resultados e discussão</b>	<b>29</b>
5.1 Testes de retirada dos alcaloides	29
5.2 Estudo da viabilidade do inóculo desidratado e da influência do meio de cultura na ativação do kefir de água	30
5.2.1 Análise de contagem de microrganismos	31
5.3 Elaboração de extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço	33
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>38</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O veganismo é definido como uma cultura e estilo de vida que visa retirar as formas de utilização e abuso de animais, das comidas, produtos e roupas de seu cotidiano. Além disso, essa sociedade propõe o desenvolvimento de outras maneiras para suprir tais necessidades e desejos, que sejam independentes do uso de animais (THE VEGAN SOCIETY, 2019). Aliado a esse perfil de consumidor, existem os flexitarianos, que buscam reduzir o consumo de carne de sua alimentação, assim como, os que possuem alguma restrição fisiológica. A alergia à proteína do leite de vaca e/ou a intolerância à lactose é um grande problema também para consumidores de produtos lácteos, e em virtude disso, precisam adequar sua alimentação (BOUKID, 2021; FERREIRA e REZENDE, 2023). Logo, pesquisas que enfoquem o uso de matérias primas alternativas, como o uso de proteínas de origem vegetal para o desenvolvimento de novos produtos, podem ser interessantes tanto para o meio acadêmico como para a indústria alimentícia.

Quando se fala em novos produtos, os extratos vegetais vêm se destacando no mercado, como substituto a produtos convencionalmente produzidos com leite (DIAS et al, 2020). Adicionalmente, a Research and Markets (2017) relatou que as vendas de extrato vegetais hidrossolúveis à base de vegetais no mercado varejista dos EUA estimaram aproximadamente 6 bilhões de dólares em 2017, com estimativa de 28 bilhões de dólares para 2021. Um exemplo, foi o aumento nas vendas globais entre 2017 a 2018 de 71% para extrato vegetal hidrossolúvel de aveia, 10% de amêndoas/nozes e 16% de coco (WOOD, 2019; AYDAR et al., 2020).

De acordo com Ballco e Gracia (2020), a indústria alimentícia vem se aprimorando em pesquisas e tecnologias que abrangem o desenvolvimento de novos produtos, ingredientes e métodos de produção que atendam a este nicho de consumidores. Desta forma, pesquisas com matérias-primas à base de vegetais em produtos tradicionais já consolidados no mercado estão sendo realizadas, tais como elaboração sorvete à base de extrato vegetal hidrossolúvel de castanhas (DINIZ et al, 2022), bebida fermentada à base leite de coco (ALVES et al., 2021), elaboração de sobremesa cremosa sabor cacau (SANCHES et al., 2021), entre outros. Assim, os extratos hidrossolúveis vegetais são uma alternativa interessante de opção não láctea no desenvolvimento de produtos alimentícios veganos (ALVES et al., 2021).

A bebida fermentada é um alimento que faz parte da dieta brasileira tanto por sua praticidade, como também, por seu apelo saudável. Contudo, é excluída do cardápio de pessoas veganas e/ou que possuem alguma patologia por, habitualmente, ser oriundo do leite de animais (vaca, cabra, etc). Assim, torna-se fundamental realizar estudos que possibilitem a criação de uma forma substitutiva a esse produto. Nesse sentido, as bebidas fermentadas veganas surgem como opção promissora (MORETTI, 2009). Especialmente, o kefir de água tem despertado grande interesse de pessoas interessadas em consumir adptos a dietas vegetais e veganas ou pessoas alérgicas às proteínas do leite ou intolerantes à lactose (MORRETI et al., 2020). A indústria de alimentos tem investido em pesquisas e tecnologias com o objetivo de viabilizar a utilização de outras matérias-primas para criar produtos diversificados que atendam a demanda de consumidores veganos, alérgicos ao leite e à soja, como a utilização de extratos vegetais hidrossolúveis alternativos (RUBY, 2012; VÄKEVÄINEN et al., 2020).

O tremoço amarelo (*Lupinus luteus*) é uma espécie do gênero *Lupinus* pertencente à classe *Genisteeae* e à família *Leguminosae* e é utilizado na alimentação humana em virtude de sua composição. A elevada concentração de proteína, ácidos graxos insaturados e poliinsaturados, fibra alimentar, açúcares e vitaminas do complexo B, fazem desta leguminosa, uma alternativa excelente de alimento, podendo ser utilizada como matéria-prima no desenvolvimento de produtos (ERBAS, CERTEL, USLU, 2005). Em contrapartida, algumas variedades podem conter uma quantidade significativa de alcaloides quinolizidina, que causam amargor e toxicidade quando em altas concentrações (GREEN et al., 2013), sendo necessário sua retirada para viabilizar sua utilização. Logo, após sua retirada, sua utilização como um ingrediente alimentar vem aumentando proporcionalmente à conscientização por parte dos consumidores de seus benefícios à saúde humana (HUYGHE, 1997).

Frente ao exposto, o presente trabalho visou utilizar o extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço para o desenvolvimento de uma bebida fermentada para o público vegetariano, vegano e/ou para pessoas que apresentem restrição ao consumo de leite.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MERCADO VEGANO

Nos últimos anos, observou-se uma redução no consumo de produtos de origem animal. Entre um dos motivos é o aumento dos preços da carne nos últimos anos, que tem sido um fator motivador para as pessoas procurarem alternativas à base de vegetais (GRAÇA; GODINHO e TRUNINGER 2019). Além das considerações econômicas, a busca por opções vegetais, que teve um aumento em 2019, foi impulsionada por preocupações que vão desde o bem-estar animal até questões de segurança alimentar, especialmente acentuadas pela pandemia de Covid-19. Adicionalmente, diante desse contexto pandêmico, os consumidores começaram a reavaliar suas escolhas alimentares, buscando maneiras de aprimorar a alimentação e fortalecer a imunidade (EUROMONITOR, 2020).

Além dos aspectos abordados sobre a carne, alternativas ao leite de vaca têm sido buscadas principalmente em virtude de fatores fisiológicos como alergias às proteínas do leite ( $\alpha$ -lactoalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina e caseína) e/ou intolerância à lactose (SHARMA et al., 2001; VANGA e RAGHAVAN, 2017). Os principais sintomas resultantes da alergia as proteínas do leite podem ser náuseas, vômitos, dores abdominais e diarreias, podendo desencadear perda de peso e desnutrição, decorrente também da má absorção intestinal ou perda de energia e nutrientes decorrentes dos vômitos (GASPARIN; TELES e ARAÚJO, 2010). Já a lactose, é um dissacarídeo que, quando entra em contato com a enzima lactase, se hidrolisa em uma molécula de galactose e outra de glicose, para a partir daí então ser sintetizada e absorvida pelo organismo. Atualmente, diversas pessoas possuem a incapacidade de digerir quantidades significativas de lactose devido a um problema genético de deficiência de produção da enzima lactase pelo organismo, que provoca sintomas de intolerância à lactose (MATTAR e MAZO, 2010). Os principais sintomas desta intolerância são dores abdominais e inchaço, flatos excessivos e diarreia após a ingestão de alimentos que contêm lactose (SWAGERTY; WALLING e KLEIN, 2002). Assim, a forma mais efetiva de tratamento para indivíduos que apresentam tais patologias é a exclusão do leite e derivados na dieta como a forma mais adequada de tratamento (CORTEZ et al, 2007).

Segundo a Sociedade Vegetariana Brasileira (SVB) (2022) existem atualmente mais de 2.900 produtos de aproximadamente 160 marcas diferentes certificados com

o Selo Vegano. Além disso, mais de 3.523 estabelecimentos oferecem pelo menos uma opção vegana em seus cardápios. Nos supermercados brasileiros, já é possível encontrar versões veganas de produtos tradicionalmente à base de carne e/ou laticínios, como nuggets, linguiças, sorvetes, requeijões e entre outros. Essas versões vegetarianas e veganas atendem às demandas específicas de um grupo de consumidores que antes não eram adequadamente contemplados, demonstrando a compreensão de um nicho de mercado.

## 2.2 BEBIDAS FERMENTADAS COM KEFIR

O kefir de água, é uma bebida fermentada resultante do processo de fermentação dos grãos de kefir em uma solução aquosa de sacarose (FELS et al., 2018). Apresenta uma notável versatilidade de cultivo, uma vez que os grãos podem se desenvolver em vários substratos, incluindo sucos de frutas e vegetais, mel e extratos hidrossolúveis de vegetais. A utilização desses substratos alternativos como meio de cultivo pode enriquecer o valor nutricional da bebida fermentada e introduzir novos sabores e aromas (ALVES et al., 2021).

As bebidas provenientes do kefir têm sua origem nas regiões do Cáucaso, e é consumida em vários países como os Estados Unidos, México e Canadá. Segundo Prado et al. (2015) há uma ampla gama de bebidas fermentadas de kefir disponível no comércio, entre elas o tradicional, zero lactose e opções veganas (à base de frutas e vegetais).

A fermentação dos grãos ocorre em temperaturas que variam de 20 a 30 °C, em condições anaeróbicas, ao longo de 24 a 96 horas, até atingir um pH aproximado de 4,6. Esse processo resulta em uma bebida fermentada ligeiramente adocicada, ácida e efervescente, com um aroma frutado característico (ALVES et al., 2021). Durante a fermentação, são produzidos ácido láctico, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), etanol, ácido acético, ácido glucônico e diversos outros compostos (LAUREYS e De VUYST, 2014). Logo, tais compostos conferem características desejáveis para bebida final, como textura e consistência ligeiramente espessa, sabor levemente ácido e efervescente e aroma frutado (FIORDA et al., 2017).



### 2.3 TREMOÇO

O tremço é uma espécie do gênero *Lupinus* pertencente à classe *Genisteeae* e à família *Leguminosae* e é tradicionalmente utilizado na alimentação humana em virtude de sua composição. Sua utilização como ingrediente alimentar vem aumentando proporcionalmente à conscientização por parte dos consumidores de seus benefícios à saúde humana (HUYGHE, 1997; STARKUTE et al., 2016). A elevada concentração de proteína, ácidos graxos insaturados e poli-insaturados, fibra alimentar, açúcares, vitaminas do complexo B e componentes antioxidantes fazem desta leguminosa um excelente alimento, podendo ser utilizada como matéria-prima no desenvolvimento de produtos alimentícios (ERBAS, CERTEL, USLU, 2005; CARVAJAL-LARENAS et al., 2016). Conforme relatado na literatura, as sementes de lupino podem apresentar teores de umidade entre 6,2% e 9,9%; carboidratos entre 26,1% e 34,2%; fibra entre 6,2% e 11,9%; óleo entre 13,0% e 24,6%; cinzas entre 2,4% e 5,2%; e proteína entre 32,0% e 52,6% (ZAMORA et al., 2020).

As características nutricionais da semente de tremço podem contribuir para a redução de riscos de obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares em humanos. Em contrapartida, algumas variedades podem conter uma quantidade significativa de alcaloides quinolizidina, que causam amargor e toxicidade quando em altas concentrações (GREEN et al., 2013). Então, surge a necessidade de estudos que otimizem a retirada desse componente antes do processamento do tremço, como utilizando soluções básicas e até mesmo fluídos supercríticos (BOTARO; BORSATO; BATISTUTI, 2011; CARVAJAL-LARENAS et al., 2013; ROSAS-QUINA; MEJÍA-NOVA, 2021).

Quando buscamos alternativas semelhantes aos produtos fermentados de origem animal quanto ao teor de proteína, os extratos vegetais de soja mostram-se como a alternativa mais consumida, principalmente na Europa Oriental. Porém, apresentam características sensoriais próprias e que por vezes podem causar estranheza ao consumidor. Neste caso, podemos destacar o tremço como uma opção promissora. Uma cultura comum principalmente na Europa e Austrália, possui teor de proteína correspondente à soja, porém, com menos compostos antinutricionais e gordura (CANON et al., 2022).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

- Elaborar e caracterizar uma bebida fermentada vegana à base de extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar a metodologia mais eficaz de retirada de alcaloides da semente de tremoço;
- Estudar a melhor forma de ativar a cultura de kefir de água com ou sem bicarbonato de sódio adicionado no meio;
- Estudar a melhor forma de obtenção do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço (EVHT), variando as proporções de semente de tremoço e água;
- Elaborar uma bebida fermentada a partir do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço (EVHT);
- Determinar a composição centesimal da semente de tremoço (não tratada e tartada), bebida base, extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço e bebida fermentada com kefir de água.

## 4 METODOLOGIA

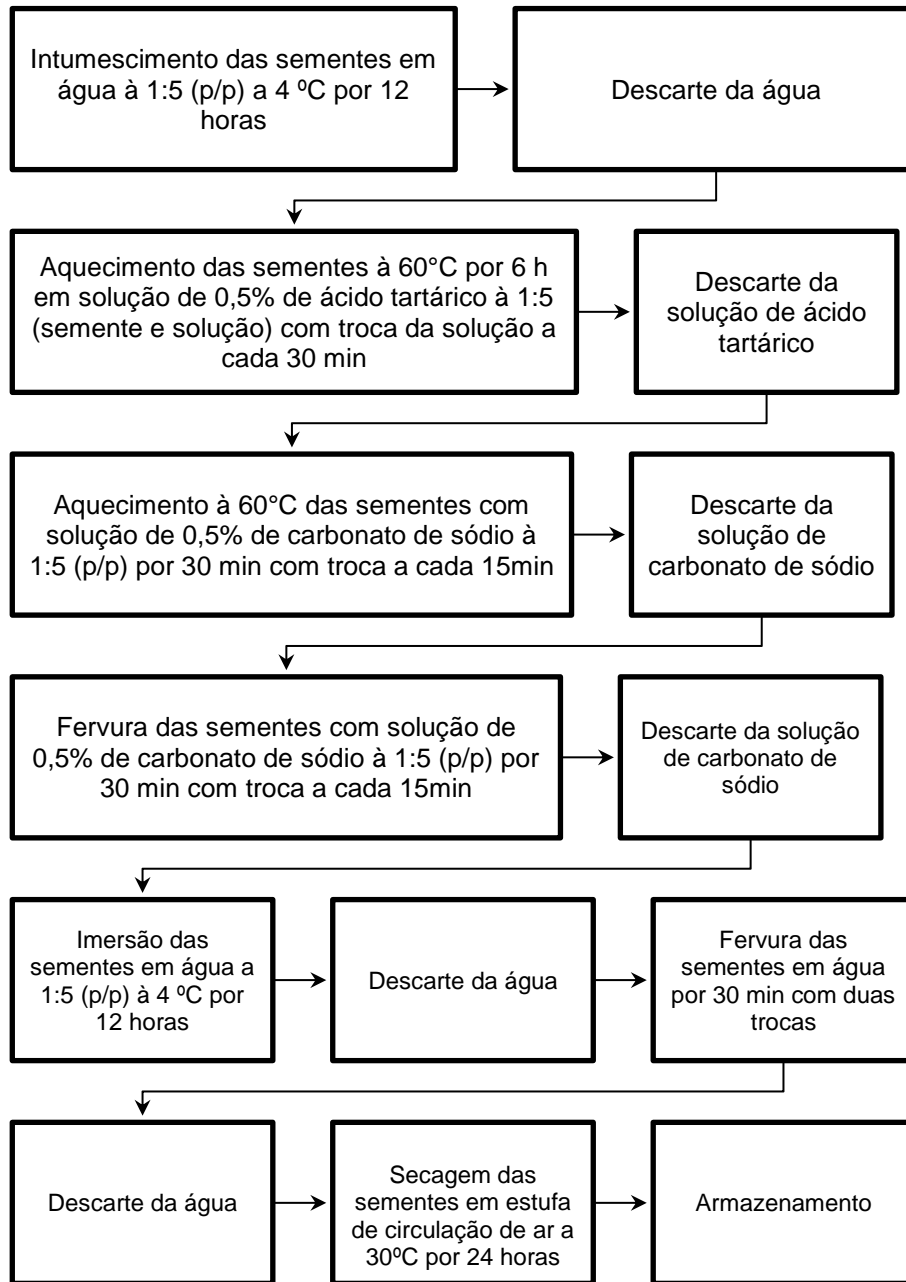
### 4.1 RETIRADA, EXTRAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DE ALCALOIDES NOS GRÃOS DE TREMOÇO

#### 4.1.1 TRATAMENTO PARA RETIRADA DOS ALCALOIDES DOS GRÃOS DE TREMOÇO

Os tratamentos para retirada dos alcaloides das sementes de tremoço (Figura 1) seguiu a metodologia descrita por Tessitore (2008) com adaptações.

Inicialmente, 40 g das sementes de tremoço foram intumescidos em água na proporção de 1:5 (m/m) (semente: água) a 4 °C por 12 horas. Em seguida, a água foi descartada e as sementes foram aquecidas à 60°C em solução de ácido tartárico 0,5% durante 6 horas na proporção 1:5 (m/m) (semente: solução de ácido tartárico), sendo que, a cada 30 minutos foi realizada a troca desta solução. Após, as sementes foram aquecidas ainda na mesma proporção e temperatura em uma solução de carbonato de sódio 0,5% durante 30 minutos, com duas trocas desta solução, sendo posteriormente, submetidos à fervura durante 30 minutos com a mesma solução, com duas trocas da solução. Em seguida, as sementes foram imersas em água na proporção de 1:5 (m/m) (semente: água) à 4 °C por 12 horas. Após, a água foi descartada, e as sementes foram novamente imersas em água e fervidos 2 duas vezes por 30 minutos. Após os tratamentos, foram secas em estufa a 30°C por 24 horas e armazenadas em frascos de vidros à temperatura ambiente até o momento de sua utilização.

**Figura 1.** Fluxograma de retirada dos alcaloides e neutralização da acidez dos grãos de tremoço.

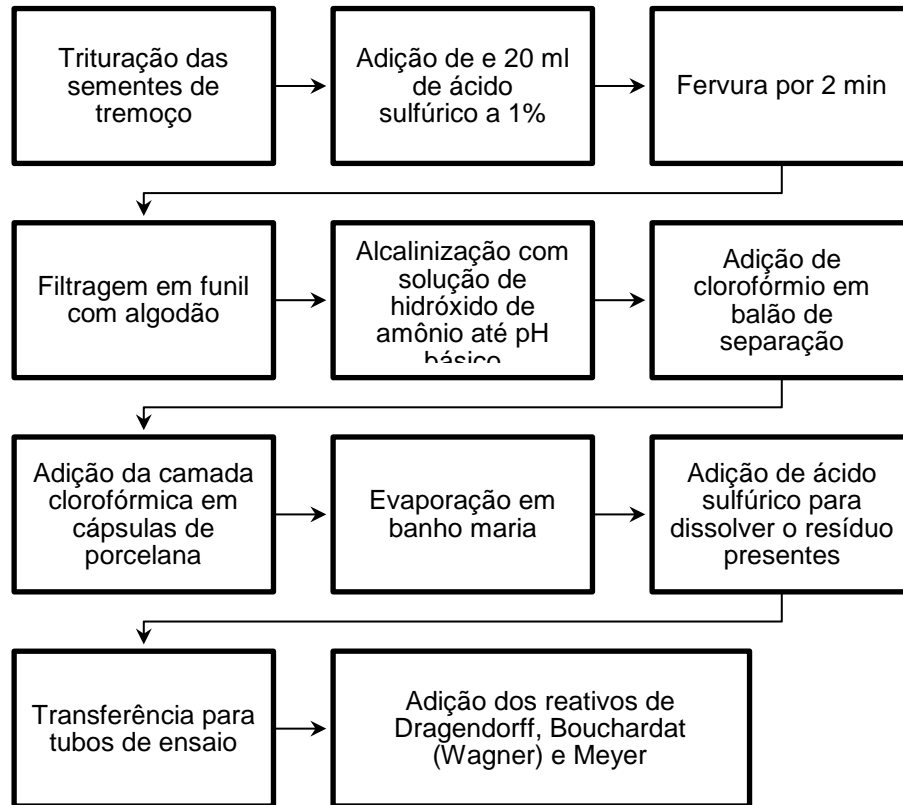


Fonte: O autor.

#### 4.1.2 EXTRAÇÃO DOS ALCALOIDES DOS GRÃOS DE TREMOÇO TRATADOS

A extração dos alcaloides das sementes de tremoço seguiu a metodologia proposta por Simões et al. (2017), com adaptações (Figura 2).

**Figura 2.** Fluxograma das etapas do processo de extração dos alcaloides.



Fonte: O autor

Inicialmente foram adicionados em um béquer 2g da amostra de tremoço (sementes não tratadas e tratadas) previamente fragmentadas (Figura 3a) e 20 ml de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) a 1% (Figura 3b) e ferveu-se por aproximadamente por 2 minutos (Figura 3c). Em seguida, esta solução foi filtrada utilizando funil com algodão, resfriada e alcalinizada com solução de hidróxido de amônio ( $NH_4OH$ ) até atingir pH básico (Figura 3d). Posteriormente, 20 mL desta solução alcalina será adicionada em funil de separação (Figura 3e) juntamente com 20 mL de clorofórmio ( $CHCl_3$ ), onde foram extraídos cuidadosamente através da separação de fases (Figura 3f). A camada clorofórmica foi adicionada em duas cápsulas de porcelana e foi evaporado o solvente em banho maria até secura (Figura 3g). Em sequência, foi acrescentado a uma das cápsulas previamente preparadas 5 ml de  $H_2SO_4$  a 1% para dissolver o resíduo presentes na alíquota, distribuído em tubos de ensaio para posterior análise.

**Figura 3.** Processo de extração dos alcaloides das sementes de tremoço (a) Trituração, (b) Adição de 20 ml de  $H_2SO_4$  a 1%, (c) fervura, (d) Alcalinizando com  $NH_4OH$  diluído até pH básico, (e) acréscimo de 20 ml de  $CHCl_3$  em balão de separação, (f) fração adicionada em cápsula de porcelana, (g) evaporação em banho

maria, (h) cápsulas previamente preparadas 5 ml de  $H_2SO_4$  a 1%, (f) Adição dos reativos de Dragendorff, Bouchardat (Wagner) e Meyer



(a)



(b)



(c)



(d)



(e)



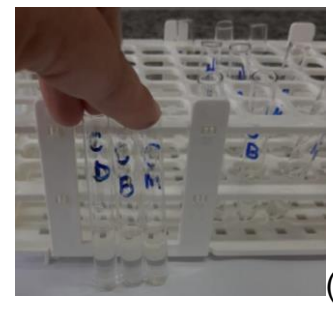
(f)



(g)



(h)



(f)

Fonte: O autor

#### 4.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES

Para comprovar a presença de alcaloides seguiu-se a metodologia descrita por Simões et al. (2017), com adaptações. As amostras distribuídas em tubos na etapa anterior foram adicionadas de 2 gotas dos reagentes de Dragendorff (D), Bouchardat (Wagner) (B) e Meyer (M). Em paralelo, foi preparado uma amostra controle (branco), onde havia apenas reagentes sem a presença de amostra. Os tubos contendo amostra foram comparados com o branco. Foi considerado positivo (tem alcaloide presente) aqueles que apresentaram formação de complexos insolúveis de coloração

laranja avermelhado para o reativo de Bouchardat, vermelho tijolo para Dragendorff e branco para Mayer. Como forma de comparação foi realizado o teste na amostra de grão de tremoço in natura (não tratada).

#### 4.2 TESTES DE ATIVAÇÃO DAS CULTURAS DE KEFIR EM MEIO UTILIZANDO OU NÃO BICARBONATO DE SÓDIO

Para verificar as melhores condições de desenvolvimento dos grãos de Kefir, para elaboração de bebida fermentada, foi realizado um teste com a utilização ou não de bicarbonato de sódio no meio de desenvolvimento (mosto).

Inicialmente preparou-se dois mostos em erlenmeyers de 500 mL, os quais foram elaborados com 500 ml de água fervida e 25 gramas de açúcar mascavo, sendo um deles adicionado de bicarbonato de sódio (1,3 g) e outro não. Após o meio atingir a temperatura ambiente e foi adicionado os grãos de kefir (10 %). Os frascos foram tampados e incubados a 25 °C por 72 h. Ao final do tempo, os meios fermentados foram filtrados e foi realizada a contagem dos microrganismos.

##### 4.2.1 ANÁLISE DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

As contagens microbianas em placas foram conduzidas utilizando o Agar MRS, pH 5,5, para bactérias ácido lácticas (BAL). Para contagem de leveduras foi utilizado o ágar extrato de levedura glicose cloranfenicol (YEGC), e para bactérias ácido acéticas (BAC) o ágar carbonato de cálcio.

Para a contagem, primeiramente foi realizada uma diluição seriada, utilizando 25 mL da bebida (mosto fermentado), homogeneizada em 225 mL de água peptonada 0,1%, em Stomacher por 2 min, a 231 rpm realizando diluição (1:10) até  $10^{-8}$  com o mesmo meio de diluição.

Após foi realizada a contagem de BAL pela técnica de plaqueamento em profundidade, em ágar MRS, pH 5,5, incubando as placas em estufa bacteriológica a 35 °C por  $48 \pm 3$  h (NJONGMETA et al., 2015). A contagem das leveduras foi realizada em ágar glicose cloranfenicol, usando a técnica de espalhamento em superfície, incubando as placas a 25 °C por 72 h, de acordo com o método APHA 21:2015 (RYU; WOLF-HALL, 2015). A contagem das bactérias ácido acéticas foi realizada por plaqueamento em superfície no GYC: 10% de glicose, 1,0% extrato de levedura, 2,0% em CaCO<sub>3</sub> e 1,5% em ágar (GULLO et al., 2006) e incubadas a 30 °C por 72 h. A diluição escolhida para a contagem foi a que apresentava 25 e 250 colônias, sendo

realizada a visualização morfológica de 5 colônias de cada contagem a fim de confirmar os resultados encontrados por coloração de Gram e visualização microscópica.

#### 4.3 ELABORAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE TREMOÇO

A elaboração do extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço (EVHT) seguiu a metodologia descrita por Botaro, Borsato e Batistuti (2011), com algumas modificações. Cerca de 100 g das sementes previamente tratadas para a remoção dos alcaloides foram homogeneizados com auxílio de 500 mL de água, em uma jarra específica para elaboração de extrato vegetais (*Vegan Milk Machine*) com trituração, agitação (30.000 rpm) e aquecimento (80 °C) por 26 minutos. Posteriormente, o EVHT foi submetido a um processo de filtração por duas vezes com auxílio de peneiras domésticas para eliminação dos resíduos. Em seguida foi pasteurizado a  $95 \pm 2$  °C por 3 minutos, e envasado em frasco de vidro higienizado e esterilizado e armazenado em geladeira.

#### 4.4 ELABORAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE TREMOÇO FERMENTADO (EVHT)

Inicialmente, durante 7 dias os grãos de kefir foram acondicionados em solução aquosa (água filtrada) de sacarose (açúcar mascavo) com concentrações de sólidos solúveis de aproximadamente 5 °Brix e temperatura de  $25 \pm 1$  °C em estufa de circulação de ar, com troca contínua dos nutrientes (solução de sacarose) a cada 24 horas.

Após decorridos os 7 dias, 5% (m/m) da cultura de kefir foram inoculados no EVHT (item 4.2), previamente adicionado de 6% de sacarose, 3% de inulina e 0,08% de goma xantana e incubado a  $25 \pm 1$  °C por um período de 22 horas, sendo então analisados.

##### 4.4.1 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICAS DO EVHT FERMENTADO

###### 4.4.1.1 DETERMINAÇÃO DO PH

A determinação do pH foi feita através de potenciômetro digital (ZENEBOM, PASCUET, TIGLEA, 2008).



#### 4.4.1.2 CRESCIMENTO CELULAR DOS GRÃOS DE KEFIR NO EVHT

O crescimento celular dos grãos de kefir ( $\Delta m$ ) fermentado no EVHT foi determinado pela metodologia de Nogueira et al. (2016). A determinação foi por meio da Equação 1, em que as massas de grãos de kefir (g) foram pesadas no início ( $m_{k0}$ ) e após a fermentação ( $m_{kf}$ ).

$$\square\square\left(\frac{\square}{100\square}\right) = \frac{(\square\square\square - \square\square\square 0)}{\square\square 0} \cdot 100 \quad \text{Equação 1}$$

#### 4.4.1.3 RENDIMENTO DA BEBIDA FERMENTADA DE KEFIR NO EVHT

O rendimento (R) foi determinado pela metodologia de Nogueira et al. (2016), através da Equação 2, em que  $m_{s0}$  corresponde a massa inicial e  $m_{sf}$  a massa final da bebida fermentada

$$\square\left(\frac{\square}{100\square}\right) = \frac{\square\square\square}{\square\square 0} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

#### 4.4.1.4 DETERMINAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS

Os teores de sólidos solúveis (SS) foram verificados em triplicata, em refratômetro digital portátil, com duas a três gotas do filtrado da amostra e os resultados foram expressos em °Brix (ZENEBOM, PASCUET, TIGLEA, 2008).

#### 4.4.1.5 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO POR ACIDEZ TITULÁVEL

Para determinar a produção de ácido láctico no EVHQ fermentado foi utilizado o método de acidez titulável pelo método titulométrico da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012).

#### 4.4.1.6 ANÁLISE DE ETANOL

A produção de etanol originada da fermentação alcoólica foi calculada em quantidades estequiométricas (SOARES et al., 2011).

#### 4.4.1.7 DETERMINAÇÃO DE CO<sub>2</sub>

O dióxido de carbono (g/100 mL) foi determinado através da metodologia de (MALDONADO et al., 2020).

### 4.5 CARACTERIZAÇÃO CENTESIMAL DOS GRÃOS DE TREMOÇO (NÃO TRATADO E TRATADOS). EXTRATO BASE (GRÃOS DE TREMOÇO E ÁGUA), EXTRATO OTIMIZADO (NÃO FERMENTADO E FERMENTADO)

A caracterização de todas as amostras seguiu as seguintes metodologias do

Instituto Adolf Lutz (ZENEBO, PASCUET, TIGLEA, 2008) com suas respectivas análises: umidade segundo a metodologia n. 012/IV, cinzas de acordo com a metodologia n. 018/IV, lipídios totais pelo método de Soxhlet segundo a metodologia n. 321/IV, proteína bruta pelo método Kjeldahl, de acordo com a metodologia n. 036/IV. Já a determinação de carboidratos totais será calculada pelo método de diferença, através da equação 1:

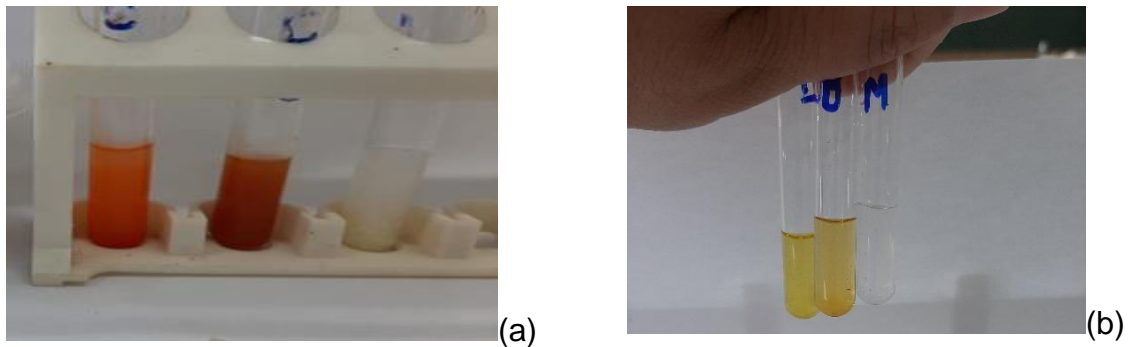
$$\text{g/100g carboidratos} = 100 - (\text{umidade} + \text{lipídios} + \text{proteína bruta} + \text{cinzas}) \quad (1)$$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TESTES DE RETIRADA DOS ALCALOIDES

O tratamento com ácido tartárico foi eficiente na retirada dos alcaloides, apresentando resultado negativo (não há a presença de alcaloides) para os 3 reagentes testados (Dragendorff, Bouchardat e Meye). (figura 4b). Já o teste com a semente controle (sem tratamento) (Figura 4a) apresentou resultado positivo (há presença de alcaloide), o que pode ser evidenciado pela presença de precipitado nos 3 tubos.

**Figura 4.** Resultado dos testes da presença de alcaloides na (a) amostra controle (b) amostra tratada com ácido tartárico.



\* Foi considerado positivo (tem alcaloide presente) aqueles que apresentaram formação de complexos insolúveis de coloração laranja avermelhado para o reativo de Bouchardat, vermelho tijolo para Dragendorff e branco para Mayer.

Uma das substâncias anti-nutricionais encontradas nas sementes do tremoço são vários alcaloides do grupo quinolizidina, os quais promovem amargor e sabor desagradável (MICHAEL, 2008, TORRES et al, 2002 e GARCIA-LÓPEZ et al, 2001). Em virtude disso, existem vários métodos para reduzir tais fatores, e viabilizar sua utilização. Os alcaloides em sua maioria são solúveis em água, logo, uma certa quantidade presente no grão de tremoço pode ser eliminada e/ou reduzida. Além da água, a associação de tratamento químico com térmico, pode ser uma alternativa (HADDAD et al, 2006; JIMÉNEZ- MARTÍNEZ et al, 2000; RAHMA e RAO, 1984). No presente trabalho a associação do tratamento químico e térmico se mostrou eficiente

na eliminação dos alcaloides. Tal fato pode ser comprovado tanto pelo teste com os e reagentes, como também pelo sabor (não apresentou amargor).

Tessitore (2008) desenvolveu diferentes formulações de extrato aquoso solúvel de tremoço, sendo que para sua elaboração, a autora utilizou tratamentos distintos (ácido tartárico, bicarbonato de sódio e água destilada) para a redução do conteúdo de alcaloides presentes nas sementes, de modo a tornar o extrato desenvolvido mais aceitável. Na análise sensorial, verificou preferência pela formulação cujas sementes passaram pelo tratamento térmico com água destilada. Já as amostras que receberam tratamento com  $\text{NaHCO}_3$  0,1% e ácido tartárico 0,5% apresentaram uma menor aceitação.

A utilização de ácido tartárico apesar de ter sido eficiente para retirar os alcaloides, resultou em um sabor ácido nas sementes de tremoço. Tal fato foi comprovado ao elaborar o EVHT com as sementes de tremoço sem o tratamento com carbonato de cálcio posterior ao ácido tartárico. O EVHT elaborado com as sementes tratadas apenas com ácido tartárico apresentou um pH de 4,06, o qual era inviável para elaborar uma bebida fermentada a qual teria que ter um pH de 4,5. Assim, foi feito o tratamento com carbonato de cálcio e posteriormente com água para retirar esse sabor ácido das sementes. Após esse tratamento adicional, o EVHT apresentou um pH de 6,82. O carbonato é uma alternativa enológica para reduzir a acidez do vinho através de um processo denominado desacidificação química, que neutraliza o excesso de acidez e precipita o sal formado (tartarato de cálcio) (USSEGLIO-TOMASSET, 1995).

## 5.2 ESTUDO DA VIABILIDADE DO INÓCULO DESIDRATADO E DA INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTURA NA ATIVAÇÃO DO KEFIR DE ÁGUA

Em sites comerciais que vendem grãos de kefir existe modos diferentes para sua ativação, sendo que alguns recomendam o uso de bicarbonato de sódio e outros não. Assim, para verificar a eficiência da utilização do bicarbonato, foi realizado um teste.

### 5.3 5.2.1 ANÁLISE DE CONTAGEM DE MICRORGANISMOS

A Tabela 1 exhibe os resultados da contagem dos microrganismos ao longo do processo de fermentação.

**Tabela 1.** Contagem de bactérias ácido acéticas (BAA), de bactérias ácido lácticas (BAL) e de leveduras (LEV) no kefir de água, com e sem adição de bicarbonato, durante 12 dias de fermentação. Os resultados estão expressos em  $\log_{10}$  UFC/mL.

Tempo (dias)	Com bicarbonato			Sem bicarbonato		
	BAA	BAL	LEV	BAA	BAL	LEV
0	$\leq 1^{d,A}$	$\leq 1^{a,A}$	$\leq 1^{b,A}$	$\leq 1^{d,A}$	$\leq 1^{a,A}$	$\leq 1^{d,A}$
3	6,7 <sup>a,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	$\leq 1^{b,A}$	6,3 <sup>a,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	5,6 <sup>a,B</sup>
6	10,8 <sup>b,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	3,8 <sup>a,A</sup>	10,8 <sup>b,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	6,2 <sup>a,b,B</sup>
9	7,6 <sup>a,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	4,9 <sup>a,A</sup>	6,8 <sup>a,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	6,4 <sup>b,c,B</sup>
12	6,7 <sup>a,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	5,2 <sup>a,A</sup>	6,2 <sup>a,A</sup>	$\leq 1^{a,A}$	6,4 <sup>b,c,B</sup>

\* Sendo: BAA – bactérias ácido acéticas, BAL – bactérias ácido lácticas e LEV – Leveduras. \*\* Letras minúsculas diferentes na mesma coluna significa que as médias foram consideradas significativamente diferentes pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha, significam que as médias das contagens, do mesmo microrganismo, foram significativamente diferentes entre si ( $p < 0,05$ ) pelo teste t. Fonte: Os autores.

No início do experimento (tempo zero), não foi registrada contagem para nenhum dos microrganismos estudados. Isso pode ser atribuído à liofilização da cultura, onde os microrganismos precisavam se recuperar de possíveis danos fisiológicos causados pelo processo de armazenamento. A liofilização, amplamente utilizada para conservação a longo prazo, pode resultar em injúrias ou danos celulares, incluindo alterações na permeabilidade da membrana celular. Essas condições podem ter impedido o desenvolvimento dos microrganismos no meio durante as condições de ensaio. Ao considerar os métodos de conservação, os microrganismos podem estar presentes em uma amostra em três estados:

inviabilizados (com injúria letal e impossibilidade de multiplicação), com injúria subletal (apesar de danos em suas estruturas celulares, capazes de multiplicação sob condições favoráveis) e viáveis. Os métodos de manutenção dos microrganismos são classificados com base no tempo máximo de preservação. Isso inclui métodos de curto prazo (repique contínuo), médio prazo (preservação em óleo mineral, preservação em água esterilizada, congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) e longo prazo (liofilização, criopreservação) (SOLA et al., 2012).

Após 3 dias de fermentação, foi observada a contagem de BAA e LEV. No caso de BAA, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os períodos de fermentação ( $p > 0,05$ ). Isso sugere que o crescimento dessas bactérias não foi aparentemente influenciado pela adição de bicarbonato de sódio durante o período de adaptação do inóculo. No entanto, para as LEV, foi observada uma diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ), indicando médias superiores de crescimento no meio sem adição de bicarbonato. Isso sugere que a presença de bicarbonato inibe parcialmente o crescimento desse microrganismo.

Quanto ao desenvolvimento dos microrganismos ao longo do tempo, foi observada uma contagem máxima estatisticamente diferente dos demais dias ( $p < 0,05$ ) para as BAA no 6º dia, em ambos os meios testados. No caso das LEV, não foi registrada contagem até o 6º dia de fermentação. Após esse período, observou-se um aumento na contagem, mantendo-se estável até o 12º dia no meio com adição de bicarbonato. No meio sem bicarbonato, o crescimento foi notado a partir do 3º dia, mantendo uma contagem estatisticamente similar ( $p > 0,05$ ) até o 6º dia, com um aumento subsequente na contagem. A partir do 6º dia, os tempos de 9 e 12 dias apresentaram médias estatisticamente superiores ( $p > 0,05$ ) em comparação ao 3º dia. Esses resultados indicam que o tempo de fermentação desejável para ativar o inóculo, nas condições testadas, é de 6 dias, e a adição de bicarbonato não é necessária, pois reduz a contagem de leveduras no meio.

Não foi registrada contagem de BAL no meio, possivelmente devido à técnica utilizada para a conservação do inóculo. Oliveira (2005) conduziu um experimento analisando microbiologicamente kefir (caldo e grãos) e kefir liofilizado. A contagem média de *Lactobacillus* em caldo e suspensão de kefir cultivados em meio de Rogosa foi de  $8,5 \times 10^5$  UFG/g e  $4,5 \times 10^4$  UFG/g para grãos e suspensão, respectivamente. Houve uma tentativa de contagem para o kefir liofilizado, mas não ocorreu

crescimento de colônias no meio. Isso sugere que os *Lactobacillus* podem ter perdido a viabilidade devido ao procedimento de liofilização utilizado ou à capacidade biossintética de algumas enzimas importantes para o crescimento. Diversos fatores, como a origem dos grãos e, principalmente, o manuseio, podem influenciar na microbiota do kefir.

#### 5.4 ELABORAÇÃO DE EXTRATO VEGETAL HIDROSSOLÚVEL DE TREMOÇO

Inicialmente foram realizados os pré-testes para verificar a melhor proporção (m/m) (semente de tremoço/água) para a elaboração do EVHT.

As primeiras proporções estudadas - 1:1, 1:2 e 1:4 (m/m) - não se mostraram eficientes, pois não foi possível fazer a filtragem do EVHT pela consistência muito pastosa. Em virtude disso, outras proporções foram estudadas (1:6, 1:8 e 1:10 m/m). Ao aumentar a proporção foi possível observar uma redução da viscosidade. As proporções de 1:6 e 1:8 (m/m) apesar de apresentar uma viscosidade mais parecida com os extratos comerciais, ao serem provadas pelo grupo de pesquisa foi possível observar um sabor muito marcante da semente de tremoço, a qual é relativamente amarga. Já a proporção 1:10 m/m (figura 5) além de apresentar uma viscosidade desejada, o sabor da semente de tremoço ficou mais suave, e por consequência foi a escolhida para dar continuidade ao trabalho.

**Figura 5.** Extrato vegetal hidrossolúvel proporção 1:10



Fonte: O autor

#### 5.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EXTRATO HIDROSSOLÚVEL FERMENTADO

Para elaborar a bebida fermentada a base de EVHT foi adicionado de 6% de sacarose, 3% de inulina, 0,08% de goma xantana e 5% de cultura de kefir. Após 12 horas, o pH do EVHT fermentado chegou a 4,48. Segundo Otles e Cagindi (2003), o pH final da fermentação do kefir normalmente se encontra na faixa de 4,2 a 4,6. Wang et al. (2021) comentam que a queda de pH ao longo da fermentação, é em virtude da fermentação láctica, na qual parte dos açúcares fermentescíveis são convertidos em ácido láctico e CO<sub>2</sub>.

O crescimento dos grãos de kefir após as 12 horas de fermentação foi de 27,46%, enquanto o rendimento foi de 96,08%. Esses parâmetros são inversamente proporcionais, afinal, quanto maior o crescimento celular dos grãos, maior a demanda de consumo de substrato, o que impacta diretamente o rendimento das bebidas (NOGUEIRA et al., 2016).

Tabela 2. Caracterização físico-química do extrato vegetal hidrossolúvel fermentado

Parâmetros	Valores*
pH	4,48 ± 0,01
Crescimento dos grãos de kefir (g/100g)	27,46 ± 2,67
Rendimento (g/100g)	96,08 ± 0,31
Sólidos solúveis	8,53 ± 0,25
Ácido láctico (g/100mL)	1,36 ± 0,09
Etanol (g/L)	0,20 ± 0,12
CO <sub>2</sub> (g/100 mL)	2,49 ± 0,29



\*Resultados expressos com média  $\pm$  desvio padrão.

Nogueira et al. (2016) realizou análises de sólidos solúveis no início e ao final da fermentação de seus extratos fermentados. Os autores obtiveram resultados de 10 °Brix no início e 5,10 °Brix ao final da fermentação. Ao comparar os extratos produzidos por Nogueira et al. (2016), com os extratos fermentados produzidos nesse trabalho obtiveram um brix final de 8,53 °Brix. Essa diferença se deu pela adição de sacarose, inulina e goma xantana em comparação que os extratos de Nogueira et al. (2016) não foram adicionados. A produção de CO<sub>2</sub> está associada à atividade das leveduras presentes na cultura de kefir. Ao longo do processo de fermentação, os açúcares fermentáveis sofrem transformações, convertendo-se em álcool etílico e CO<sub>2</sub>. Como resultado desse fenômeno, observa-se uma redução no teor de açúcar das bebidas após a fermentação.

A legislação determina que a porcentagem de etanol nas bebidas fermentadas de kefir estejam entre 0,5 e 1,5 % m/v e a quantidade de ácido láctico de 1% (BRASIL, 2007), porém para o kefir de água ainda não há especificações regulamentadas por lei. Ao comparar os resultados obtidos no presente estudo com a referida legislação é possível observar que para etanol a concentração obtida (0,2%) foi inferior a legislação. Para a produção de ácido láctico a formulação obteve resultados de 1,36%. Da Silva e Okura (2021) produziu manjar de coco com ameixa fermentada de kefir, e após o final da fermentação obteve um valor de 1,18% de ácido láctico.

Na Tabela 3 é possível observar a caracterização as sementes de tremoço (não tratado e tratado), a formulação base (semente de tremoço e água), a formulação com adição de sacarose, inulina e goma xantana (não fermentada e fermentada).

**Tabela 3.** Resultados das análises centesimais das sementes de tremoço (não tratado e tratado), a formulação controle (apenas com grãos de tremoço e água), a formulação escolhida no planejamento (não fermentada e fermentada).

Componentes	Grãos de tremoço não tratados	Grãos de tremoço tratados	EVHT base	EVHTNF	EVHTF
Umidade %	10,9 $\pm$ 0,21	78,2 $\pm$ 0,60	98,1 $\pm$ 0,06	90,1 $\pm$ 0,02	90,3 $\pm$ 0,03

Cinzas %	2,65 ± 0,04	0,71 ± 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Proteínas %	30,15 ± 0,69	9,28 ± 0,20	0,86 ± 0,02	0,78 ± 0,01	0,70 ± 0,03
Lipídios %	9,13 ± 0,14	2,44 ± 0,10	0,36 ± 0,01	0,39 ± 0,06	0,36 ± 0,04
Carboidratos %	47,17 ± 0,26	9,37 ± 0,20	0,68 ± 0,00	8,73 ± 0,00	8,64 ± 0,00

\* EVHT: extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço; EVHTNF: extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço não fermentado; EVHTF: extrato vegetal hidrossolúvel de tremoço fermentado

O tratamento das sementes de tremoço com ácido tartárico e carbonato de sódio provocaram uma redução nos teores de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos e um aumento nos teores de umidade, quando comparado com os grãos não tratados. O tratamento com ácido tartárico para a remoção de alcaloides presentes nas sementes de tremoço pode ter promovido impacto nos teores de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos, uma vez que os alcaloides são compostos orgânicos que podem estar associados a esses componentes. O carbonato de cálcio foi utilizado para ajustar o pH do extrato. Essa mudança no pH pode ter influenciado a solubilidade e a disponibilidade de certos componentes, afetando os teores de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos. E no caso do aumento nos teores de umidade pode estar relacionado aos tratamentos inerentes ao processo para remover alcaloides, que se utiliza de água.

O EVHT elaborado apenas com o tremoço e água apresentou uma umidade (98,1%) maior que os EVHT adicionados de sacarose, inulina e goma xantana, seja não fermentado (90,1%) como fermentado (90,3). A sacarose, inulina e goma xantana são conhecidas por suas propriedades higroscópicas, o que significa que têm a capacidade de atrair e reter água. A adição desses ingredientes ao EVHT pode ter contribuído para a retenção de mais água, resultando em um produto final com menor teor de umidade. Costa e Santos (2020) cita em seu estudo valores bem próximos aos

encontrados para a umidade de alguns extratos vegetais, como o extrato de Quirera de arroz (95,11).

O teor de cinzas foi maior para os grãos de tremoço não tratados (2,65%), seguido dos grãos de tremoço tratados (0,71%) e os 3 EVHT que apresentaram os mesmos valores (< 0,02%).

As sementes de tremoço não tratados apresentaram um teor de proteína de 30,15% em sua composição, resultado próximo ao determinado por Ruiz-Lopez et al. (2019), que obtiveram um teor de proteína para sementes de tremoço branco (*Lupinus albus*) em 36,30%. A adição de água para elaboração dos EVHT provocou uma redução no teor de proteína quando comparados com as sementes. Bicudo et al (2012) analisou extrato vegetal de quinoa e obteve valores de proteína em torno de 3,15%, essa diferença também se dá pela matéria prima utilizada na produção onde a quinoa se dá com um percentual maior de proteínas em seu grão.

Os valores de lipídeos dos 3 EVHT (~0,37%) foram inferiores aos obtidos por Costa e Santos (2020) que obtiveram 1,05% em extrato de soja e 0,59% para o extrato arroz, essa diferença se deu pela matéria prima ser diferente.

Os carboidratos variaram de 47,17 (grãos de tremoço não tratados) a 0,68% (EVHT base). Os valores dos EVHT não fermentado (8,73%) e fermentado (8,64%), foram superiores aos obtidos por Costa e Santos (2020) obtiveram valores de carboidrato de 6,45% para extrato de castanha de caju e 10,53% para o de castanha de baru.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi a utilização das sementes de tremçoço após tratamento utilizando 0,5% de ácido tartárico com trocas de água a cada 30 minutos e fervura por tempo superior a 4 horas foi eficiente para retirada do alcaloide, porém foi necessário um tratamento adicional com carbonato de cálcio para retirar o sabor ácido da semente de tremçoço.

Já a fermentação promoveu um crescimento de grãos de kefir de 27,46 g/100 g, um rendimento de 96,08 g/100 g, sólidos solúveis de 8,53° Brix, concentração de ácido láctico de 1,36 g/100 mL, concentração de etanol de 0,20 g/100 mL e concentração de dióxido de carbono de 2,49 %. A fermentação do EVHT provocou redução nos teores de proteínas, lipídeos e carboidratos.

Assim, foi possível observar que a utilização de EVHT como substrato para a produção de bebida fermentada com cultura de kefir de água foi uma alternativa viável para atendimento de um nicho específico dos veganos e vegetarianos..

## REFERÊNCIAS

- ALVES, V et al. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. **Lwt**, v. 145, p. 111364, 2021.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemistry. **Official methods of analysis**.(19thed). Gaithersburg, MD: AOAC International. (2012).
- AYDAR, E. F., TUTUNCU, S., OZCELIK, B. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. **Journal of Functional Foods**, v. 70, 2020.
- BALLCO, P., GRACIA, A. An extended approach combining sensory and real choice experiments to examine new product attributes. **Food Quality and Preference**, v. 80, n. 4, 103830, 2020.
- BICUDO, P. O. M. et al. Elaboração e caracterização de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa com polpa de frutas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, [S.l.], v. 30, n. 1, aug. 2012. ISSN 19839774. Available at: <<https://revistas.ufpr.br/alimentos/article/view/28468/18876>> doi:<http://dx.doi.org/10.5380/cep.v30i1.28468>.
- BOTARO. J A.; BORSATO. D; BATISTUTI. J. P. Formulação de extrato aquoso de tremoço branco (*Lupinus Albus* L.) adicionado de suco de pitanga utilizando metodologia de superfície de resposta. **Alimentos e Nutrição** (UNESP. Marília). v. 22. n. 1. p. 155-163. 2011.
- BOUKID, F. Plant-based meat analogues: From niche to mainstream. **European Food Research and Technology**, v. 247, 297-308. 14 out. 2020.
- BRASIL. Resolução nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União**, p. 4, 23 out. 2007.

BRASIL. Resolução nº 46, de 23 de outubro de 2007. **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Diário Oficial da União, p. 4, 23 out. 2007.

CANON, F. et al. Mixed dairy and plant-based yogurt alternatives: Improving their physical and sensorial properties through formulation and lactic acid bacteria cocultures. **Current Research in Food Science**, v. 5, p. 665-676, 2022.

CARVAJAL-LARENAS, F. et al. Modelling of the aqueous debittering process of *Lupinus mutabilis* sweet. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 507-516, 2013.

CORTEZ, A. P. B. et al. Conhecimento de pediatras e nutricionistas sobre o tratamento da alergia ao leite de vaca no lactente. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 25, n. 2, p. 104-105, 2007.

COSTA, I. da P.; SANTOS, N. S. T. dos. Bebidas fermentadas com kefir a partir de extratos vegetais. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia-ISSN: 1984-5693**, v. 12, 2020.

DIAS, G M; OLIVIERI, C M R.; MARTINS, M C T. Bebidas vegetais alternativas ao leite: comparação nutricional com leite de vaca. **Life Style**. v. 7, n. 1, p. 15-25, 2020.

DINIZ, L. G. T. et al. Mixed water-soluble nut-based plant extracts to produce vegan ice creams. Research, **Society and Development**, v. 11, p. e39011729892, 2022.

ERBAS, M.; CERTEL, M.; USLU, M. K. Some chemical properties of white lupin seeds (*Lupinus Albus L.*) **Food Chemistry**, v. 89, n. 3, p. 341-345, 2005.

Euromonitor. (2020). Coronavirus Accelerates Shift Towards Plant-Based Food. Disponível em: <<https://www.euromonitor.com/article/coronavirus-accelerates-shift-towards-plant-based-food>>. Acesso em: 14 de novembro de 2023.

FELS, L.; JAKOB, F.; VOGEL, R. F.; WEFERS, D. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. **Carbohydrate Polymers**, v.189, p.296-303, 2018.

FERREIRA, A C; REZENDE, D C. Os Desafios e as Tendências Para os Negócios Vegetarianos e Veganos na Percepção dos Profissionais do Ramo. **Revista Interdisciplinar de Marketing**, v. 13, n. 2, p. 99-117, 2023.

FIORDA, F. A. et al. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and Kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 8, p. 732-742, 2016.

GARCIA-LÓPEZ, P. M. et al. Chemical composition and fatty acid profile of several Mexican wild lupins. **Journal of food composition and analysis**, v. 14, n. 6, p. 645-651, 2001.

GASPARIN, F. S. R.; TELES, J. M.; ARAÚJO, S. D. C. Alergia à proteína do leite de vaca versus intolerância à lactose: as diferenças e semelhanças. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 1, p. 107-114, 2010.

GREEN, B. T. et al. Plant toxins that affect nicotinic acetylcholine receptors: a review. **Chemical research in toxicology**, v. 26, n. 8, p. 1129-1138, 2013.

GRAÇA, J; GODINHO, C A.; TRUNINGER, M. Reducing meat consumption and following plant-based diets: Current evidence and future directions to inform integrated transitions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 91, p. 380-390, 2019.

GULLO, M.; CAGGIA, C.; DE VERO, L.; GIUDICI, P. Characterization of acetic acid bacteria in “traditional balsamic vinegar”. **International Journal of Food Microbiology**, v. 106, n. 2, p. 209–212, fev. 2006.

HADDAD, J.; MÚZQUIZ, M; ALLAF, K. Treatment of lupin seed using the instantaneous controlled pressure drop technology to reduce alkaloid content. **Food science and technology international**, v. 12, n. 5, p. 365-370, 2006.

HUYGHE, C. White lupin (*Lupinus albus* L.). **Field Crops Res.**, v. 53, n. 1-3, p. 147-160, 1997.

JIMÉNEZ- MARTÍNEZ, C et al. Effect of aqueous and alkaline thermal treatments on chemical composition and oligosaccharide, alkaloid and tannin contents of *Lupinus*

campestris seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 4, p. 421-428, 2001.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Appl Environ Microbiol.** v. 80, p. 2564-2572, 2014

MALDONADO, R et al. Application of soluble fibres in the osmotic dehydration of pineapples and reuse of effluent in a beverage fermented by water kefir. **Lwt**, v. 132, p. 109819, 2020.

MATTAR, R.; MAZO, D. F. de C. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.

MICHAEL, J P. Indolizidine and quinolizidine alkaloids. **Natural product reports**, v. 25, n. 1, p. 139-165, 2008.

MORETTI, B. R. Efeito da suplementação do leite com proteínas de diferentes fontes (soro de leite, soja e colágeno) e da composição da cultura láctica em iogurtes. 2009. 155 f. Dissertação (mestrado) - **Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas**, 2009.

MORETTI, Ana Florencia et al. Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. **Future Foods**, v. 5, p. 100123, 2022.

NJONGMETA, N. A. et al. Acid-Producing Microorganisms. Em: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 5. ed. Washington, D. C.: **American Public Health Association**, 2015. p. 229–236.

NOGUEIRA, L K et al. Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. **Acta Amazônica**, v. 46, p. 417-424, 2016.

OLIVEIRA, T. K. B.; ALMEIDA, F. A. C.; GOMES, J. P.; LIMA, A.R. N.; NETO, I. B. M.; JÚNIOR, P. R. S.; RAMOS, K. R. L. P. Physical chemical composition and bioactive



compounds of aqueous extract of peanuts without skin and enriched with peanut skin. **Brazilian Journal of Food Technology**, [S.l.], v. 24, n.1, p. 1-8, 2021.

OLIVEIRA, R. B. S. **Análise microbiológica do quefir em grãos, suspensão, liofilizado e adicionado à ração de coelhos**. 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Alfenas. 2005.

OTLES, S; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**. Turkey, v.2, n.2, p.54-59, 2003.

PRADO, M.R.; BLANDÓN, L.M.; VANDENBERGHE, L.P.; RODRIGUES, C.; CASTRO, G.R.; THOMAZ **Biological Activities, and Related Product Frontiers in Microbiology**, v.6, p. 1-10, 2015.

RAHMA, E. H.; RAO, MS Narasinga. Effect of debittering treatment on the composition and protein components of lupine seed (*Lupinus termis*) flour. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 1026-1030, 1984.

RESEARCH AND MARKETS. Dairy and dairy alternative beverage trends in the U.S. (4th edn.). Dublin, Ireland: **Research and Markets**, 2017.

ROSAS- QUINA, Y. E.; MEJÍA- NOVA, F. C. Supercritical fluid extraction with cosolvent of alkaloids from *Lupinus mutabilis* Sweet and comparison with conventional method. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, n. 4, p. e13657, 2021.

RUBY, M. B. Vegetarianism. **A blossoming field of study**. **Appetite**, v. 58, n. 1, p. 141-150, 2012.

RUIZ-LÓPEZ, M. A. et al. Nutritional and bioactive compounds in mexican lupin beans species: A mini-review. **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019.

RYU, D.; WOLF-HALL, C. Yeasts and Molds. Em: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 5. ed. Washington, D. C.: **American Public Health Association**, 2015. p. 277–286

SANCHES, F. L. et al. Creamy coconut milk dessert with cocoa flavor: proximate composition, texture profiling, and sensory evaluation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 1, 2021.

SHARMA, S. et al. Structure and function of proteins involved in milk allergies. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 756, p. 183–187, 2001.

SIMÕES. C M O et al; **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed. p. 848, 2017.

SOARES, I. B. et al. Ethanol Production by Enzymatic Hydrolysis of Elephant Grass. **Journal of Life Sciences**, v. 5, p. 157–161, 2011.

SOCIEDADE VEGETARIANA BRASILEIRA. **Pesquisa do IBOPE aponta crescimento histórico no número de vegetarianos no Brasil**, 2018. Disponível em: [svb.org.br](http://svb.org.br)

SOLA, M C; FEISTEL, J C; OLIVEIRA, A P; REZENDE, C S M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1398-1418, jun. 2012

STARKUTE, Vytaute et al. Amino acids profile and antioxidant activity of different *Lupinus angustifolius* seeds after solid state and submerged fermentations. **Journal of food science and technology**, v. 53, n. 12, p. 4141-4148, 2016.

SVB, **Sociedade Vegetariana Brasileira**. (2022). Mercado vegetariano. Disponível em: <<https://svb.org.br/vegetarianismo1/mercado-vegetariano>>. Acesso em: 14 de novembro de 2023

SWAGERTY, D. L; WALLING, A. D.; KLEIN, R.M. **Lactose intolerance**. *American Family physician*, v. 65, p. 1845-1850, 2002.

TAVARES, P P L G et al. Produção de bebida fermentada kefir de quinoa (*Chenopodium quinoa*) saborizada com cacau (*Theobroma cacao*) em pó. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, p. 1-7, 2018.

TESSITORE. M T. Obtenção de extrato aquoso solúvel de tremoço amargo (*Lupinus campestris*). Dissertação (Mestrado) - **Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas**. 64 f. 2008.

TORRES, K B et al. Alkaloid profile of leaves and seeds of *Lupinus hintonii* CP Smith. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n. 3-4, p. 243-247, 2002.

USSEGLIO-TOMASSET, L. **Chimica enológica**. Brescia:AEB, 1995. 431p.

VANGA, S. K., RAGHAVAN, V. How well do plant-based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 10–20, 2017.

VÄKEVÄINEN, K. et al. Potential of quinoa in the development of fermented spoonable vegan products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 120, 2020.

ZAMORA, H D Z et al. Avaliação do potencial de utilização do tremoço andino (*Lupinus mutabilis*) para produção de biodiesel por rota metilica: revisão. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 4, 2020.

ZENEBOM, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.) Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. **Instituto Adolfo Lutz (IAL)**. 4ª ed, 1ª Edição digital São Paulo, 2008.

WANG, Y. et al. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, 12 maio 2021.

WOOD, Z. Plant-based milk the choice for almost 25% of Britons now, **The Guardian**. <https://theguardian.com/food/2019/jul/19/plant-based-milk-the-choicefor-almost-25-of-britons-now>, 2019.