

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE ENGENHARIA

**Desenvolvimento de bebida fermentada  
nutracêutica por *Weissella confusa* utilizando o  
extrato da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel)  
como substrato**

**Ludmila Vilela Rezende**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**DOURADOS/MS**

**Agosto/2018**

**Desenvolvimento de bebida fermentada  
nutracêutica por *Weissella confusa* utilizando o  
extrato da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel)  
como substrato**

**Ludmila Vilela Rezende**

**ORIENTADOR: Dr. Gustavo Graciano Fonseca**

**CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Danielle Marques Vilela**

**Artigo escrito seguindo as normas de  
publicação na revista Journal of Food Science  
and Technology, submetido ao programa de  
pós-graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, como um dos requisitos  
necessários para a obtenção do título de  
mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

**DOURADOS/MS**

**Agosto/2018**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

R467d Rezende, Ludmila Vilela

Desenvolvimento de bebida fermentada nutracêutica por *Weissella confusa* utilizando o extrato da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel) como substrato / Ludmila Vilela Rezende -- Dourados: UFGD, 2018.  
34f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Gustavo Graciano Foseca

Co-orientador: Danielle Marques Vilela

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) -  
Faculdade de Engenharia, Universidade Federal da Grande Dourados.  
Inclui bibliografia

1. EHAB. 2. fermentação. 3. padronização. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADOS – FACULDADE DE ENGENHARIA  
MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

**UFGD**  
Universidade Federal  
da Grande Dourados

### **Termo de Aprovação**

Após a apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a defesa intitulada: Desenvolvimento de bebida fermentada nutracêutica, por *Weissella confusa* utilizando o extrato da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vogel) como substrato, de autoria de Ludmila Vilela Rezende, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Grande Dourados.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele Marques Vilela (Co-Orientadora-UFGD)  
Presidente/Orientador da Banca Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Kelly Cristina da Silva Brabes  
Membro Examinador (UFGD)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maricy Bonfá  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 29 de agosto de 2018

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais todas as minhas conquistas,  
pois é deles que vem o amor e a força que me move.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar saúde e competência para chegar até aqui.

Aos meus pais Vânia e Jamilson e minha irmã Gabriella, por todo amor, apoio e esforço dedicado a mim;

À minha madrinha Adriana, por ter me acolhido e me deixado fazer parte da família e dos dias dela, minha eterna gratidão.

Ao meu namorado Júlio, por todas as palavras de apoio, todos os abraços que me acalmavam, por todo o amor compartilhado, e por ter sido meu ponto de paz durante os dias mais difíceis.

Às minhas amigas de Lavras, Jaqueline e Caroline, por toda amizade e conforto, mesmo distantes. Aos meus amigos de Dourados, Ademir, Cláudia, Gabriella, Gabrielle, Letícia, Rafael, Tim Maia e Monge, por tornarem os meus dias mais leves, e por serem a minha segunda família, vou levar um pedacinho de cada um, por onde eu for.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Fonseca, por aceitar a me orientar neste trabalho e pelos ensinamentos repassados.

À minha co-orientadora Danielle, por todos esses seis anos de ensinamento, cuidado e orientação que me fizeram crescer profissionalmente, e também por todo carinho e amizade, os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao grupo de pesquisa GEFER, por toda ajuda e companheirismo.

À professora Dr<sup>a</sup> Kelly Brabes por ter aceitado, com tanto carinho, a participar da banca de qualificação e de defesa, por todas as sugestões e conselhos, meu muito obrigada.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Faculdade de engenharia, na Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de cursar o mestrado, e a FCBA pela oportunidade de desenvolver o projeto de pesquisa.

1 **Desenvolvimento de bebida fermentada nutracêutica, por *Weissella confusa***  
2 **utilizando o extrato da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vogel) como**  
3 **substrato**

4 Ludmila Vilela Rezende<sup>1</sup>, Danielle Marques Vilela<sup>1</sup>; Gustavo Fonseca<sup>1</sup>

5 <sup>1</sup> Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados,  
6 Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Email: daniellevilela@ufgd.edu.br

7  
8 **RESUMO**

9 Em decorrência de alguns inconvenientes relacionados à ingestão de produtos  
10 lácteos, e o desejo por alternativas vegetarianas, houve uma crescente procura por  
11 produtos nutracêuticos não lácteos obtidos pela fermentação de cereais, frutas e  
12 vegetais. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo elaborar uma bebida  
13 fermentada nutracêutica, utilizando como matéria-prima principal o extrato da  
14 amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel). O extrato hidrossolúvel de amêndoa de  
15 baru (EHAB) desenvolvido nesse estudo foi fermentado e co-fermentado por quatro  
16 diferentes isolados: bactéria láctica (*Weissella confusa* CHICHANR113258.1), as  
17 cepas probióticas comerciais (*Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*), e  
18 levedura (*Rhodotorula mucilaginosa* CHICHAKJ183057.1), em ensaios a 37°C por  
19 24h, e sob refrigeração por mais 24h a 4°C. Durante as fermentações foram  
20 analisados parâmetros como pH, acidez titulável, contagem populacional e valores  
21 nutricionais. Todos os isolados testados foram capazes de acidificar o EHAB com  
22 18h de fermentação em valores de pH próximos à 4,0. Nas co-fermentações a  
23 acidificação do EHAB ocorreram com apenas 6h de fermentação. Após os ensaios  
24 de fermentação e co-fermentação, duas formulações da bebida foram  
25 desenvolvidas com a bactéria *Weissella confusa* (CHICHA NR113258.1), e  
26 submetidas à análise sensorial pelo teste de aceitabilidade e avaliadas quanto a  
27 qualidade higiênico-sanitária, através da contagem de coliformes termo-tolerantes,  
28 apresentando alta aceitabilidade e condições adequadas de segurança alimentar e  
29 de consumo. Este estudo, portanto, possibilitou o conhecimento do processo  
30 fermentativo do EHAB por quatro diferentes micro-organismos, bem como, a  
31 padronização do processo de produção de uma bebida fermentada, utilizando uma  
32 bactéria láctica (*Weissella confusa* CHICHANR113258.1), isolada de uma bebida  
33 indígena da região. O produto final resultou em uma bebida fermentada  
34 nutracêutica, com características nutricionais e sensoriais adequadas, que  
35 possibilitará um possível efeito benéfico sob a microbiota intestinal do consumidor,  
36 e conseqüentemente, melhorar a absorção de nutrientes e prevenir algumas  
37 doenças, como por exemplo, o câncer de intestino grosso, que pode ter seu risco  
38 diminuído pelas fibras, além de ajudar no controle do colesterol e do diabetes.  
39 Como também, uma alternativa para pessoas com intolerância á lactose e para o  
40 mercado que vem buscando por produtos alternativos.

41 **Palavras chave:** EHAB, fermentação, padronização

43

44 **Abstract**

45 As a result of some inconveniences related to the ingestion of dairy products, and  
46 the desire for vegetarian alternatives, there was a growing demand for non-dairy  
47 nutraceuticals obtained by the fermentation of cereals, fruits and vegetables.  
48 Therefore, the present study aimed to elaborate a nutraceutical fermented beverage,  
49 using as raw material the Baru (*Dipteryx alata Vogel*) almond extract. Baru almond  
50 water-soluble extract (BAWE) developed in this study was fermented and co-  
51 fermented by four different isolates, lactic acid bacteria (*Weissella confusa*  
52 NR113258.1), commercial probiotic strains (*Lactobacillus casei* and *Lactobacillus*  
53 *acidophilus*), and yeast (*Rhodotorula mucilaginosa* KJ183057.1), in a simple  
54 fermentation and co-fermentation test at 37°C for 24h, and under refrigeration at  
55 4°C for further 24h. During the fermentations were analyzed parameters such as  
56 pH, titratable acidity, population counts and nutritional values. All the isolates tested  
57 acidified the BAWE with 18h of fermentation (pH values close to 4.0). The co-  
58 fermentations acidified the extract with only 6h of fermentation. After fermentation,  
59 two beverage formulations were developed with *Weissella confusa* bacteria. For  
60 acceptability analyzes, the formulations were submitted to sensory analysis and  
61 hygienic-sanitary quality were evaluated by counting thermotolerant coliforms, and  
62 presented high acceptability and adequate conditions of food safety and  
63 consumption. Accordingly, this study allowed the knowledge of the fermentative  
64 process of BAWE by different microorganisms, as well as the standardization of the  
65 production process using a lactic acid bacterium (*Weissella confusa*  
66 CHICHANR113258.1) isolated from an indigenous beverage produced in the  
67 region. The final product resulted in a fermented nutraceutical beverage with  
68 adequate nutritional and sensory characteristics, which will allow a possible  
69 beneficial effect under the intestinal microbiota of the consumer, and consequently  
70 improve the absorption of nutrients and prevent some diseases, as well as an  
71 alternative for people with lactose intolerance and for the market that is looking for  
72 alternative products.

73 Key words: *BAWE*, fermentation, standardization

74

75

76

77

78

79

80

81

82



## 84 1. INTRODUÇÃO

85           Devido à maior conscientização dos consumidores sobre a influência da  
86 alimentação na saúde, o interesse pelo desenvolvimento de novos alimentos  
87 funcionais e nutracêuticos tem crescido ao longo do tempo (TRIPATHI et al., 2014).  
88 O termo nutracêutico pode ser definido como um alimento ou parte de um alimento  
89 que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou  
90 tratamento da doença. E pode abranger desde os nutrientes isolados, suplementos  
91 dietéticos na forma de cápsulas e dietas, até os produtos benéficamente projetados,  
92 produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas  
93 (ROBERFROID, 2002; HUNGENHOLTZ, 2002; WILDMAN et al, 2007; DAS et al.,  
94 2014). Esses alimentos podem ser produzidos através de métodos fermentativos,  
95 com o uso de micro-organismos considerados seguros à saúde humana (DAS et  
96 al., 2014).

97           As bebidas fermentadas são produtos que auxiliam na inserção desses  
98 micro-organismos na dieta, e já foi confirmado por muitos estudos, que os produtos  
99 lácteos são os melhores substratos para o fornecimento dos mesmos. Porém, em  
100 decorrência de alguns inconvenientes relacionados à ingestão de produtos lácteos,  
101 como por exemplo, intolerância à lactose, teor de colesterol, alergia às proteínas  
102 do leite e o desejo por alternativas vegetarianas, houve uma crescente procura de  
103 produtos nutracêuticos não lácteos obtidos pela fermentação de cereais, frutas e  
104 vegetais (GRANATO et al., 2010; PRADO et al., 2015; FREIRE et al., 2017).

105           Muitas espécies vegetais do bioma Cerrado destacam-se por apresentar  
106 potencial econômico e alimentício (GONÇALVES et al., 2013). Algumas dessas  
107 espécies frutíferas são conhecidas por possuírem altos valores nutritivos,  
108 superiores a valores encontrados para outras espécies cultivadas. O baru, é uma  
109 espécie vegetal pertencente à família Leguminosae (Fabaceae) com ocorrência  
110 ampla no Cerrado que vem sendo explorado economicamente devido a suas  
111 qualidades nutricionais (MAGALHÃES, 2014).

112           A amêndoa de baru pode ser considerada um ótimo substrato para o  
113 desenvolvimento de um extrato hidrossolúvel vegetal, devido às suas importantes  
114 propriedades farmacológicas e nutricionais, além de seu baixo custo de produção.

115 Elas são ricas em gorduras, proteínas, são fontes de vitamina E, magnésio,  
116 manganês, cobre, fósforo, fibra, riboflavina e ácidos graxos monoinsaturados  
117 (FERNANDES et al., 2010; SIQUEIRA et al., 2015). Diante do exposto, o  
118 desenvolvimento de uma bebida fermentada nutracêutica, a partir do extrato da  
119 amêndoa de baru, fruto nativo do Cerrado, possibilitará uma maior opção de  
120 produtos protéicos de origem vegetal, além de valorizar a matéria prima regional, e  
121 oferecer um produto com características nutricionais e sensoriais adequadas.

122

## 123 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### 124 **2.1. Coleta e preparo das amêndoas de baru**

125 As amêndoas de baru foram adquiridas do assentamento Santa Clara Teijin  
126 em Nova Andradina-MS. Após a colheita, as amêndoas íntegras foram lavadas com  
127 água corrente, sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio (100 ppm) por 15  
128 minutos, enxaguadas novamente, secas em estufa de circulação de ar a 35°C, por  
129 5 horas, acondicionadas em sacos plásticos identificados e armazenadas sob  
130 refrigeração a 8°C.

131

### 132 **5.1.2. Obtenção do EHAB**

133 Para a elaboração do EHAB, foi utilizada a metodologia descrita por  
134 D'Oliveira (2015). As amêndoas de baru já sanitizadas foram tratadas termicamente  
135 em água sob fervura (1:3, p:v) por cinco minutos, com o objetivo de reduzir a carga  
136 microbiana, os fatores antinutricionais, inativar enzimas e facilitar o processamento  
137 posterior. Após o tratamento térmico as mesmas foram despelculadas  
138 manualmente e trituradas por 3 minutos. Em seguida foram homogeneizadas  
139 juntamente com água fervente (295 g de amêndoas trituradas/1 litro de extrato) em  
140 liquidificador por cinco minutos e o extrato resultante foi filtrado através de um pano  
141 de duas camadas. Após a filtração, foi realizado o processo de pasteurização  
142 (65°C/30 minutos) em garrafas de vidro esterilizadas, sendo o mesmo em seguida  
143 resfriado e armazenado sob refrigeração até o momento de utilização para a  
144 fermentação.

145

### 146 **5.2. Micro-organismos**

147 As culturas *Weissella confusa* (CHICHA NR113258.1) e *Rhodotorula*  
148 *mucilaginoso* (CHICHA KJ183057.1) foram isoladas a partir da bebida indígena  
149 chicha, e selecionadas devido à secreção de enzimas como proteases, lipases e  
150 celulase, caracterizadas em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. Foram  
151 utilizadas também as espécies comerciais probióticas *Lactobacillus acidophilus* e  
152 *Lactobacillus casei* adquiridas da Danisco® (YoMix, Deutschland). As bactérias  
153 lácticas foram cultivadas em meio de cultivo MRS (De Man Rogosa Sharpe Merck  
154 Whitehouse Station, USA) pH 6,0 (em m/v: peptona bacteriológica 1%, extrato de  
155 carne 0,8%, extrato de levedura 0,4%, glicose 2%, Tween 80 0,1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2%,  
156 acetato de sódio 0,3%, citrato de amônia 0,2%, sulfato de magnésio 0,001%, sulfato  
157 de manganês 0,0036%). A levedura foi cultivada no meio YEPG (Yeast Extract  
158 Peptone Glucose Agar) (Merck, Darmstadt, Germany) pH 3,5 (em m/v: extrato de  
159 levedura 1%, peptona 1%, glicose 2% e Agar 1,3%) e incubadas à 37° C por até  
160 48h. O inóculo utilizado para fermentação foi preparado utilizando 100 µL de cada  
161 espécie separadamente em 5 mL de Caldo MRS e YPD esterilizado, que foi em  
162 seguida incubado à 37°C. Após 16 h, o sobrenadante foi removido e as células  
163 transferidas para 50 mL de MRS. Os frascos foram incubados durante 16 h, e as  
164 células foram transferidas para 500 mL do seu respectivo meio e depois incubadas  
165 nas mesmas condições descrita acima. A suspensão celular foi centrifugada  
166 durante 7 min a 7000 rpm a 4°C e o sobrenadante removido. A massa celular foi  
167 então, lavada duas vezes com água peptonada esterilizada, e inoculada no extrato  
168 hidrossolúvel de amêndoa de baru, com uma população de 7 log UFC.ml<sup>-1</sup>

169

### 170 **5.2.1. Sobrevivência em pH 2.0**

171 Os quatro isolados foram submetidos ao teste de tolerância ao pH 2.0 para  
172 selecionar os isolados resistentes de acordo com a metodologia descrita por Ramos  
173 et al. (2013), com o objetivo de avaliar um possível efeito benéfico sobre a  
174 microbiota intestinal, uma vez que esse valor de pH simula o do pH digestivo, e se  
175 os isolados não sobreviverem a ele, não conseguirão permanecer no trato  
176 gastrointestinal, onde se espera que exerçam seus efeitos promotores de saúde.  
177 As culturas celulares com densidade óptica de 0,2 a 600 nm e com  
178 aproximadamente 10<sup>7</sup> células/mL foram centrifugadas e ressuspensas em caldo

179 MRS (bactérias) e YEPG (levedura) com pH ajustado para 2,0 utilizando HCl 1 N e  
180 incubadas durante 3 h a 37°C. As culturas foram posteriormente inoculadas em  
181 placas de ágar MRS e YPD com pH neutro por 48 h a 37 ° C para observar seu  
182 crescimento. O ensaio foi realizado em triplicata.

183

### 184 **5.3. Ensaio de Fermentação simples e co-fermentações**

185 As células lavadas foram inoculadas em 400 mL de extrato pasteurizado de  
186 amêndoa de baru. A suspensão com 1% de inóculo ( $7 \log \text{UFC/ml}^{-1}$ ) foi incubada  
187 em seguida a 37°C durante 24 h e depois, o extrato hidrossolúvel de baru  
188 fermentado permaneceu durante mais 24 h sob refrigeração (4°C), e a cada seis  
189 horas, foram coletadas assepticamente amostras para análises físico-químicas e  
190 microbiológicas. Para os ensaios de fermentação simples, cada micro-organismo  
191 foi inoculado no substrato separadamente, enquanto as co-fermentações foram  
192 realizadas da seguinte forma: (1) *W. confusa* e *R. mucilaginosa*, (2) *W. confusa* e  
193 *L. casei*, (3) *W. confusa* e *L. acidophilus*, (4) *R. mucilaginosa* e *L. casei*, (5) *R.*  
194 *mucilaginosa* e *L. acidophilus*, e (6) *L. acidophilus* e *L. casei*. Os experimentos  
195 foram realizados em triplicata.

196

### 197 **5.4. Contagem das células viáveis inoculadas**

198 Uma amostra de um mililitro foi retirada do fermentado. Foram preparadas  
199 diluições decimais seriadas numa solução de água peptonada a 0,1% (p/v) (Difco).  
200 As contagens viáveis das bactérias lácticas e da levedura durante o cultivo foram  
201 obtidas por espalhamento de 0,1 mL de uma amostra de uma diluição apropriada  
202 sobre a superfície de placas de MRS e YEPG e incubadas à 37°C durante 48h  
203 (EVANGELISTA et al., 2012, WANG et al., 2002). As unidades formadoras de  
204 colônias (UFC) foram enumeradas em placas contendo 30 a 300 colônias, e a  
205 concentração celular foi expressa como  $\log \text{UFC.mL}^{-1}$  de fermentado de baru.

206

### 207 **5.5. Análises físico-químicas**

208 Os valores de pH e a estimativa da acidez titulável foram mensurados  
209 durante a amostragem de acordo com a metodologia proposta por (AOAC, 2000).  
210 O pH das amostras do fermentado de baru foi mensurado com um pHmetro digital.

211 A estimativa da acidez titulável foi realizada por um método relatado pela AOAC  
212 (2000), no qual uma amostra de 5 mL foi titulada contra 0,1M NaOH utilizando  
213 Fenolftaleína como indicador.

214 Teores de umidade, matéria seca, gordura e cinzas foram determinados de  
215 acordo com a metodologia por (AOAC, 2000) no fermentado de baru. O teor de  
216 nitrogênio foi determinado de acordo com o método Kjeldahl, e o teor de proteína  
217 bruta foi feito pelo método Micro-Kjeldahl, usando-se o fator 6,25 para a conversão  
218 do nitrogênio em proteínas, segundo os métodos oficiais do Instituto Adolfo Lutz  
219 (ZENEBO et al., 2008). A concentração de carboidratos foi determinada pela  
220 diferença de teores:  $100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ gordura} + \% \text{ cinzas})$ . O  
221 valor calórico foi calculado utilizando a fórmula  $(\% \text{ Proteína} \times 4,0 + \% \text{ Lipídios} \times 9,0$   
222  $+ \% \text{ Carboidratos} \times 4,0)$  (WISKER and FELDHEIM, 1990).

223

## 224 **5.6. Formulação da bebida saborizada com o isolado selecionado**

225

226 Após a análise dos resultados das fermentações simples e co-  
227 fermentações, um isolado (*Weissella confusa* CHICHA NR113258.1) foi  
228 selecionado para formular a bebida saborizada, com base nos critérios de rápida  
229 acidificação do EHAB e de alto valor protéico na bebida resultante.

230 A bebida saborizada foi formulada utilizando o EHAB fermentado, descrito  
231 no item 5.1.2 e 5.3, acrescido de 25% de cacau (em pó 50%) e 5% de açúcar na  
232 primeira formulação (F1). E de 25% de ameixa e 5% de açúcar, na segunda  
233 formulação (F2). As bebidas saborizadas foram então, avaliadas quanto a  
234 qualidade higiênico-sanitária, através da contagem de coliformes termo-tolerantes,  
235 e submetidas à análise sensorial pelo teste de aceitabilidade.

236

### 237 **5.6.1. Análises de coliformes termo-tolerantes**

238 As análises de presença de coliformes termo-tolerantes nas bebidas  
239 saborizadas foram realizadas conforme APHA (2001), para atender o regulamento  
240 técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos (BRASIL, 2001), tendo os  
241 produtos à base soja como grupo de referência.

242 Para o teste presuntivo foram preparadas soluções com 25 ml das amostras  
243 em 225 mL de água peptonada a 1%. As amostras foram homogeneizadas e as

244 diluições decimais seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  realizadas, onde uma alíquota de 1 ml de  
245 cada diluição foi inoculada em triplicata em tubos de ensaio contendo caldo lactose.  
246 Os tubos foram incubados a  $36^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.

247 Para o teste confirmativo foram separados os tubos positivos em caldo  
248 lactose e inoculados, com alça, em tubos de caldo E.C. Os tubos foram incubados  
249 em banho-maria na temperatura de  $45\pm 0,2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Através dos tubos  
250 positivos calculou-se o número mais provável (NMP) de coliformes a  $45^{\circ}\text{C}$  por ml  
251 de amostra.

252

### 253 **5.6.2. Análise sensorial**

254 Este projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética para Pesquisa em  
255 Seres Humanos da Universidade Federal da Grande Dourados (anexo A).

256 Para a realização dos testes sensoriais foi necessário a participação de 21  
257 provadores não treinados da Universidade Federal da Grande Dourados, que  
258 concordaram com os termos do estudo e assinaram o Termo de Consentimento  
259 Livre e Esclarecido. Foram considerados critérios de exclusão e, portanto, não  
260 fizeram parte da pesquisa, pessoas menores de 18 e maiores de 60 anos,  
261 portadores de doenças sistêmicas ou crônicas (ex: diabetes) e pessoas com alergia  
262 a algum componente das formulações.

263 As formulações foram avaliadas sensorialmente, através do teste de  
264 aceitação (apêndice B). Para isso, foi utilizada escala hedônica com 9 pontos,  
265 sendo 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo). A ficha contendo o teste foi  
266 entregue juntamente com cada amostra e foi reservado um espaço para eventuais  
267 comentários, onde os provadores poderiam expressar, de forma mais detalhada,  
268 aspectos considerados importantes. Cada formulação foi avaliada de acordo com  
269 sete atributos: aparência, cor, aroma, sabor, textura, doçura e avaliação global  
270 (DUTCOSKY, 2013).

271

### 272 **5.7. Análise estatística**

273 Para a organização e validação dos dados experimentais das análises  
274 proximais e sensoriais, os dados foram submetidos à análise de variância  
275 (ANOVA), a diferença mínima significativa entre as amostras foi determinada pelo

276 teste de Tukey e o nível de significância utilizado foi 5%. O software R foi utilizado  
277 para as análises estatísticas; ORINGIN 8.0 para a confecção dos gráficos; e PAST  
278 para a análise de PCA.

279

## 280 **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

281 As espécies *Weisella confusa* (CHICHA NR113258.1), e *Rhodotorula*  
282 *mucilaginosa* (CHICHA KJ183057.1), ambas provenientes da bebida indígena  
283 chicha, e duas cepas comerciais (*Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*)  
284 foram testadas quanto a sobrevivência ao pH 2,0, e depois, avaliadas quanto à  
285 capacidade de fermentação em ensaios de fermentação simples e co-fermentação  
286 do EHAB.

287

### 288 **6.1. Teste de sobrevivência em pH 2,0**

289 Os quatro isolados foram analisados quanto à capacidade de sobrevivência  
290 em pH 2,0 em meio MRS e YEPD. Todos os micro-organismos testados foram  
291 capazes de sobreviver após 3 horas de exposição ao pH 2.0, indicando que podem  
292 sobreviver à passagem pelo estômago (GOLDIN et., 1992). A rápida acidificação  
293 auxilia em uma maior segurança, pois mediante a produção de ácido, inativa  
294 patógenos e micro-organismo prejudiciais (AMMOR et., 2007).

295

### 296 **6.2. Perfis de acidificação do EHAB pelos quatro isolados em fermentação 297 simples e co-fermentação**

298 Os perfis de acidificação dos isolados no EHAB foram avaliados durante 24h  
299 a 37°C, e sob refrigeração durante 24h em fermentação simples e co-fermentação  
300 da amêndoa de baru. O EHAB desenvolvido neste estudo demonstrou ser um  
301 substrato adequado para fermentação, uma vez que todos os isolados foram  
302 capazes de crescer e fermentar o mesmo. Os perfis de acidificação, e acidez  
303 titulável (ácido láctico/100g) dos micro-organismos durante as fermentações simples  
304 e co-fermentações são apresentados nas figuras 1 e 2. Os quatro isolados testados  
305 reduziram o pH em valores próximos a 4,0 e produziram ácido láctico na faixa de  
306 0,4% no EHAB após 18 horas de fermentação.

307 As bactérias lácticas comerciais *L. casei* e *L. acidophilus*, e a levedura

308 *Rhodotorula mucilaginosa* atingiram valores de pH de 4,8 e acidez titulável em torno  
309 de 0,38% de ácido láctico após 18h de fermentação. A bactéria láctica *Weissella*  
310 *confusa* apresentou pH de 4,69 e acidez de 0,48% de ácido láctico em 18h de  
311 fermentação. A legislação estabelece valores de acidez em torno de 0,6 a 2,0 de  
312 ácido láctico/100g para leites acidófilos e leites fermentados (BRASIL, 2007). Porém,  
313 para extratos hidrossolúveis vegetais, esse valor ainda não foi regulamentado, mas  
314 diferentes estudos adotaram como valores médios de referência 0,45% de ácido  
315 láctico (MIGUEL et al., 2010; FIORAVANTE et al., 2017).

316 Fioravante et al. (2017), encontraram valores semelhantes na formulação de  
317 uma bebida fermentada a partir do EHAB, e obtiveram, com cinco horas de  
318 fermentação valores de 4,7 e 0,48% de ácido láctico para pH e acidez titulável,  
319 respectivamente, porém foram adicionados polpa de ameixa e açúcar antes da  
320 fermentação; Miguel et al. (2010) também determinaram o pH final de 4,7 em  
321 fermentação de iogurte de soja, porém esse valor foi alcançado com seis horas de  
322 fermentação. Santos et al. (2014) na fermentação de extrato de amendoim e soja,  
323 demonstraram pH final de 4,6 em doze horas de fermentação. Foi referido que, em  
324 formulação de alimentos, o pH em torno de 3,5 a 4,5, auxilia no aumento do pH do  
325 trato gastrointestinal, e intensifica os benefícios e a estabilidade de cepas  
326 probióticas consumidas (KAILASAPATHY E CHIN, 2000). Quando mantidos sob  
327 refrigeração a 4°C, os isolados apresentaram valores médios de 4,7 e 0,44% de  
328 ácido láctico, para pH e acidez titulável, respectivamente, demonstrando que esses  
329 parâmetros sofreram poucas alterações com 24h sob refrigeração. Porém, de  
330 acordo com a literatura, o tempo de armazenamento pode aumentar o valor de  
331 acidez titulável. Thamer e Penna (2006), relataram que o armazenamento do  
332 produto, a temperatura de refrigeração e após acidificação provocada pelo  
333 metabolismo das culturas usadas podem contribuir para ao aumento da acidez no  
334 período de estocagem.

335 Alguns estudos confirmaram a capacidade de fermentação e acidificação  
336 das espécies comerciais *L. casei* e *L. acidophilus* em diferentes substratos, lácteos  
337 e não lácteos (FREIRE et al., 2017; FIORAVANTE, 2015; SANTOS et al., 2014).  
338 Foi verificado também, que a associação de *L. acidophilus* e *L. casei*, pode ser  
339 utilizada na prevenção e tratamento de infecções intestinais e no restabelecimento  
340 da microbiota intestinal após longos períodos de tratamento com antibióticos via

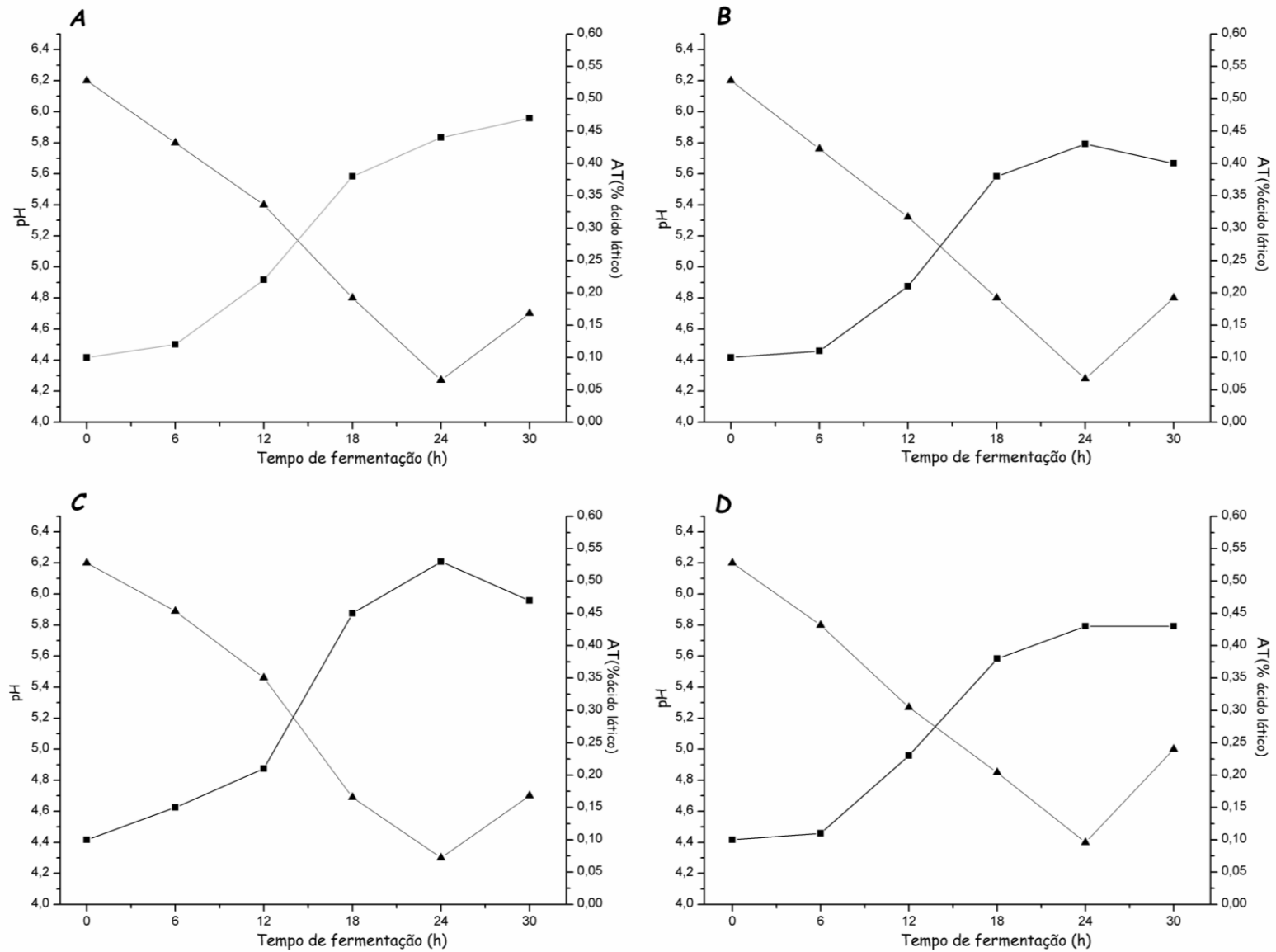


341 oral (GONZÁLEZ et al., 1993). Na literatura ainda não havia relatos sobre os  
342 parâmetros fermentativos dessas cepas em extrato hidrossolúvel de baru, e  
343 portanto, esse estudo é o primeiro a mencionar esses resultados.

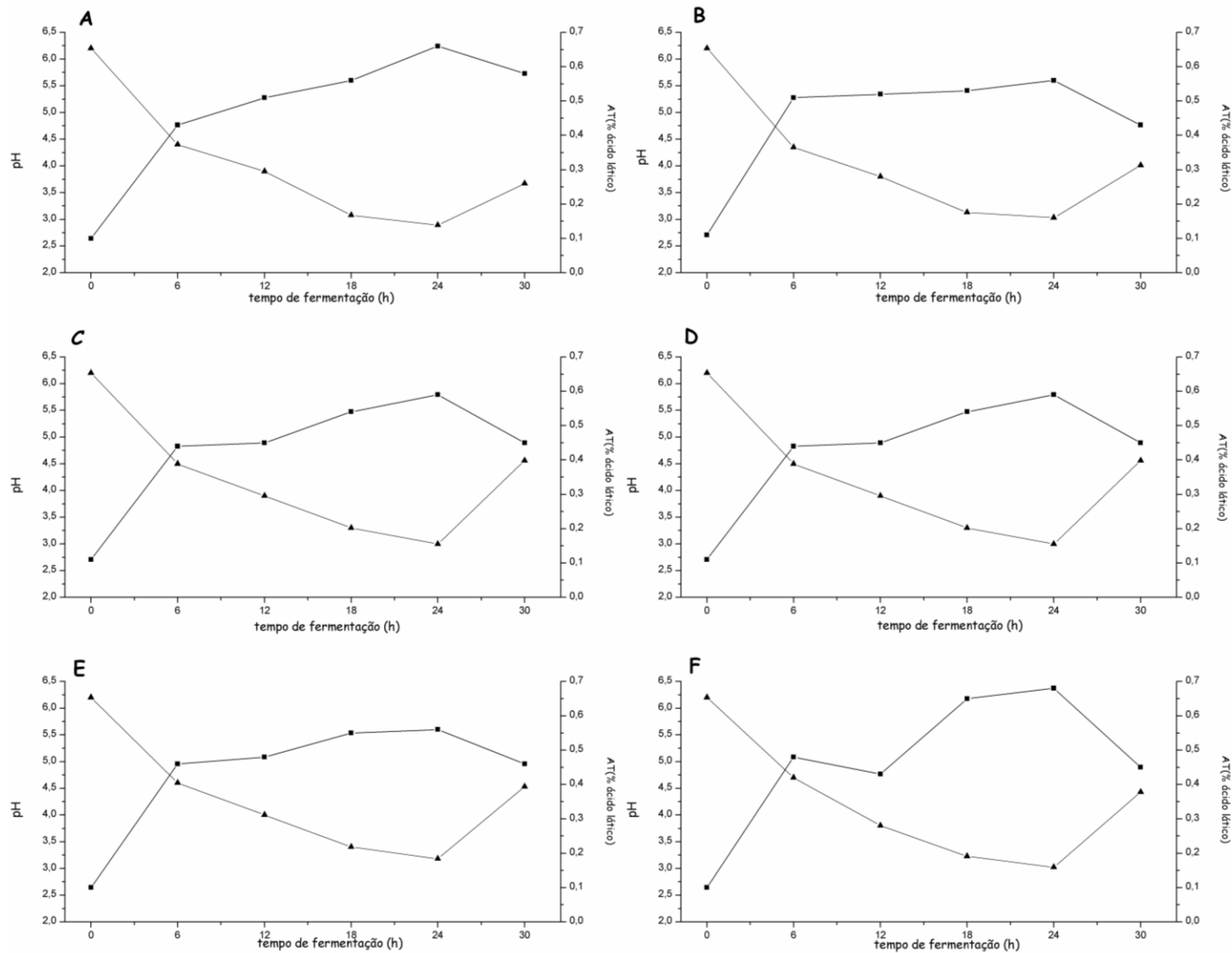
344 Os ensaios de co-fermentação propiciaram a acidificação desejável do  
345 EHAB após 6 horas de fermentação, uma vez que o pH chegou a aproximadamente  
346 4,5 e acidez titulável a 0,4% de ácido láctico, em média (figura 2).

347 A co-fermentação da levedura com a bactéria láctica *Weissella confusa*  
348 (tratamento A), apresentou valores de pH e acidez de 4,4 e 0,43% de ácido láctico,  
349 e quando co-fermentada com as culturas comerciais (tratamentos D e E),  
350 apresentou valores de pH em torno de 4,6 e acidez de 0,46% de ácido láctico. A  
351 fermentação em co-cultura de *Lactobacillus casei* e *Weissella confusa* apresentou  
352 valores de pH de 4,35 e acidez de 0,51% de ácido láctico, a co-fermentação entre  
353 *Weissella confusa* e *Lactobacillus acidophilus* obteve valores de 4,5 e 0,44% de  
354 ácido láctico, respectivamente, para pH e acidez titulável. A co-cultura de *L. casei* e  
355 *L. acidophilus* atingiu valores de pH de 4,7 e acidez de 0,48% de ácido láctico.

356 Em geral, pode-se observar que, na medida em que o pH diminuiu, a acidez  
357 titulável aumenta, demonstrando que os valores seguiram essa tendência oposta  
358 esperada. Isanga e Zhang (2007) relataram que a fermentação com culturas  
359 combinadas apresentam maiores valores de acidez titulável do que quando  
360 fermentadas sozinhas, os autores desenvolveram um extrato de amendoim  
361 fermentado com a mistura de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* e  
362 *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*. O crescimento simultâneo de BAL e  
363 leveduras são favoráveis em bebidas e alimentos fermentados, uma vez que as  
364 mesmas são favorecidas pela acidificação criada pelas bactérias, e o crescimento  
365 das bactérias é estimulado pela presença de leveduras, que fornecem fatores de  
366 crescimento, como vitaminas e componentes de nitrogênio solúvel (MIGUEL et al.,  
367 2015). A produção de ácidos que reduzem o valor de pH abaixo de 4,0 e a presença  
368 de outros componentes antimicrobianos durante a fermentação podem promover a  
369 segurança e estabilidade do produto final, uma vez que a maioria dos patógenos  
370 não sobrevivem em pH baixo (BLANDINO et al., 2003)



**Figura 1-** Perfis de acidificação do EHAB pelos isolados testados. A (*Lactobacillus acidophilus*); B (*Lactobacillus casei*); C (*Weissella confusa* CHICHANR113258.1); D (*Rhodotorula mucilaginosa* CHICHAKJ183057.1);



**Figura 2-** Perfis de acidificação do EHAB durante as co-fermentações testadas. A) *Weissella confusa* (CHICHANR113258.1)+ *Rhodotorula mucilaginosa* (CHICHAKJ183057.1); B) *Weissella confusa*(CHICHANR113258.1)+ *Lactobacillus casei*; C) *Weissella confusa*(CHICHANR113258.1)+ *Lactobacillus acidophilus*; D) *Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1)+ *Lactobacillus casei*; E) *Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1)+ *Lactobacillus acidophilus*; F) *Lactobacillus casei*+ *Lactobacillus acidophilus*.

### 370 **6.3. População microbiana pós-fermentação**

371 A população dos micro-organismos ao final dos ensaios de fermentação e  
372 co-fermentação, e após 24h sob refrigeração (4°C) são demonstradas na tabela 1.

373 Os quatro isolados apresentaram contagens populacionais próximas durante  
374 as fermentações individuais, atingindo valores em torno de 8 logUFC.ml<sup>-1</sup> com 24h  
375 de fermentação. Quando as bebidas foram mantidas sob refrigeração por mais 24h  
376 à 4°C, esses micro-organismos diminuíram sua população para valores em torno  
377 de 7 log UFC.ml<sup>-1</sup>. Foi sugerido que, para proporcionarem efeitos benéficos na  
378 saúde do trato gastrointestinal, os produtos fermentados quando consumidos,  
379 necessitam de bactérias probióticas com uma população de 8 Log UFC.ml<sup>-1</sup>  
380 (OUWEHAND E SALMINEN, 1998), portanto, a bebida desenvolvida neste trabalho  
381 encontra-se dentro dos padrões desejáveis.

382 A população dos micro-organismos nos ensaios de co-fermentação foi  
383 superior aos ensaios de fermentação simples, apresentando valores em torno de 9  
384 log UFC.ml<sup>-1</sup> para as bactérias lácticas e 6 log UFC.ml<sup>-1</sup> para a levedura, com 24h de  
385 fermentação e diminuindo 1 log UFC.ml<sup>-1</sup> quando mantidos sob refrigeração (tabela  
386 1). Para obter a redução do pH e a produção de ácido desejada, são necessárias  
387 altas contagens viáveis, que afetará no prazo de validade, nas propriedades  
388 organolépticas, como também, prevenir a contaminação (RATHORE et al., 2012).

389 O potencial de aplicação biotecnológica da bactéria *Weissella confusa* tem  
390 sido estudado por diferentes autores, com o objetivo de descobrir novos micro-  
391 organismos com potencial de proporcionar efeitos benéficos na saúde dos  
392 consumidores (YANG et al., 2014; PATEL et al., 2013; VITALI et al., 2012;  
393 COLLINS et al.,1993), porém esse estudo foi o primeiro a avaliar o potencial  
394 fermentativo dessas espécies em EHAB. Em geral, os resultados obtidos por esse  
395 micro-organismo, isolado da bebida indígena chicha, quando comparados aos das  
396 cepas comerciais (*L. casei* e *L. acidophilus*), foram semelhantes, visto que, essa  
397 bactéria foi capaz de sobreviver a baixos valores de pH, acidificar o extrato de baru,  
398 e conseqüentemente atingir valores ideais de pH durante a fermentação, como  
399 também manter sua população em torno de 7 log UFC.ml<sup>-1</sup> após 24h de  
400 fermentação e mais 24h em refrigeração.

401

402

403 **Tabela 1-** Contagens populacionais (log UFC.ml<sup>-1</sup>) dos ensaios ao final das fermentações  
 404 simples e co-fermentações, e após a refrigeração

		Log UFC.ml <sup>-1</sup>				
<b>Fermentações Simples</b>		<b>M.O</b>	<b>24h/37°C</b>		<b>24h/4°C</b>	
		<i>W.confusa</i> (CHICHANR113258.1)	8,3		7,3	
		<i>R.mucilaginosa</i> (CHICHAKJ183057.1)	8,3		7,2	
		<i>L. casei</i>	8,3		7,4	
		<i>L. acidophilus</i>	8,9		7,7	
<b>Co-fermentações</b>		<b>1</b>	<b>BAL</b>	<b>LEV</b>	<b>BAL</b>	<b>LEV</b>
		<b>2</b>	9,7	6,0	8,4	5,0
		<b>3</b>	9,9	-	8,5	-
		<b>4</b>	9,7	-	8,6	-
		<b>5</b>	9,5	5,5	8,4	4,5
		<b>6</b>	9,8	5,8	8,8	4,4
			9,8	-	8,6	-

405 (1)*Weissella confusa*(CHICHANR113258.1)+*Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1);  
 406 (2)*Weissella confusa*(CHICHANR113258.1)+ *Lactobacillus casei*; (3)*Weissella confusa*(CHICHA  
 407 NR113258.1)+ *Lactobacillus acidophilus*; (4)*Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1)+  
 408 *Lactobacillus casei*; (5)*Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1)+ *Lactobacillus acidophilus*;  
 409 (6)*Lactobacillus acidophilus*+ *Lactobacillus casei*.

410

#### 411 **6.4. Caracterização proximal do EHAB e do extrato hidrossolúvel** 412 **fermentado**

413 Os resultados obtidos nas análises proximais do EHAB e do fermentado são  
 414 apresentados na tabela 2 e 3, respectivamente.

415 A legislação (RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005) estabelece que a  
 416 quantidade mínima de proteína é de 3,0 g.100mL<sup>-1</sup> para produtos protéicos de  
 417 origem vegetal (BRASIL, 2005 a), diante do exposto, é possível afirmar que o EHAB  
 418 está de acordo com os parâmetros descritos nesta legislação. O extrato apresentou  
 419 características semelhantes aos demais extratos vegetais (PRETTI et al., 2012;  
 420 BICUDO et al., 2012), como também composições próximas ao do leite bovino:  
 421 umidade 87,3%, proteínas 3,3 %, lipídeos 3,8% e minerais 0,72% (DE ANGELIS;  
 422 TIRAPGUI, 2007), porém com a vantagem de não possuir lactose e os sítios  
 423 alergênicos da proteína do leite, destacando-se assim, como uma alternativa na  
 424 ingestão de proteínas para pessoas com alergia ao leite de vaca e/ou intolerância  
 425 a lactose (D'OLIVEIRA, 2015).

**Tabela 2-** Análise proximal do EHAB in natura

Componentes	(%)
Umidade	95,62±0,2
Carboidratos totais	24,07 ±0,17
Lipídeos	2,47 ±0,12
Proteínas**	3,48 ±0,08
Cinzas	0,99 ±0,01
Fibra Bruta	1,98 ±0,02

427 \*Valores constituem média ± desvio padrão de triplicatas.

428 \*\*Fator de conversão de nitrogênio em proteína - 6,25.

429

430 As composições proximais do EAHB fermentado são apresentadas na tabela  
 431 3. Com exceção das cinzas, todas as variáveis avaliadas na composição  
 432 centesimal, das 4 fermentações simples, diferiram entre si, pelo teste de tukey, com  
 433 5% de probabilidade. O EHAB fermentado com a bactéria *Weissella confusa*  
 434 apresentou o maior valor de carboidrato quando comparada com as outras  
 435 fermentações, o teor de lipídeo foi semelhante aos dos EHAB fermentados com  
 436 bactérias comerciais, e inferior ao fermentado com *Rhodotorula mucilaginosa*, o  
 437 que pode ser explicado pela possível produção de lipases dessa levedura, que  
 438 também apresentou o maior valor calórico, o qual, pode estar associado a maior  
 439 concentração de lipídeos.

440 Fioravante (2015) ao desenvolver uma bebida fermentada saborizada à base  
 441 de EHAB, encontrou valores semelhantes de proteína (3,16%), lipídios (6,50%) e  
 442 valor calórico (82,20 kcal 100g<sup>-1</sup>), valor inferior de umidade (83%) e valor superior  
 443 de carboidratos (4,31%). D'Oliveira (2015), desenvolveu um EHAB, e relatou  
 444 valores inferiores, de umidade (85,89%), valor calórico (60,89 kcal 100g<sup>-1</sup>) e lipídios  
 445 (4,89%). Outros autores relataram, no desenvolvimento de diferentes extratos  
 446 vegetais, valores de composição centesimal semelhantes ao deste estudo (PRETTI  
 447 et al., 2012; BICUDO et al., 2012)

448

449

450

451

**Tabela 3-** Composição proximal dos extratos hidrossolúveis fermentados de Barú

FERMENTAÇÕES SIMPLES				
COMPONENTES	R	L. C	W. C	L. A
Umidade	87,27 <sup>a</sup> ±0,10	87,32 <sup>a</sup> ±0,10	85,27 <sup>b</sup> ±0,30	86,20 <sup>b</sup> ±0,20
Carboidratos totais	0,21 <sup>b</sup> ±0,02	2,14 <sup>b</sup> ±0,03	5,10 <sup>a</sup> ±0,03	2,93 <sup>b</sup> ±0,07
Lipídeos	8,20 <sup>a</sup> ±0,30	5,92 <sup>b</sup> ±0,20	5,32 <sup>b</sup> ±0,10	6,16 <sup>b</sup> ±0,20
Proteína Bruta**	3,61 <sup>b</sup> ±0,05	3,71 <sup>a</sup> ±0,10	3,41 <sup>b</sup> ±0,07	3,82 <sup>a</sup> ±0,10
Cinzas	0,87 <sup>a</sup> ±0,01	0,90 <sup>a</sup> ±0,02	0,89 <sup>a</sup> ±0,03	0,88 <sup>a</sup> ±0,02
Fibra Bruta	0,93 <sup>ab</sup> ±0,02	0,81 <sup>ab</sup> ±0,01	0,74 <sup>b</sup> ±0,03	0,86 <sup>ab</sup> ±0,01
Valor Calórico	89,06 <sup>a</sup> ±0,87	76,18 <sup>b</sup> ±0,77	80,69 <sup>b</sup> ±0,60	81,75 <sup>b</sup> ±0,56

453 \*Valores constituem média ± desvio padrão de triplicatas. \*\*Letras diferentes na mesma linha  
 454 indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ). \*\*\*Fator de conversão de nitrogênio em proteína- 6,25. W.  
 455 C (*Weissella confusa* CHICHANR113258.1); L.C(*Lactobacillus casei*); R (*Rhodotorula mucilaginosa*  
 456 CHICHAKJ183057.1); L.A(*Lactobacillus acidophilus*).  
 457

458 Os resultados da composição proximal das co-fermentações são  
 459 apresentadas na tabela 4. A co-fermentação entre *Weissella confusa* e *Rhodotorula*  
 460 *mucilaginosa*, quando comparada com a fermentação simples desses micro-  
 461 organismos, apresentou valores maiores de carboidrato (6,01%), e inferior de  
 462 proteína (3,30%). Na co-fermentação das cepas comerciais essas tendências  
 463 também foram observadas, os valores de carboidratos foram aumentados (7,20 e  
 464 5,68%) e os de proteínas diminuíram (2,68 e 3,15%). Em geral, é possível observar  
 465 que o valores de carboidratos e valor calórico foram aumentados nas co-  
 466 fermentações, em relação as fermentações simples.

467 Os parâmetros fibra bruta e cinzas, avaliados nas seis diferentes co-  
 468 fermentações, não apresentaram diferença significativa na análise de variância. No  
 469 entanto, estatisticamente, a 5% de significância pelo teste Tukey, os parâmetros  
 470 carboidratos, lipídeos e proteínas, se diferenciaram quando comparado nas  
 471 diferentes co-fermetações.

472 De acordo com as tabelas, os resultados obtidos permitem concluir que tanto  
 473 o EHAB in natura, quanto o EHAB fermentado apresentaram teores similares de  
 474 proteínas. O teor de carboidrato diminuiu no EHAB fermentado, o que pode ser  
 475 explicado pelo consumo dos mesmos pelos micro-organismos presentes na bebida,  
 476 uma vez que estes carboidratos são fontes primárias de energia devido à facilidade

477 de absorção. Essa diminuição de carboidratos durante a fermentação, pode  
 478 classificar o EHAB, como uma bebida mais light, e como uma boa fonte energética,  
 479 devido ao seu valor calórico. Alguns estudos indicam que as dietas com menor  
 480 proporção de carboidrato, e maior de proteínas promovem maior perda de peso e  
 481 redução de gordura corporal e menor perda de massa magra, quando comparada  
 482 as dietas convencionais (LAYMAN, 2005; JOSSE et al., 2011).

483

484 **Tabela 4-** Composição proximal dos extratos hidrossolúveis co-fermentados de Baru

CO-FERMENTAÇÕES						
COMPONENTES	1	2	3	4	5	6
Umidade	83,40 <sup>b</sup> ±0,50	84,15 <sup>b</sup> ±0,40	83,65 <sup>b</sup> ±0,50	85,74 <sup>a</sup> ±0,60	86,05 <sup>a</sup> ±0,50	85,43 <sup>a</sup> ±0,40
Carboidratos totais	6,01 <sup>a</sup> ±0,10	7,20 <sup>a</sup> ±0,11	5,68 <sup>b</sup> ±0,20	3,25 <sup>c</sup> ±0,60	2,92 <sup>c</sup> ±0,55	3,45 <sup>c</sup> ±0,60
Lipídeos	6,40 <sup>a</sup> ±0,20	5,10 <sup>b</sup> ±0,10	6,64 <sup>a</sup> ±0,40	6,64 <sup>a</sup> ±0,20	7,08 <sup>a</sup> ±0,30	6,89 <sup>a</sup> ±0,10
Proteína Bruta**	3,30 <sup>abc</sup> ±0,10	2,68 <sup>d</sup> ±0,10	3,15 <sup>bc</sup> ±0,10	3,51 <sup>a</sup> ±0,30	3,08 <sup>c</sup> ±0,10	3,37 <sup>ab</sup> ±0,10
Cinzas	0,88 <sup>a</sup> ±0,02	0,86 <sup>a</sup> ±0,03	0,87 <sup>a</sup> ±0,03	0,85 <sup>a</sup> ±0,02	0,87 <sup>a</sup> ±0,02	0,85 <sup>a</sup> ±0,02
Fibra Bruta	1,01 <sup>a</sup> ±0,01	1,00 <sup>a</sup> ±0,01	0,90 <sup>a</sup> ±0,02	0,91 <sup>a</sup> ±0,01	0,97 <sup>a</sup> ±0,02	0,87 <sup>a</sup> ±0,01
Valor Calórico	93,37 <sup>ab</sup> ±0,02	83,63 <sup>c</sup> ±0,05	93,69 <sup>a</sup> ±0,02	86,02 <sup>bc</sup> ±0,02	86,97 <sup>abc</sup> ±0,05	88,49 <sup>abc</sup> ±0,05

485 \*Valores constituem média ± desvio padrão de triplicatas. \*\*Letras diferentes na mesma linha  
 486 indicam diferença significativa (p≤ 0,05). \*\*\*Fator de conversão de nitrogênio em proteína- 6,25  
 487 (1)*Weissella confusa*(CHICHANR113258.1)+*Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1);  
 488 (2)*Weissella confusa*(CHICHANR113258.1)+ *Lactobacillus casei*;(3)*Weissella confusa*(CHICHA  
 489 NR113258.1)+ *Lactobacillus acidophilus*; (4)*Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1)+  
 490 *Lactobacillus casei*; (5)*Rhodotorula mucilaginosa*(CHICHAKJ183057.1)+ *Lactobacillus acidophilus*;  
 491 (6)*Lactobacillus acidophilus*+ *Lactobacillus casei*.

492 O mercado de alimentos, atualmente, apresenta algumas marcas brasileiras  
 493 que desenvolvem produtos com teor reduzido ou zero lactose, como por exemplo,  
 494 a Verde Campo, que se destacou com a linha “Lacfree”, a qual traz produtos ricos  
 495 em nutrientes e com poucas calorias, são constituídos por leite desnatado, polpa  
 496 de fruta, enzima lactase, fermento lácteo e estabilizantes. Esses produtos são  
 497 indicados para dietas com restrição de lactose, assim como a bebida fermentada  
 498 desenvolvida neste estudo, e apresentam valor nutricional semelhante a mesma,  
 499 uma vez que, uma porção de 170 ml da bebida lacfree contém 9g de carboidratos,  
 500 5g de proteínas e um valor calórico de 56kcal (Copyright © Verde Campo, 2018).

501 A amêndoa de baru é referida na literatura por apresentar alto valor  
 502 nutricional, pois é rica em lipídeos, proteínas, fibras e minerais, especialmente o  
 503 cálcio (SIQUEIRA et al., 2015). Os compostos químicos presentes na amêndoa



504 sugerem possíveis atividades biológicas para a mesma, tais como antioxidante,  
505 anti-inflamatória e antitumoral (MARQUES et al., 2015).

506 A presença de um elevado valor lipídico pode estar relacionada ao teor de  
507 ácidos graxos da amêndoa de baru. Foi referido por outros estudos que a fração  
508 graxa da amêndoa de baru apresenta uma relação de ácidos graxos essenciais de  
509 ômega 6, ômega 3 e de ômega 9, capaz de qualificar a amêndoa como um  
510 nutracêutico importante para a saúde humana, uma vez que esses componentes  
511 reduzem os teores de colesterol total, LDL-C plasmático e triglicérides, além de,  
512 exercer outros efeitos cardiovasculares benéficos, como redução da viscosidade  
513 do sangue (SBC, 2007; VERA et al., 2009; FERNANDES et al., 2010).

514 As proteínas da amêndoa de baru apresentam boa digestibilidade (80%) e  
515 bom perfil de aminoácidos essenciais, destacando-se um teor significativo de  
516 glutamina, um aminoácido essencial para indivíduos catabólicos, como desnutridos  
517 e pós-operados (FREITAS et al, 2010; FERNANDES et al, 2010). O EHAB  
518 também apresentou teores de fibras, o que reforça o uso potencial dessa amêndoa,  
519 pois as fibras estão associadas ao aumento do bolo fecal e a prevenção de  
520 problemas entéricos, entre outras doenças (BRAND-MILLER, 2002).

521

## 522 **6.5. Contagem de coliformes termo-tolerantes na bebida selecionada**

523 As duas formulações da bebida fermentada saboriza, à base de EHAB,  
524 foram submetidas às análises de coliformes termo-tolerantes.

525 A bebida desenvolvida neste estudo apresentou condições adequadas às de  
526 segurança alimentar e de consumo, padronizadas pela Resolução nº 12 de 2 de  
527 janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), para Coliformes a 45°C, não representando assim,  
528 riscos à saúde dos provadores na análise sensorial. Os resultados das análises  
529 higiênico-sanitárias, para as duas formulações da bebida fermentada são  
530 demonstrados na tabela 5.

531

532

533

534 **Tabela 5** - Contagem de coliformes termotolerantes das formulações de bebida fermentada  
 535 saborizada à base de EHAB

Formulações	Coliformes a 45 °C (NMP/g)
F1	<3
F2	<3
PEL*	10 NMP/g

536 NMP/g: Número mais provável por grama.

537 \*PEL: Padrão estabelecido pela legislação.

538

### 539 **6.6. Análise sensorial da bebida fermentada e saborizada de EHAB**

540 Vinte e um provadores não treinados entre acadêmicos, pós-graduandos e  
 541 servidores da UFGD participaram do teste de aceitação, dentre os quais 16 eram  
 542 mulheres (76,19%) e 5 homens (23,81%), com idades variando de 18 a 34 anos.

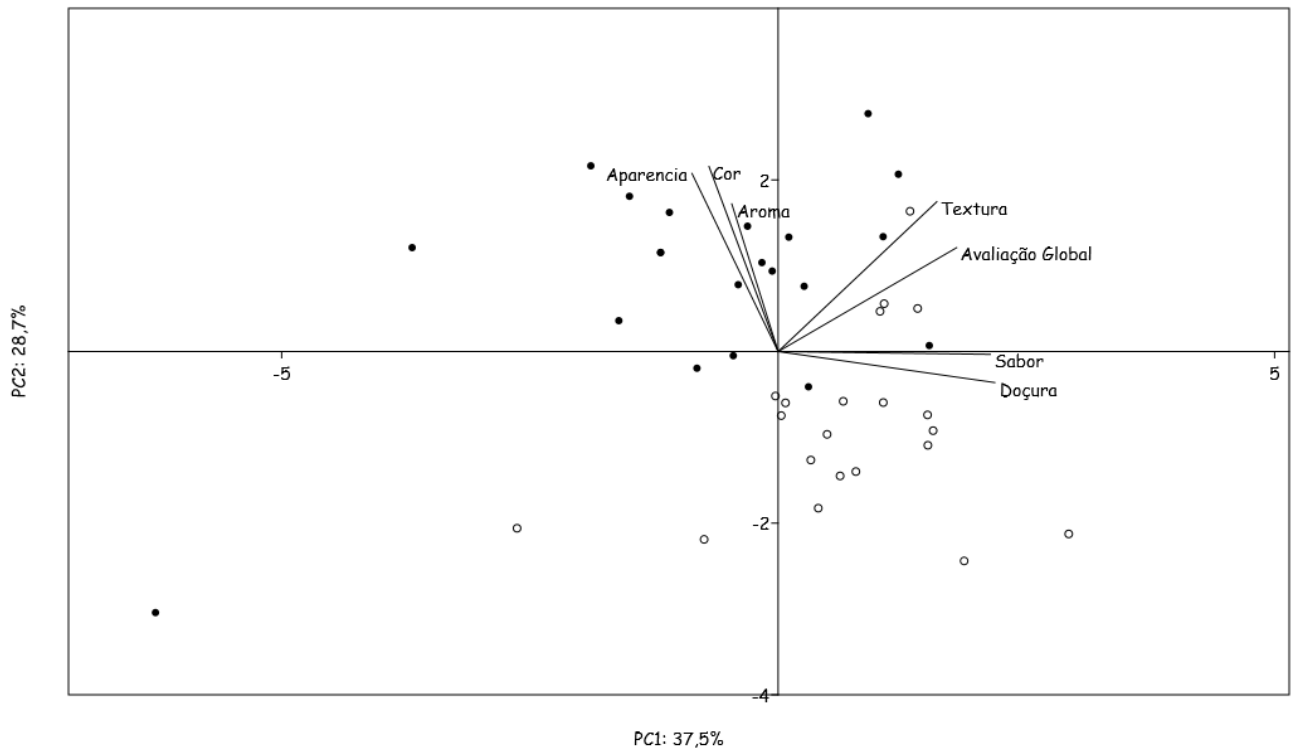
543 De acordo com os resultados da aceitabilidade, os consumidores gostaram  
 544 moderadamente das amostras, conforme a escala utilizada (Tabela 6). Aparência,  
 545 cor, aroma, sabor, textura e doçura, diferiram significativamente ( $P < 0,05$ ) entre as  
 546 formulações. No entanto, o atributo avaliação global, definida como a impressão  
 547 causada pelo produto como um todo, não apresentou diferença significativa entre  
 548 as formulações. ( $P > 0,05$ ).

549 **Tabela 6-** Resultados do teste de aceitação, por escala hedônica de 9 pontos, para os  
 550 atributos aparência, cor, aroma, sabor, textura, doçura e avaliação global das 7  
 551 formulações de bebida fermentada saborizada à base de EHAB.

	Respostas- Teste de aceitação*	
	Formulações	
	F1	F2
552		
553	<b>Aparência</b>	8,0 <sup>a</sup> 7,0 <sup>b</sup>
554	<b>Cor</b>	8,0 <sup>a</sup> 7,0 <sup>b</sup>
555	<b>Aroma</b>	8,0 <sup>a</sup> 7,0 <sup>b</sup>
	<b>Sabor</b>	6,0 <sup>b</sup> 7,0 <sup>a</sup>
556	<b>Textura</b>	7,0 <sup>a</sup> 6,0 <sup>b</sup>
	<b>Doçura</b>	6,0 <sup>b</sup> 8,0 <sup>a</sup>
	<b>Avaliação Global</b>	7,0 <sup>a</sup> 7,0 <sup>a</sup>

\*Média ± desvio padrão das notas de 21 provadores divididos em três blocos (triplicata)

\*\*Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3-** Atributos sensoriais das formulações da bebida saborizada à base de EHAB. ● Formulação 1; ○ formulação 2.

558 A Fig. 3 mostra esses resultados, demonstrando que as duas formulações  
 559 se agruparam em relação aos atributos avaliação global e textura. E se diferiram  
 560 em relação aos demais atributos, uma vez que, a formulação 1 apresentou maior  
 561 intensidade dos atributos aparência, cor, aroma e textura, e menor dos atributos  
 562 sabor e doçura. O inverso foi observado para a formulação 2, visto que, é possível  
 563 constatar um maior agrupamento dessa formulação em relação aos atributos sabor  
 564 e doçura. Fioravante (2015) ao desenvolver uma bebida fermentada saborizada à  
 565 base de EHAB, observou na análise sensorial, que a bebida apresentou boa  
 566 aceitabilidade com médias variando de 6 (gostei ligeiramente) a 7 (gostei  
 567 moderadamente), e que a formulação com ameixa, apresentou as maiores notas  
 568 para os atributos aparência, cor e doçura.

569

570

571

## 572 7. CONCLUSÃO

573 Neste estudo, foi padronizado o processo de produção de uma bebida  
574 fermentada, alternativa aos produtos lácteos, com elevado teor de proteínas, sem  
575 lactose, e nutracêutica, utilizando como matéria-prima principal o extrato da  
576 amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel). A amêndoa de baru, disponível em  
577 abundância no cerrado brasileiro, se destacou como um excelente substrato para  
578 fermentação das culturas comerciais (*L. casei* e *L. acidophilus*) e de dois micro-  
579 organismos isolados de uma bebida indígena da região (*Weissella confusa* e  
580 *Rhodotorula mucilaginosa*). Este estudo foi o primeiro a relatar o possível potencial  
581 da bactéria *Weissella confusa* em bebida fermentada à base do extrato  
582 hidrossolúvel de amêndoa de baru. Por apresentar resultados semelhantes aos das  
583 cepas comerciais, como também, por existirem vários estudos relatando seu  
584 potencial, essa bactéria láctica foi selecionada para desenvolver a bebida  
585 fermentada sabozirada. A levedura *Rhodotorula mucilaginosa*, em estudos futuros,  
586 pode ser testada em co-fermentação com a *Weissella confusa*, pois analisando os  
587 resultados, foi possível observar uma maior concentração de ácido láctico nesse  
588 ensaio, o que pode influenciar na qualidade final e aceitação da bebida. A utilização  
589 de novas culturas iniciadoras pode auxiliar em um maior rendimento nas indústrias,  
590 bem como no desenvolvimento de produtos fermentados, com maior potencial  
591 nutracêutico. O produto final, bebida fermentada saborizada à base de EHAB,  
592 apresentou valores nutricionais semelhantes ao de leite acidófilo de origem animal,  
593 podendo ser considerado uma alternativa para pessoas com intolerância a lactose,  
594 como também, um alimento nutracêutico, visto que os micro-organismos presentes  
595 na bebida foram capazes de sobreviverem à pH 2,0, podendo apresentar um efeito  
596 benéfico a microbiota intestinal do consumidor, e conseqüentemente, melhorar a  
597 absorção de nutrientes e prevenir algumas doenças.

598

599

600

601

602

603

## 604 7. REFERÊNCIAS

- 605 AMMOR MS, MAYO B (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used  
606 as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci* 76,  
607 138–146.
- 608 AOAC e Association of Official Analytical Chemist (2000) In: AOAC (Ed.), *Official*  
609 *Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist*, seventeenth  
610 ed. Washington.
- 611
- 612 APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (2001) Committee on  
613 Microbiological for Foods. *Compendium of methods for the microbiological*  
614 *examination of foods*.4.ed. Washington:American Public Health Association 676p.
- 615
- 616 BICUDO MOP, VASQUES EC, ZUIM DR, CANDIDO LMB (2012) Elaboração e  
617 caracterização de bebida fermentada à base de extrato hidrossolúvel de quinoa  
618 com polpa de frutas. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de*  
619 *Alimentos, Curitiba*, v. 30, n. 1, p. 19-26.
- 620
- 621 BLANDINO A, AL-ASEERI ME, PANDIELLA SS, CANTERO D, WEBB C (2003)  
622 Review: Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res Int* 36, 527–543.
- 623
- 624 BRAND-MILLER J (2002) Carbohydrates. In: MANN, J.; TRUSWELL, S. *Essentials*  
625 *of human nutrition*. 2. ed. New York: Oxford University Press, cap. 2 , p. 11-29.
- 626
- 627 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução  
628 nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões  
629 microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*,  
630 Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção 1, p. 45-53.
- 631
- 632 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução  
633 nº 268, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para produtos protéicos  
634 de origem vegetal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF,  
23 set. 2005a, Seção 1, p. 371-372.
- 635
- 636 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa  
637 nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento técnico de identidade e qualidade  
638 de leites fermentados. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília,  
DF, 24 out. 2007, Seção 1, p. 4-7.
- 639
- 640 COLLINS MD, SAMELIS J, METAXOPOULOS J, WALLBANKS S (1993)  
641 Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages:  
642 description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group  
of species. *J Applied Microbiol* 75:595e603.
- 643
- 644 DAS A, SEN CK (2014) *Nutraceutical and Functional Food Regulations in the United*  
*States and Around the World*. Elsevier p. 13–39.
- 645
- 646 DE ANGELIS RC, TIRAPEGUI (2007) *J. Fisiologia da Nutrição Humana: Aspectos*  
*básicos, aplicados e funcionais*. 2ed. São Paulo: Atheneu. 565p.

647 D'OLIVEIRA AC (2015) Desenvolvimento de bebida aromatizada da amêndoa de  
648 baru (*Dipteryx alata* Vog.). 99 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e  
649 Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina/UFMS,  
650 Campo Grande.  
651  
652 DUTCOSKY SD (2013) Análise sensorial de alimentos. 4. ed. rev. e amp. Curitiba:  
653 Champagnat, 531 p.  
654  
655 EVANGELISTA SR, GHISELLI G, FILHO FM (2012) Development of a soy-based  
656 symbiotic beverage. *Food Nutr Sci* 1128–1135.  
657  
658 FERNANDES DC, FREITAS JB, CZEDER LP, NAVES MMV (2010) Nutritional  
659 composition and protein value of the baru (*Dipteryx alata* Vog.) almond from the  
660 Brazilian Savanna. *J Sci Food Agric* v. 90, n. 10, p. 1650-1655.  
661  
662 FIORAVANTE MB, HIANE PA, BRAGA NETO JA (2017) Elaboração, aceitação  
663 sensorial e caracterização de bebida fermentada saborizada à base de extrato  
hidrossolúvel da amêndoa de baru. *Ciência Rural* vol.47, n.9, e20151646.  
664  
665 FREIRE AN, RAMOS CL, SOUZA PN, CARDOSO MGB, SCHWAN RF (2017)  
666 Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic  
667 starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *Int J Food Microbiol* 248 39–46  
668  
669 FREITAS JB, NAVES MMV (2010) Composição química de nozes e sementes  
670 comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Rev Nutrição, Campinas*, v. 23,  
n. 2, p. 269-279, mar./abr. 2010.  
671  
672 GONÇALVES LGV, ANDRADE FR, MARIMON JUNIOR BH, SCHOSSLER TR,  
673 LENZA E, MARIMON BS (2013) Biometria de frutos e sementes de mangaba  
(*Hancornia speciosa* Gomes) em vegetação natural na região leste de Mato Grosso,  
674 Brasil. *Ver Ciências Agrárias, Lisboa*, v. 36, n. 1, p. 31–40.  
675  
676 GOLDIN BR, GORBACH SL (1992) Probiotics for humans. In: Fuller, R. (Ed.),  
677 Probiotics, the Scientific Basis. Chapman & Hall, London, pp. 355 – 376.  
678  
679 GONZÁLEZ JM, SHERRB F, SHERR EB (1993) Digestive enzyme activity as a  
680 quantitative measure of protistan grazing: the acid lysozyme assay for bacterivory.  
681 *Marine Ecol Progress Series* 100: 197-206.  
682  
683 GRANATO D, BRANCO GF, NAZZARO F, CRUZ AG, FARIA JAF (2010) Functional  
684 food and nondairy probiotic food development: trends, concepts, and products.  
685 *Reviews in Food Sci and Food Safety* 9:292-302.  
686  
687 HUNGENHOLTZ J, SMID EJ (2002) Nutraceutical production with food-grade  
688 microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 13, p. 497-507.  
689  
690 ISANGA J, ZHANG GN (2007) Biologically active components and nutraceuticals in  
691 peanuts and related products: review. *Food Rev Int* 23 (2), 123–140.  
692  
693 JOSSE AR, ATKINSON SA, TARNOPOLSKY MA, PHILLIPS SM (2011) Increased  
consumption of dairy foods and protein during diet- and exercise-induced weight

694 loss promotes fat mass loss and lean mass gain in overweight and obese  
695 premenopausal women. *J Nutri* 141(9):1626-34.

696 KAILASAPATHY K, CHIN J (2000) Survival and therapeutic potential of probiotic  
697 organisms with reference to *L Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.  
698 *Immunol Cell Biol* 78 (1), 80–88.

699 LAYMAN DK, EVANS E, BAUN JI, SEYLER J, ERICKSON DJ, BOILEAU RA (2005)  
700 Dietary protein and exercise have additive effects on body composition during  
701 weight loss in adult women. *J Nutrition* 135: 1903-10.

702 MAGALHÃES RM (2014) A cadeia produtiva da amêndoa do baru (*Dipteryx alata*  
703 Vog.) no cerrado: uma análise da sustentabilidade da sua exploração. *Ciência*  
704 *Florestal*, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 665-676.

705 MIGUEL MGCP, COLLELA CF, ALMEIDA EG, DIAS DR, SCHWAN RF (2015)  
706 Physicochemical and microbiological description of Caxiri – a cassava and corn  
707 alcoholic beverage. *Int J Food Sci Technol* 50, 2537-2544.

708 MIGUEL PR, MARMITT T, SCHLABITZ C, HAUSCHILD FAD, SOUZA CFV (2010)  
709 Desenvolvimento e caracterização de “iogurte” de soja sabor morango produzido  
710 com extrato de soja desengordurado enriquecido com cálcio. *Alimentos e Nutrição*,  
711 Araraquara v. 21, n. 1, p. 57-63.

712

713 OUWEHAND AC, SALMINEN SJ (1998) The health effects of cultured milk products  
714 with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J* 8 (9), 749–758.

715 PATEL A, FALCK P, SHAH N, IMMERZEEL P, ADLERCREUTZ P, STÅLBRAND H  
716 (2013) Evidence for xylo oligosaccharide utilization in *Weissella* strains isolated from  
717 Indian fermented foods and vegetables. *FEMS Microbiol* 346, 20–28.  
718 doi:10.1111/1574-6968.12191

719 PRADO FC, LINDNER JDD, INABA J, THOMAZ-SOCCOL V, BRAR SK, SOCCOL  
720 CR (2015) Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with  
721 potential health benefits. *J Funct Foods* 12, 489–497.

722

723 PRETTI T, CARVALHO MRB (2012) Tecnologia para produção de extrato aquoso  
724 de amendoim. *Alimento e Nutrição*, Araraquara, v. 23, n. 1, p. 39-44.

725 RATHORE S, SALMERÓN I, PANDIELLA SS (2012) Production of potentially  
726 probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic  
727 acid bacteria cultures. *Int J Food Microbiol* 30 (1), 239–244.

728 ROBERFROID, M (2002) Functional food concept and its application to prebiotics.  
729 *Digestive and Liver Disease*. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10.

730 SANTOS CCAA, LIBECK BS, SCHWAN RF (2014) Co-culture fermentation of  
731 peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. *Int J Food*  
732 *Microbiol.* 186, 32–41.

733 SIQUEIRA APS. et al. (2015) Nutritional quality and bioactive compounds of partially  
734 defatted baru almond flour. *Food Sci Technol* v.35, p.127-132, 2015.

735  
736 SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (2007). IV Diretriz Brasileira sobre  
737 dislipidemia e prevenção de aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia v.  
738 88 (Suplemento 1).

739 TRIPATHI MK, GIRI SK (2014) Probiotic functional foods: Survival of probiotics  
740 during processing and storage. J Funct Foods v. 9, p. 225–241.

741 THAMER KG, PENNA ALB (2006) Caracterização de bebidas lácteas funcionais  
742 fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. Ciência e Tecnologia de  
743 Alimentos. Campinas, v.26, n.3, p.589-595.

744  
745 VERDE CAMPO. (2018). Produtos- iogurte Morango lacfree. Disponível em:  
746 <http://www.verdecampo.com.br/produtos/iogurte-morango-lacfree-170g/>. Acesso  
747 em 10 de agosto de 2018

748  
749 VERA R, SOARES JUNIOR MS, NAVES R V, SOUZA ERB, FERNANDES EP,  
750 CALIARI M, LEANDRO WM (2009) Características químicas de amêndoas de  
751 barueiros (*Dipteryx alata* Vog.) de ocorrência natural no Cerrado do estado de  
752 Goiás, Brasil. Rev Bras Fruti v.31, p.112-118.

753 VITALI B, MINERVINI G, RIZZELLO CG, SPISNI E, MACCAFERRI S, BRIGIDI P  
754 (2012). Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and  
755 vegetables. Int J Food Microbiol 31,116–125.doi:10.1016/j.fm.2011.12.027

756  
757 YANG J, JI, Y, PARK H, LEE J, PARK S, YEO S (2014) Selection of functional lactic  
758 acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum*  
759 *Rottlerex Sprengel*). Int J Food Microbiol 191C 164–171  
760 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.016

761  
762 WANG YC, YU RC, CHOU CC (2002) Growth and survival of bifidobacteria and  
763 lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks.  
764 Int J Food Microbiol 19, 501–508.

765  
766 WILDMAN R, KELLEY M (2007) Nutraceuticals and functional foods. Boca Raton:  
767 Taylor & Francis group, LLC.

768  
769 WISKER E, FELDHEIM W (1990) Carbohydrate and fiber metabolizable energy of  
770 diets low or high in dietary fiber from fruits and vegetables when consumed by  
771 humans. J Nutr 120, 1331e1337.

772  
773 ZENEBON O, PASCUET NS, TIGLEA P (2008) Métodos Físico-Químicos para  
774 Análise de Alimentos. 4 ed. 1 ed. digital, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020.  
775  
776  
  
777  
778  
779



780  
781  
782  
783  
784  
785  
786  
787  
788  
789  
790  
791  
792  
793  
794  
795  
796  
797  
798  
799  
800  
801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819

## Apêndice A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa **“Desenvolvimento de uma bebida fermentada potencialmente probiótica utilizando o extrato da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vogel) como substrato”**. Neste estudo pretendemos elaborar uma bebida fermentada, potencialmente probiótica, utilizando como matéria prima principal o extrato da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel).

O motivo que nos leva a estudar é que, mesmo com muitos trabalhos científicos citados na literatura referentes a amêndoa do baru, não há relatos a respeito do seu uso na elaboração de alimentos fermentados. Portanto, o desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir do extrato da amêndoa de baru, pode oferecer um produto com características nutricionais e sensoriais adequadas, valorizar a matéria prima regional, e aumentar assim, a oferta e a opção de produtos proteicos de origem vegetal.

Para este estudo adotaremos os seguintes procedimentos: As amêndoas de baru já higienizadas, serão homogeneizadas com água fervente por 5 minutos em liquidificador e o extrato resultante será filtrado. Após a filtração será realizado o processo de pasteurização em garrafas de vidro esterilizadas, e o mesmo será refrigerado e armazenado sob refrigeração. Três isolados de bactérias lácticas serão testados para a fermentação do leite de baru. As bebidas serão testadas em laboratório quanto ao seu valor nutricional, físico-químico e microbiológico. Serão adicionados polpa de morango ou baunilha e açúcar para a análise sensorial.

Para participar deste estudo você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Você será esclarecido (a) sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar. Poderá retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que é atendido pelo pesquisador. O pesquisador irá tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Como voluntário deste estudo, é necessário a participação do teste de aceitação do extrato hidrossolúvel da castanha de baru e informar o quanto gostou ou desgostou do produto, utilizando uma ficha apropriada. Precisarás comparecer ao laboratório de análise sensorial da UFGD para a realização do teste de aceitação do produto;

Antes de iniciar a análise sensorial, você receberá uma descrição detalhada de todos os componentes presentes na formulação da bebida, e se identificar alguma alergia previamente conhecida à algum deles, você deverá não participara da análise. Os riscos ou desconfortos aos quais estará submetido ao participar dessa pesquisa serão mínimos, antes de iniciar a análise você será informado sobre todos os componentes presente na bebida, mas caso o extrato hidrossolúvel de amêndoa de baru provoque alguma reação alérgica inesperada ou desconforto, você deverá comunicar imediatamente o pesquisador responsável

para um possível encaminhamento a um pronto atendimento; Para que não ocorra contaminação das amostras na análise sensorial, tais amostras contendo extrato hidrossolúvel estarão em condições assépticas e serão oferecidas logo após o seu preparo. No entanto, caso ocorra qualquer despesa decorrente da participação na pesquisa, tais como transporte, alimentação entre outros, haverá ressarcimento pelos pesquisadores. Caso ocorra algum dano decorrente da sua participação no estudo, você será devidamente indenizado, conforme determina a lei.

A sua participação como voluntário na análise sensorial dos produtos terá duração de um dia (sessão única); Os resultados da pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão.

O (A) Sr (a) não será identificado em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador responsável, no laboratório de bioquímica da Universidade Federal da Grande Dourados, e a outra será fornecida a você.

Caso haja danos decorrentes dos riscos previstos, o pesquisador assumirá a responsabilidade pelos mesmos.

Eu, \_\_\_\_\_, portador do documento de Identidade \_\_\_\_\_ fui informado (a) dos objetivos do estudo “Desenvolvimento de uma bebida fermentada potencialmente probiótica utilizando o extrato da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vogel) como substrato”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada à oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Dourados, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

Assinatura do Voluntário: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (CEP), da Fundação Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD)

Endereço: Rua Melvin Jones, 940 - Jardim América, Dourados-MS. CEP: 7.9803-010

E-mail: cep@ufgd.edu.br

Telefone: (67) 3410-2853

## Apêndice B

### Ficha de análise sensorial – Teste de aceitação

---

#### Ficha – Teste de aceitação

---

**Nome:** \_\_\_\_\_

**Idade:** \_\_\_\_\_ **Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Você está recebendo uma amostra de uma bebida probiótica de amêndoa de Baru saborizada. Por favor, prove a amostra e avalie de um modo geral, o quanto você gostou ou desgostou, utilizando a escala abaixo para pontuar os atributos.

9 - Gostei muitíssimo

**AMOSTRA Nº:** \_\_\_\_\_

8 - Gostei muito

7 - Gostei moderadamente

**APARÊNCIA**

6 - Gostei ligeiramente

**COR**

5 - Nem gostei/nem desgostei

**AROMA**

4 - Desgostei ligeiramente

**SABOR**

3 - Desgostei moderadamente

**TEXTURA**

2 - Desgostei muito

**DOÇURA**

1 - Desgostei muitíssimo

**AVALIAÇÃO GLOBAL**

Cite o atributo que mais gostou na amostra:

\_\_\_\_\_

Cite o atributo que menos gostou na amostra:

\_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_

---

\_\_\_\_\_

## Anexo A

Continuação do Parecer: 2.563.404

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Desenvolvimento de uma bebida fermentada potencialmente probiótica utilizando o extrato da amêndoa de baru (*Dipteryx alata* Vogel) como substrato

**Pesquisador:** LUDMILA VILELA REZENDE

#### Área Temática:

**Versão:** 2

**CAAE:** 80669917.3.0000.5160

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais

**Patrocinador Principal:** Fundação Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD-MS

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.563.404

#### Apresentação do Projeto:

"Determinados alimentos, principalmente os probióticos, destacam-se pela capacidade de prevenir algumas doenças, além de exercerem um efeito benéfico sobre a microbiota intestinal após o seu consumo. As bebidas fermentadas são produtos que auxiliam na inserção de probióticos na dieta humana, e já foi confirmado por muitos estudos, que os produtos lácteos são os melhores substratos para o fornecimento de probióticos. Porém em decorrência de alguns inconvenientes relacionados a ingestão de produtos lácteos, como por exemplo, intolerância a lactose, teor de colesterol, alergias a proteínas do leite e o desejo por alternativas vegetarianas, houve uma crescente procura de produtos porbióticos não lácteos obtidos pela fermentação de cereais, frutas e vegetais. O baru é uma espécie vegetal pertencente à família Leguminosae (Fabaceae) com ocorrência ampla no cerrado e que vem se ndo explorado economicamente devido a suas qualidades nutricionais. Sua amêndoa pode ser considerada um ótimo substrato para a obtenção de leite vegetal, capaz de substituir o leite de origem animal, devido á importantes propriedades farmacológicas e nutricionais, além de seu baixo custo de produção. Elas são ricas em gorduras, proteínas, fitatos e fenólicos, são fonte de vitamina E, magnésiomanganês, cobre, fosforo, fibra, riboflavina, ácidos graxos monoinsaturados e

Continuação do Parecer: 2.563.404

proteínas. Diante do exposto, o desenvolvimento de uma bebida fermentada, potencialmente probiótica, a partir do extrato da amêndoa do baru, fruto nativo do cerrado, possibilitará uma maior opção de produtos proteicos de origem vegetal, além de valorizar a matéria prima regional, dando uma nova alternativa de uso e possibilitando à comunidade local a elaboração de uma nova bebida funcional."

## Objetivo da Pesquisa:

"Objetivo Geral

Elaborar uma bebida fermentada, potencialmente probiótica, utilizando como matéria prima principal o extrato da amêndoa de Baru (*Dipteryx alata* Vogel).

Objetivos Específicos

Padronizar o processo de produção do leite de castanha de baru;

Comparar a bebida produzida a partir da fermentação por uma cepa comercial com bactérias lácticas pertencentes a coleção de microrganismos do laboratório de bioquímica da UFGD.

Estudar o processo fermentativo por bactérias lácticas durante a produção de bebida fermentada a partir de leite da castanha de baru;

Analisar a aceitabilidade da bebida gerada através de análises sensoriais"

## Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos:

O laboratório de análise sensorial conta com todas as condições higiênicas necessárias para o preparo e distribuição de alimentos para o consumo.

O alimento será servido dentro do prazo de validade. Somente participarão da análise sensorial aqueles indivíduos que desejarem voluntariamente participar da pesquisa. Dessa forma, os riscos serão mínimos para a execução deste trabalho.

Benefícios:

O projeto poderá gerar benefícios para valorização das tradições da cultura centro-oeste, bem como, o desenvolvimento de uma bebida com alto teor nutricional e um produto final com maior qualidade."

## Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta-se adequado às normas do CONEP.

## Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatórias foram apresentados conforme solicitados nas regulamentações vigentes.

Continuação do Parecer: 2.563.404

### Recomendações:

Sem recomendações.

### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclui-se pela APROVAÇÃO do referido protocolo de pesquisa, a pesquisadora cumpriu com os que foi solicitado no parecer anterior emitido por este CEP.

### Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Versao_corrigida.pdf	26/03/2018 10:32:07	Leonardo Ribeiro Martins	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1037435.pdf	15/02/2018 11:02:42		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Formulario_de_Projeto_de_Pesquisa_CORRETO.pdf	15/02/2018 11:02:07	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Parecer Anterior	Formulario_para_responder_a_um_parecer.pdf	15/02/2018 11:00:51	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto2.pdf	01/12/2017 14:09:13	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	30/11/2017 17:07:59	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	30/11/2017 17:06:35	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Outros	Ficha_de_analise_sensorial.docx	30/11/2017 17:01:51	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Outros	Declaracao_de_compromisso.jpg	22/11/2017 17:30:01	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Outros	Infraestrutura_necessaria.jpg	22/11/2017 17:28:13	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Outros	Resolucaocorreta.pdf	22/11/2017 17:26:02	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
Outros	termodecompromisso.jpg	22/11/2017 17:11:04	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência		TCLE.pdf	22/11/2017 17:00:11	LUDMILA VILELA REZENDE	Aceito
---	--	----------	------------------------	------------------------	--------

Continuação do Parecer: 2.563.404

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

DOURADOS, 26 de Março de 2018

---

**Assinado por:**

**Leonardo  
Ribeiro  
Martins  
(Coordenador)**