

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR SABORIZADO
COM POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)**

Juan Carlos Roberto Saavedra More
Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

GOIÂNIA

2019



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: **Juan Carlos Roberto Saavedra More**

Título do trabalho: **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR SABORIZADO COM POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)**

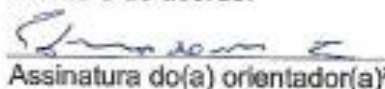
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Prof. Edmar Soares Nicolau
Coordenador
Centro de Pesquisa em Alimentos EAT/UFG

Data: 23 / 09 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

JUAN CARLOS ROBERTO SAAVEDRA MORE

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR SABORIZADO
COM POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de
Goiás

Área de concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos

Orientador:

Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau - EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Clarice Gebara - EVZ/UFG

Profa. Dra. Rosângela Vera - EA/UFG

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Saavedra More, Juan Carlos Roberto
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO KEFIR SABORIZADO COM
POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*) [manuscrito] / Juan
Carlos Roberto Saavedra More. - 2019.
xv, 88 f.

Orientador: Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau; co-orientadora Dra.
Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenorio; co-orientador Dr.
Rosângela Vera.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui fotografias, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Alimento funcional. 2. Leite fermentado. 3. Bactérias ácido
láticas. 4. Probiótico. 5. Fruto do cerrado. I. Soares Nicolau, Edmar,
orient. II. Título.

CDU 664

- 1 ATA NÚMERO 510 DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE
2 PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
3 DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Às 08h00min do dia 28/02/2019, reuniu-se na Sala
4 de Defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e
5 Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a
6 Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Dissertação de
7 Mestrado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Juan Carlos Roberto Saavedra More**,
8 intitulada: "**Produção e caracterização do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia***
9 ***dysenterica*)**", apresentado para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, junto à Área de
10 Concentração: **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos**, desta Universidade. O (A)
11 Presidente da Comissão Julgadora, **Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau**, iniciando os trabalhos,
12 concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Juan Carlos Roberto Saavedra More** para exposição em
13 **quarenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o (a) senhor (a) Presidente concedeu a palavra, pela
14 ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o
15 prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores
16 Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em
17 sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou**
18 **Reprovado (a):**
- 19 Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau APROVADO
- 20 Prof.ª Dr.ª Karyne Oliveira Coelho Aprovado
- 21 Prof. Dr. Moacir Evandro Lage APROVADO
- 22 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o(a) candidato(a) **Juan Carlos**
23 **Roberto Saavedra More**, HABILITADO [(Habilitado(a) ou não
24 **Habilitado(a)**] pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):
25 _____
26 _____
27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____
33 _____

34

35

36 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da dissertação:

37

38

39

40

41

42

43 Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau**, lavrei a presente ata que, após
44 lida e achada conforme, foi por todos assinada.

45 Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau

46 Prof.^a Dr.^a Karyne Oliveira Coelho

47 Prof. Dr. Moacir Evandro Lage

Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal line. The first signature is 'Edmar Soares Nicolau', the second is 'Karyne Oliveira Coelho', and the third is 'Moacir E. Lage'.

Dedico aos meus pais
Gregorio e Carmen Elena
E à minha esposa
Thamara

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ser a luz que ilumina meu caminho, colocando sempre pessoas de valor em minha vida.

À minha eterna companheira Thamara por ser a principal motivação da minha vida e inspiração deste trabalho.

Ao meu pai Gregorio por sempre ter colocado a minha educação em primeiro lugar e me ter feito uma pessoa de bem.

À minha mãe Carmen pelo carinho e exemplo de dedicação.

À minha irmã Claudia que mesmo distante sempre se lembra de mim.

Aos meus sogros e pais brasileiros Saulo e Maura por estarem presentes e apoiando em todos os momentos.

Ao professor Edmar Soares, pelo apoio e oportunidade concedidos.

À professora Clarice Gebara pelas orientações e pelo voto de confiança, espero não ter decepcionado.

À professora Rosângela Vera pelo incentivo, por abrir meu interesse pelos frutos do cerrado e pela amizade.

À professora Karyne Oliveira, pela orientação e prestatividade de sempre.

Aos professores do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia: Cíntia Minafra, Moacir Evandro, Cristiano Sales, Iolanda Nunes e Nonato de Oliveira.

Ao pessoal do Setor Administrativo e Financeiro: Bianca, Hudson e José Carlos.

Ao pessoal do Laboratório de Físico-química: Letícia, Luana, Wenderson, Cristyene, Daiana e em especial ao gerente Marcos por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia especialmente Dona Neuzinha, Dona Sandra e Lorena.

Aos meus colegas do Laboratório de Qualidade do Leite, em especial à gerente Silmara Dâmaso, pela ajuda e compreensão nos meus horários.

À Renata Costa e ao uruguaio Franco pela cooperação na realização das análises e pela amizade.

À Renata Pfrimer, muito obrigado pela parceria.

À Dona Ivete, Sr. Antônio, Dona Neide, João Pedro e Rodolfo, muito obrigado pela estima.

À Christian Hansen Brasil na pessoa de Lúcio Forti Antunes pela doação das culturas e orientações.

Meu muito obrigado a todos que contribuíram para o meu crescimento como pessoa. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes".

Marthin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Breve histórico do kefir.....	3
2.2. Os Grãos de kefir	3
2.3. Composição microbiana dos grãos e da bebida kefir	5
2.4. Diversidade microbiológica dos grãos e da bebida kefir	6
2.5. Distribuição dos microrganismos nos grãos de kefir	7
2.6. Interações entre os microrganismos do Kefir.....	7
2.7. Composição química do kefir	8
2.8. Preservação dos grãos de kefir.....	9
2.9. Produção do kefir	9
2.9.1. Produção de kefir pelo método Tradicional	9
2.9.2. Produção de kefir pelo método Russo.....	11
2.9.3. Produção do kefir por métodos industriais.....	12
2.9.4 Bactérias incorporadas nas culturas iniciadoras de kefir	15
2.10. Benefícios do kefir	19
2.10.1 Impacto do Kefir na microbiota intestinal	19
2.10.2. Propriedades antimicrobianas do Kefir.....	20
2.10.3. Atividade anticarcinogênica do Kefir	22
2.10.4. Atividade da β - galactosidase do Kefir	24
2.10.5. Efeito hipocolesterolêmico do Kefir	25
2.11. Saborização do kefir com cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	26
2.11.1. Propriedades funcionais da cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>).....	28
3. OBJETIVOS	31
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Matérias-primas	32
4.2. Fracionamento das culturas iniciadoras	32

4.3	Formulação de Kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	33
4.4	Fluxograma de fabricação do Kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>) .	34
4.5	Caracterização físico-química e microbiológica das matérias-primas (polpa de cagaita pasteurizada e leite UHT) e do kefir	35
4.5.1	Caracterização físico-química.....	36
4.5.2	Caracterização microbiológica.....	38
4.6	Análise colorimétrica do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	38
4.7	Avaliação reológica de kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	39
4.8	Avaliação sensorial do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	39
4.9	Análise estatística.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Caracterização físico-química das matérias-primas.....	41
5.2	Caracterização microbiológica das matérias-primas.....	43
5.3	Curva de fermentação do kefir.....	45
5.4	Caracterização físico-química do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	46
5.5	Caracterização microbiológica do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	49
5.6	Vida de prateleira do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	49
5.7	Caracterização reológica do kefir saborizado com polpa de cagaita	57
5.8	Caracterização da cor do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	60
5.9	Análise sensorial do kefir saborizado com polpa de cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>)	60
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO I	78
	ANEXO II.....	84
	ANEXO III.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações de açúcar e polpa das formulações de kefir saborizado com polpa de cagaita.	34
Tabela 2 - Caracterização físico-química do leite UHT (médias \pm desvio padrão, n=3).	41
Tabela 3 - Caracterização físico-química da polpa de cagaita pasteurizada (médias \pm desvio padrão, n=3).	42
Tabela 4 - Análise de coliformes a 35°C e a 45°C e Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. das matérias-primas leite UHT e polpa de cagaita (n=2).	44
Tabela 5 - Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e contagem de bolores e leveduras das matérias-primas leite UHT e polpa de cagaita (médias \pm desvio padrão, n=2).	44
Tabela 6 - Caracterização físico-química do kefir saborizado com polpa de cagaita no dia 1 (médias \pm desvio padrão, n=3).	47
Tabela 7 - Análise de coliformes a 35°C e a 45°C, pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. e contagem de bolores e leveduras de kefir no dia de fabricação (médias \pm desvio padrão, n=2).	49
Tabela 8 - Valores de pH das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira (médias \pm desvio padrão, n=3).	51
Tabela 9 - Valores de acidez (% ácido láctico) das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira (médias \pm desvio padrão, n=3).	53
Tabela 10 - Contagem de bactérias lácticas viáveis (\log_{10} UFC/ml) em kefir saborizado com polpa de cagaita, ao longo de oito semanas de armazenamento refrigerado (médias \pm desvio padrão, n=2).	55
Tabela 11 - Análise colorimétrica do kefir saborizado ou não com polpa de cagaita.	60
Tabela 12 - Valores médios e desvios dos atributos de aceitação e intenção de compra das amostras do kefir saborizado com polpa de cagaita (médias \pm desvio padrão, n=125).	62
Tabela 13 - Coeficientes de correlação de Pearson e níveis de significância para as variáveis cor e valores de L*, a* e b*, das amostras do kefir saborizado com polpa de cagaita.	63
Tabela 14 - Coeficientes de correlação de Pearson e níveis de significância para os atributos sensoriais das amostras do kefir saborizado com polpa de cagaita (p<0,01).	63
Tabela 15 - Índice de aceitabilidade do kefir saborizado com polpa de cagaita.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grão de Kefir, adaptado de Garofalo et al. ¹⁵	4
Figura 2 - Produção de kefir pelo método tradicional. (1) Grãos de Kefir. (2) Inoculação dos grãos ao leite a temperatura ambiente. (3) Multiplicação e crescimento dos grãos. (4) Separação dos grãos. Adaptado de Schwan et al. ⁵⁷	10
Figura 3 - Produção de kefir pelo método russo, utilizando cultura mãe. Adaptado de Rattray et al. ¹	12
Figura 4 - Produção de kefir pelo método industrial com culturas iniciadoras. Adaptado de Otles et al. ⁵⁵	13
Figura 5 - Produção de kefir pelo método industrial com fermentação simultânea por bactérias e leveduras. Adaptado de Beshkova et al. ³¹	14
Figura 6 - Produção de kefir pelo método industrial por culturas consecutivas de bactérias e leveduras. Adaptado de Beshkova et al. ³¹	15
Figura 7 - Ilustração da cagaita (<i>Eugenia dysenterica</i>), fonte Cardoso et al. ⁹⁵	27
Figura 8 - Grânulos da cultura eXact® KEFIR 12 imediatamente antes da diluição em leite esterilizado.	33
Figura 9 - Fluxograma de produção do kefir saborizado com polpa de cagaita.....	35
Figura 10 - Curva de fermentação do kefir incubado a 30°C.....	45
Figura 11 - Valores de pH das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira.....	50
Figura 12 - Valores de acidez (% ácido láctico) das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira.	52
Figura 13 - Relação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento do kefir.....	59
Figura 14 - Relação entre viscosidade aparente e taxa de cisalhamento do kefir.	59

RESUMO

O Kefir é considerado uma bebida com muitos benefícios à saúde e possivelmente é um dos produtos alimentícios probióticos mais antigos. Objetivou-se desenvolver diferentes formulações de kefir saborizado com polpa de cagaita, *Eugenia dysenterica*, avaliando suas características físico-químicas, microbiológicas, reológicas, colorimétricas, vida de prateleira e aceitação sensorial. Foram elaboradas nove formulações com diferentes concentrações de açúcar e polpa de cagaita. As formulações foram fermentadas com as culturas iniciadoras eXact® KEFIR 12 e YoFlex® Harmony 1.0, totalizando 14 bactérias. As análises físico-químicas realizadas para a matéria-prima e para as formulações foram: pH, acidez, teor de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos e valor energético total. As análises microbiológicas realizadas nas formulações, foram: Número Mais Provável de coliformes a 35 °C, Número Mais Provável de coliformes a 45°C e pesquisa de *Salmonella* sp. Nas formulações foram realizadas, semanalmente, análise de acidez e contagem de bactérias ácido lácticas para determinar a vida de prateleira. A análise de variância e o teste de *Tukey* foram utilizados para a análise estatística dos dados. O kefir apresentou características físico-químicas de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação. As formulações de kefir apresentaram vida de prateleira de oito semanas sob refrigeração a 5°C, mantendo as contagens de bactérias ácido lácticas acima de 10⁷ UFC/g e a acidez abaixo de 1g de ácido láctico/100g. Com exceção de duas formulações que não continham açúcar em sua composição, as demais formulações de kefir tiveram boa aceitação na análise sensorial, com notas entre “gostei ligeiramente” e “gostei extremamente” para os atributos aparência, cor, aroma, sabor, consistência e impressão global. As formulações que tiveram maiores notas para os atributos sabor e impressão global foram as que continham 10% de açúcar e 0% ou 10% de polpa de cagaita, e também foram as que tiveram maiores notas para a intenção de compra, com notas que na ficha de avaliação sensorial correspondia a “eu provavelmente compraria”. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o kefir pode ser produzido industrialmente utilizando culturas iniciadoras e apresentar longa vida de prateleira e boa aceitação pelo consumidor brasileiro, o que o confirma como um produto lácteo promissor.

Palavras-chave: alimento funcional, bactérias ácido lácticas, leite fermentado, probiótico, fruto do cerrado.

ABSTRACT

Kefir is considered a beverage with many health benefits and is possibly one of the oldest probiotic food products. The objective was to develop different formulations of kefir flavored with cajita pulp, *Eugenia dysenterica*, evaluating its physico-chemical, microbiological, rheological, colorimetric, shelf life and sensorial acceptance characteristics. Nine formulations with different concentrations of sugar and cajita pulp were prepared. The formulations were fermented with the eXact® KEFIR 12 and YoFlex® Harmony 1.0 starter cultures, totaling 14 bacteria. The physico-chemical analyzes carried out for the raw material and for the formulations were: pH, acidity, moisture content, ashes, proteins, lipids, carbohydrates and total energetic value. Microbiological analyzes carried out in the formulations were: Most Likely Number of Coliforms at 35 ° C, Most Likely Number of Coliforms at 45 ° C and *Salmonella* sp. In the formulations were carried out, weekly, acidity analysis and lactic acid bacteria count to determine the shelf life. The analysis of variance and the Tukey test were used for the statistical analysis of the data. Kefir presented physico-chemical characteristics according to the standards established by the legislation. Kefir formulations showed shelf life of eight weeks under refrigeration at 5 ° C, keeping lactic acid bacteria counts above 10⁷ CFU / g and acidity below 1g lactic acid / 100g. With the exception of two formulations that did not contain sugar in their composition, the other formulations of kefir were well accepted in the sensory analysis, with notes between "slightly liked" and "extremely liked" attributes for appearance, color, aroma, flavor, consistency and overall impression. The formulations that had the highest grades for the flavor and overall impression attributes were those containing 10% sugar and 0% or 10% cashew pulp, and also those that had the highest grades for the purchase intent, with notes that Sensory evaluation form corresponded to "I would probably buy". The results obtained in the present work indicate that kefir can be produced industrially using starter cultures and present a long shelf life and good acceptance by the Brazilian consumer, which confirms it as a promising dairy product.

Keywords: functional food, fermented milk, lactic acid bacteria, probiotic, cerrado fruit.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos fermentados acidificados através do crescimento de bactérias ácido lácticas, como *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. e *Streptococcus thermophilus*, têm sido produzidos há muitos séculos e seu consumo atualmente é expressivo em diversos países. Os principais produtos de leite fermentado são iogurte, kefir, kumis e coalhada¹.

No Brasil, de acordo a Instrução Normativa nº 46 de 2007, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, que estabelece o Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, entende-se por Leites Fermentados “os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos; estes devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade”².

O kefir é um produto de leite fermentado originário da região do Cáucaso, na Europa. Tradicionalmente o kefir era produzido pela inoculação de grãos de kefir no leite de vaca ou cabra em recipientes de pele de animal, seguido de um período de fermentação de aproximadamente um dia à temperatura ambiente. Hoje o kefir é produzido em todo o mundo, sendo mais popular na Europa Oriental, onde geralmente é elaborado a partir de leite de vaca¹.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (WHO/FAO), os grãos de Kefir são constituídos por bactérias dos gêneros *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp. e *Acetobacter* sp., leveduras fermentadoras de lactose, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis* e *Torula kefir*, e leveduras não fermentadoras de lactose, como *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*. Estes micro-organismos são responsáveis pela fermentação ácido láctica, ácido acético e alcoólica do leite, produzindo um leite fermentado com propriedades únicas¹.

O leite fermentado com grãos de kefir resulta em um produto com baixo teor de lactose e uma grande variedade de compostos bioativos diferentes, como ácidos orgânicos, láctico, acético, butírico e propiônico, CO₂, H₂O₂, etanol, peptídeos bioativos, exopolissacarídeos e bacteriocinas. Estes compostos podem atuar independentemente ou em conjunto para produzir os benefícios à saúde atribuídos ao consumo do kefir⁴.

O kefir é uma fonte provável de probióticos de interesse, tal fato coloca este produto como potencial funcional. Segundo a Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das suas funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde humana⁵.

Os benefícios à saúde associados ao consumo do kefir incluem atividade antitumoral e anticarcinogênica, auxílio na má digestão da lactose, síntese de vitaminas do complexo B, efeitos anti-inflamatórios, modulação do sistema imunológico e efeitos hipocolesterolêmicos. No entanto, deve-se levar em conta que há considerável variação nas preparações de kefir usadas nos estudos científicos. A variabilidade microbiana, principalmente, quando se utiliza grãos de kefir, e as diferenças nas condições de produção resultam em produtos finais com diferentes perfis microbianos e componentes bioativos¹.

Atualmente existe maior interesse e preocupação com a saúde por parte da população procurando alimentos mais saudáveis que proporcionem melhor qualidade de vida, sendo o kefir uma excelente opção. No Brasil, o consumo do kefir vem crescendo. Apesar de já existir a produção industrial, ainda que regional, na maioria das vezes os grãos de kefir são doados e a produção ocorre de maneira artesanal nas residências, para consumo próprio, sem haver, portanto, uma padronização na elaboração do kefir e condições higiênicas de manipulação.

O uso de culturas comerciais simplifica a produção comercial de kefir e com uma seleção cuidadosa das espécies bacterianas, é possível produzir um produto que tenha um sabor característico de kefir e boa conservação. Por isso, é interessante que seja feita a padronização da produção do kefir de modo que a sua elaboração esteja de acordo com a legislação, e também a divulgação e incentivo do seu consumo, pois se trata de uma bebida com muitos benefícios à saúde. Além disso, é possível melhorar as características sensoriais do kefir por meio da adição de aromas e sabores de frutos regionais do cerrado, como a cagaita, o que agrega valor ao produto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Breve histórico do kefir

A origem do vocábulo kefir vem da língua turca *keyif*, que significa "bom sentimento", devido à boa sensação que o consumidor sente após bebê-lo⁶. Muitos pesquisadores relatam que o kefir é uma bebida originária das montanhas do Cáucaso, há cerca de 2.000 anos. As tribos muçulmanas desta região acreditavam que os grãos de kefir eram um presente de Alá⁷. Possivelmente, os grãos de kefir surgiram a partir da fermentação do leite de cabra ou vaca em bolsas confeccionadas com peles de animais. O leite fermentado era removido para o consumo e um novo leite era adicionado aos resíduos que ficavam dentro da bolsa. Ao longo do tempo diferentes micro-organismos se acumularam e foram se incorporando a um material composto por proteínas e polissacarídeos, formando assim o grão⁸.

O kefir pode ter surgido em diferentes lugares. Foram encontrados vestígios de kefir em tumbas no cemitério de Xiaohe, China, evidenciando a utilização do kefir há aproximadamente 3.800 anos pelas tribos locais. O kefir era uma alternativa ao consumo do leite, já que estas tribos apresentavam intolerância à lactose. Desse modo, o kefir de leite fez parte da cultura nutricional tibetana e após muito tempo tornou-se conhecido pelos europeus como “cogumelo tibetano”, pelo seu formato⁹.

2.2. Os Grãos de kefir

Os grãos de kefir têm um formato semelhante à couve-flor, apresentando uma textura viscosa e estruturalmente forte, multi-lobular e irregular (Figura 1). A coloração varia do branco ao branco amarelado e o tamanho varia de 0,3 a 3 cm de diâmetro. Os grãos de kefir são compostos por uma matriz de polissacarídeos, o kefiran, e proteína, densamente povoada por bactérias ácido-láticas, ácido-acéticas e leveduras¹⁰⁻¹⁴.



Figura 1 - Grão de Kefir, adaptado de Garofalo et al¹⁵.

Pesquisadores afirmam que novos grãos de kefir só podem ser obtidos pela multiplicação dos grãos já existentes. No entanto, faltam informações científicas sobre como os primeiros grãos de kefir surgiram¹¹⁻¹⁶. Motaghi et al.¹⁷ produziram grãos semelhantes ao kefir utilizando saco de pele de cabra com leite pasteurizado adicionado de flora intestinal de ovelha. O saco contendo a mistura foi incubado a 24-26°C durante dois dias, sendo homogeneizado a cada hora. Após aproximadamente 75% do leite ter coagulado, o conteúdo coagulado foi trocado por leite fresco. Este processo foi repetido durante 12 semanas e ao final notaram que uma camada de polissacarídeo se formou na superfície interna do saco. Quando esta camada foi removida e adicionada ao leite, formaram-se grãos de 0,5-3,2 cm de diâmetro, muito semelhantes aos grãos de Kefir tradicionais. Alguns micro-organismos isolados foram similares aos achados nos grãos de kefir tradicionais.

A combinação de diferentes fatores influencia no aumento da biomassa dos grãos de kefir, destacando: a renovação do leite em intervalos regulares, a temperatura de cultivo, a lavagem dos grãos e a presença de nutrientes essenciais nas concentrações corretas no meio de crescimento¹⁸.

O kefiran é responsável por unir os micro-organismos à matriz proteica nos grãos de kefir¹⁹. Sua estrutura está formada por quantidades aproximadamente iguais de D-Glicose e D-Galactose (glucogalactano)²⁰. O Kefiran é o principal polissacarídeo solúvel em água produzido pelo *Lactobacillus kefirifaciens* e sua presença atribui maior viscosidade à

bebida²¹. Segundo Cheirsilp et al.²² a produção desse polissacarídeo é estimulada pela interação do *L. kefiranofaciens* com a levedura *S. cerevisiae*. Autores como Cheirsilp et al.²² e Badel et al.²³ destacam a proteção conferida aos micro-organismos contra a dessecação como a principal função do kefiran. O potencial das propriedades benéficas, tanto terapêuticas como antimicrobianas do kefiran tem sido reportado por vários autores.

2.3. Composição microbiana dos grãos e da bebida kefir

As bactérias ácido-lácticas compreendem 65 a 80% da população microbiana dos grãos de kefir, podendo ser homofermentativas ou heterofermentativas. Em geral, os grãos de kefir contêm *Lactobacillus* sp., *Lactococos* sp. e *Leuconostoc* sp.²⁶. As bactérias do ácido acético compreendem cerca de 20% da população microbiana dos grãos de kefir, estando presentes geralmente em contagens menores que 10^5 UFC/g¹³.

Gao et al.²⁶ analisaram a diversidade bacteriana de grãos de kefir tibetanos de diferentes áreas na China usando métodos metagenômicos e observaram que os grãos continham os gêneros *Lactococcus* (40,93-72,02%), *Lactobacillus* (10,50-47,89%), *Acetobacter* (4,50-14,15%), *Shewanella* (1,73-7,58%), *Leuconostoc* (0,64-0,84%), e em menores proporções os gêneros *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Acinetobacter*, *Pelomonas*, *Dysgonomonas* e *Weissella*.

As leveduras normalmente estão presentes em contagens menores que as bactérias ácido-lácticas (10^4 - 10^5 UFC/g), podendo ser fermentadoras ou não fermentadoras de lactose²⁷. Segundo Lu et al.²⁸ que analisaram grãos de kefir tibetanos, as três espécies dominantes de leveduras foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* e *Yarrowia lipolytica*. Segundo os autores, *S. cerevisiae* é a espécie de levedura dominante e estável, enquanto as populações de *Kluyveromyces* e *Yarrowia* estão sujeitas a alterações ao longo do tempo.

Leite et al.²⁹ avaliaram a diversidade microbiana de três tipos de kefir brasileiro por análise de PCR (Reação em cadeia da polimerase). *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefir* foram as principais espécies bacterianas encontradas nos grãos analisados. Além do gênero *Lactobacillus* spp., também foram observados os gêneros *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Streptococcus* spp. e *Acetobacter* spp. A população de leveduras foi dominada pela espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Em relação à composição microbiana da bebida kefir, segundo Ertekin e Guzel-Seydim³⁰ a maior população de bactérias ácido-lácticas na bebida kefir é composta por

lactobacilos (10^8 - 10^9 UFC/ml). Em contraste, Beshkova et al.³¹ encontraram mais lactococos (10^9 UFC/ml) do que lactobacilos (10^9 UFC/ml) na bebida kefir. Além disso, espécies de *Leuconostoc* spp. também são encontradas. As bactérias ácido-acéticas normalmente estão presentes em contagens entre 10^8 e 10^9 UFC/ml e as leveduras, fermentadoras e não fermentadoras de lactose, geralmente estão presentes em contagens de 10^4 - 10^5 UFC/ml³².

Magalhães et al.¹³ analisaram uma bebida kefir brasileira, onde foram isolados *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kazachstania aerobia*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Lachancea meyersii*.

2.4. Diversidade microbiológica dos grãos e da bebida kefir

Os grãos de Kefir possuem uma alta diversidade microbiológica^{12,33}. Sua composição microbiana pode variar em função do local de origem, tempo de fermentação, substrato utilizado para multiplicação dos grãos e métodos empregados na sua manipulação^{15,34,35}. Os grãos de kefir são compostos por três grupos de micro-organismos que coexistem em uma relação simbiótica. A diversidade desses micro-organismos inclui bactérias ácido-láticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras, coexistindo em um polissacarídeo natural (kefiran) e uma matriz proteica^{13,36-38}.

A característica microbiológica da bebida Kefir pode variar devido às características microbiológicas diversas dos grãos de kefir utilizados para sua fabricação. Variações no *flavor* e na textura podem ocorrer dependendo de como é realizado o processo de fermentação. Incubação a temperaturas mais elevadas (maiores que 30°C) favorece o crescimento de bactérias ácido-láticas termófilas em detrimento de leveduras e bactérias ácido-láticas mesófilas¹.

As características microbiológicas da bebida kefir não são iguais às dos grãos de kefir utilizados na sua elaboração. As condições no processo de fermentação, tais como temperatura, tempo de fermentação, agitação, tipo de leite, proporção grão/leite, entre outras, influenciam as características microbiológicas da bebida^{39,40}.

De acordo com Dobson et al.⁴¹ grandes diferenças foram observadas quando os grãos de kefir foram comparados com o leite fermentado produzido a partir destes mesmos grãos. A comunidade bacteriana associada ao grão de kefir foi composta em grande parte pela família *Lactobacillaceae*, enquanto na bebida kefir a família dominante foi a *Streptococcaceae*, principalmente *Lactococcus* spp.

O *Lactococcus lactis* é um dos micro-organismos predominantemente isolados na bebida kefir⁴². Entretanto, alguns pesquisadores não observaram cocos nas micrografias feitas com os grãos de kefir, possivelmente devido à débil ligação dos lactococcus aos grãos durante o desenvolvimento dos mesmos, facilitando sua liberação quando os grãos são lavados ou peneirados^{43,44}. Isso explica o motivo pelo qual observou-se maior contagem de lactococcus na bebida kefir. Outro motivo provavelmente seja o pH baixo no interior dos grãos pela ação dos lactobacilos o que impede o crescimento e sobrevivência dos lactococos neste meio⁴³.

2.5. Distribuição dos micro-organismos nos grãos de kefir

A distribuição dos micro-organismos nos grãos pode influenciar nas características microbiológicas da bebida kefir. Pesquisas foram feitas com microscopia eletrônica de varredura para analisar tanto a estrutura como a distribuição da microbiota nos grãos de kefir^{13,44}. Os micro-organismos da região externa são aqueles que provavelmente têm uma maior contribuição no processo de fermentação dos grãos de kefir. Por esse motivo diferenças entre as regiões internas e externas dos grãos têm papel relevante no produto final¹¹.

Há controvérsia quanto à distribuição dos micro-organismos nos grãos de kefir. Alguns pesquisadores descreveram que existe predominância de leveduras no interior dos grãos de kefir, bactérias e leveduras na região média e, principalmente, bactérias na superfície dos mesmos^{45,46}. No entanto, outros autores observaram que as leveduras estão disseminadas tanto na região interna quanto na superfície dos grãos, descrevendo a morfologia dos bastonetes (curtos, longos e curvos) como a principal diferença entre essas duas regiões^{13,44,47}. Por outro lado, de acordo com Guzel et al.⁴² ocorre o predomínio de bastonetes na região interna, sem qualquer evidência da presença de leveduras. Autores relataram uma menor quantidade de bactérias e leveduras na região interna, quando comparada com a região externa dos grãos^{13,44}. De acordo com Lu et al.²⁸ que analisaram grãos de kefir tibetanos, as leveduras se localizam na superfície externa dos grãos e crescem normalmente juntas para formar colônias embutidas na comunidade bacteriana.

2.6. Interações entre os micro-organismos do Kefir

As interações complexas entre bactérias e leveduras e sua dependência entre as mesmas nos grãos de kefir não estão completamente esclarecidas. Quando as bactérias são

separadas das leveduras, estas não crescem eficientemente nos grãos de kefir. Além disso, acredita-se que a produção de vitaminas pelas leveduras e *Acetobacter* spp. pode estimular o crescimento de bactérias ácido lácticas^{1,22}.

Os lactobacilos crescem mais rapidamente que as leveduras no kefir, metabolizando a lactose para produzir ácido láctico, propiciando assim um ambiente adequado para a proliferação das leveduras. As leveduras sintetizam as vitaminas do complexo B, hidrolisam as proteínas do leite, utilizando oxigênio para produzir CO₂ e etanol³⁹. A interação entre as bactérias ácido lácticas e as leveduras pode ser estimulada ou inibida pelo crescimento de uma ou ambas. Esses micro-organismos podem competir por nutrientes para o crescimento, ou podem produzir metabólitos que inibem ou estimulam uns aos outros¹⁶. Algumas espécies de leveduras como *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* assimilam o ácido láctico formado pelas bactérias ácido lácticas, elevando assim o pH e estimulando o crescimento adicional das mesmas¹.

2.7. Composição química do kefir

Os produtos principais formados por bactérias na produção da bebida kefir incluem ácido láctico, acetaldeído, diacetil, acetoína, acetona, etanol, CO₂ e ácido acético. As leveduras são as principais produtoras do etanol presente no kefir. O ácido láctico é um composto não volátil e inodoro responsável pela acidez característica dos produtos fermentados. Ele é o principal ácido produzido durante o processo de fermentação dos grãos de kefir e resulta da degradação da lactose pelas bactérias ácido-lácticas homofermentativas e heterofermentativas. O acetaldeído é responsável pelo aroma característico de "fruta fresca" dos iogurtes e é um dos principais compostos de aroma encontrado no kefir. O diacetil é responsável pelo aroma amanteigado dos produtos lácteos e também é considerado um composto de aroma importante do kefir. Por outro lado, a acetoína e a acetona desempenham papel pouco significativo nas características sensoriais do kefir. O ácido acético é um ácido graxo volátil de cadeia curta que dá um sabor semelhante ao vinagre, porém, esse sabor não é predominante no kefir^{12,48-50}.

Magalhães et al.¹³ analisaram a bebida kefir produzida com grãos de kefir brasileiro com 24 horas de fermentação. Foi observado que após 24 horas de fermentação o teor de proteína do kefir aumentou, enquanto os teores de gordura e lactose diminuíram. As porcentagens finais de proteína e gordura foram de 3,91% e 2,34%, respectivamente. A concentração de ácido láctico aumentou de 1,4 para 17,4 mg/ml, e a do ácido acético

aumentou de 2,1 para 2,73 mg/ml. A produção de etanol foi limitada, atingindo um valor final de 0,5 mg/ml.

Suriasih et al.⁵¹ investigaram as propriedades químicas do kefir preparado com leite bovino de Bali e grãos de kefir indonésios. Após um período de incubação de 24 horas os resultados das análises químicas das amostras de kefir foram de 5,68% de proteína, 4,67% de lactose, acidez titulável de 0,89 g de ácido láctico/100 g de kefir e pH 4,35.

Fontán et al.⁵² avaliaram as mudanças químicas durante a fabricação de kefir feito a partir de leite de vaca utilizando uma cultura iniciadora comercial. Durante as primeiras 24 horas de fermentação, o teor de lactose diminuiu de um valor médio de 4,92% (p/p) para 4,02% (p/p) e o pH diminuiu de 6,68 para 4,24 durante o mesmo período. A produção de etanol foi limitada, atingindo um valor final médio de 0,005% (p/p) com 24 horas de fermentação.

2.8. Preservação dos grãos de kefir

Os grãos de Kefir podem ser conservados liofilizados, desidratados ou hidratados⁵³. A lavagem constante dos grãos diminui sua viabilidade e as propriedades microbiológicas dos grãos liofilizados diferem dos grãos frescos¹¹. Os grãos úmidos mantêm atividade por 8 a 10 dias, em comparação aos grãos liofilizados por 12 a 18 meses⁵³. Garrote et al.⁵⁴ testaram diferentes condições de preservação dos grãos de kefir (-20°C, -80°C e 4°C) e concluíram que o congelamento a -20°C é um bom método de armazenamento dos grãos, mantendo as propriedades sensoriais da bebida kefir.

2.9. Produção do kefir

Existem diversos métodos para a produção da bebida kefir. Sendo os mais comuns o método tradicional e o industrial. Na atualidade, pesquisadores vêm desenvolvendo diferentes procedimentos modernos com a finalidade de elaborar a bebida kefir com as mesmas características da elaborada pelo método tradicional^{55,56}.

2.9.1. Produção de kefir pelo método Tradicional

A elaboração do kefir pelo método tradicional ocorre pela adição dos grãos de kefir ao leite. O leite pasteurizado é inoculado com 3% de grãos de kefir. A fermentação é realizada a 22°C por 22h até alcançar pH 4,7, quando é feita a homogeneização. Os grãos de kefir são separados do leite fermentado com ajuda de uma peneira, podendo ser utilizados

em uma próxima inoculação. O kefir é armazenado a 4°C, pronto para o consumo⁵⁷. O processo tradicional do kefir é mostrado na Figura 4.

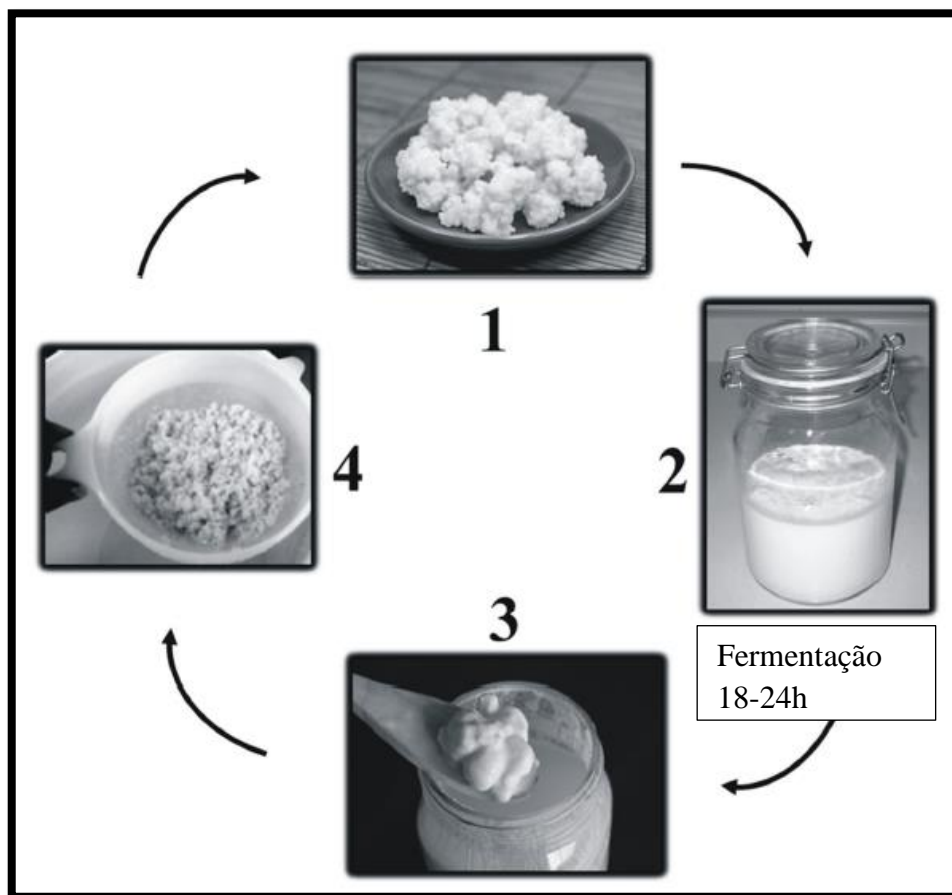


Figura 2 - Produção de kefir pelo método tradicional. (1) Grãos de Kefir. (2) Inoculação dos grãos ao leite a temperatura ambiente. (3) Multiplicação e crescimento dos grãos. (4) Separação dos grãos. Adaptado de Schwan et al.⁵⁷

A produção do Kefir em escala industrial utilizando os grãos é desafiadora devido à diversidade microbiológica dos grãos, aos volumes necessários, à separação dos grãos e também às condições de manuseio e armazenamento dos mesmos³¹. Assim, as proporções de compostos específicos (ácido láctico, etanol e compostos de carbonila como acetaldeído e diacetil) que definem o aroma do kefir podem diferir de uma produção para outra⁵⁸.

Poucas plantas industriais ainda propagam grãos de kefir para serem usados como cultura iniciadora. Em tais casos, a bebida fermentada é promovida como um produto

diferenciado, isto é, o tradicional kefir de qualidade excepcional e propriedades benéficas à saúde³⁹.

2.9.2. Produção de kefir pelo método Russo

O método russo permite a produção do kefir em maior escala e utiliza um processo de fermentação em série, a partir da filtração resultante da primeira fermentação dos grãos (cultura mãe)¹¹.

Os grãos de kefir (2-3%) são adicionados ao leite pasteurizado, que é incubado a 25°C por 24 horas e após essa primeira fermentação é realizada a separação dos grãos (que podem ser reutilizados posteriormente). O leite fermentado é utilizado como cultura mãe e 3% dessa cultura é adicionada ao leite pasteurizado ocorrendo uma segunda fermentação a 22°C por 12 horas. Essa segunda fermentação é chamada de “cultura em massa” e aproximadamente 3% dessa cultura é inoculada em um novo leite pasteurizado e distribuído em garrafas. Após ocorrida a fermentação a 20°C por 20 horas, o kefir é resfriado a uma temperatura de 8°C e mantida por 12 horas. Finalmente o produto é armazenado a 4°C (Figura 3)¹.

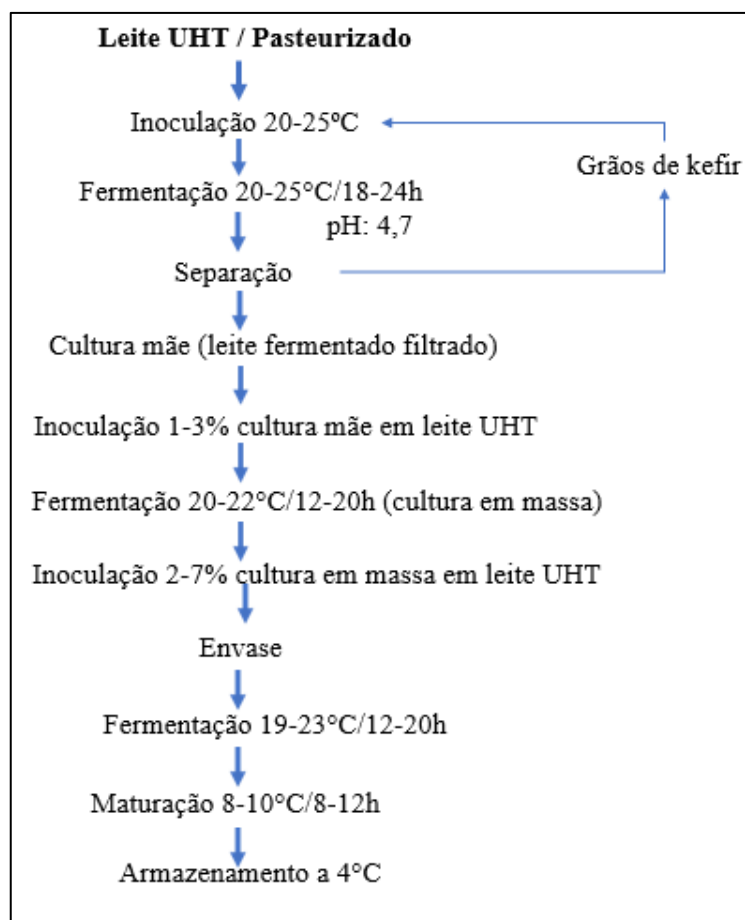


Figura 3 - Produção de kefir pelo método russo, utilizando cultura mãe. Adaptado de Rattray et al.¹

2.9.3. Produção do kefir por métodos industriais

A maioria dos fabricantes de kefir utiliza culturas iniciadoras liofilizadas de kefir, em uma combinação baseada na microbiota original presente no grão de kefir, com especial cuidado para utilizar cepas de leveduras que não produzam muito CO₂. Muitas empresas produtoras de culturas iniciadoras oferecem aos fabricantes culturas de kefir liofilizadas contendo alguns dos micro-organismos presentes nos grãos tradicionais de kefir. A cultura iniciadora *Direct Vat Set* (DVS) ou *Direct Vat Inoculation* (DVI) é adicionada diretamente ao leite para a fabricação de kefir, neste caso não são produzidos grãos de kefir. Para melhorar as propriedades do kefir produzido comercialmente, as culturas DVI/DVS são misturadas com cepas probióticas adjuntas, como *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp.³⁹.

O emprego de culturas iniciadoras para a elaboração do kefir simplifica a produção comercial de kefir. Selecionando cuidadosamente as espécies de bactérias e leveduras, é possível a produção de um produto com boas características sensoriais. Também

é possível prolongar a vida útil do kefir por até 28 dias, contrastando com os 3 a 12 dias de vida útil do kefir feito com grãos¹. Não obstante, o kefir feito com culturas iniciadoras não possui a mesma variedade microbiana do kefir produzido com grãos, consequentemente, pode não ter as mesmas características sensoriais, terapêuticas e probióticas¹⁶.

Na elaboração do kefir pelo método industrial o leite pasteurizado ou UHT é inoculado com 2-8% de cultura iniciadora de kefir. É realizada a fermentação em uma temperatura de 18-24°C por um tempo aproximado de 24 horas e o leite fermentado é distribuído em garrafas. Segue-se a maturação de 3 a 14 °C durante 24 horas, sendo que este processo nem sempre é realizado. O objetivo da maturação é permitir o crescimento de micro-organismos, principalmente leveduras, e contribuir com o *flavor* característico do kefir. A não realização da maturação está associada ao desenvolvimento do sabor atípico no kefir³¹. O processo industrial de kefir é mostrado na Figura 4.

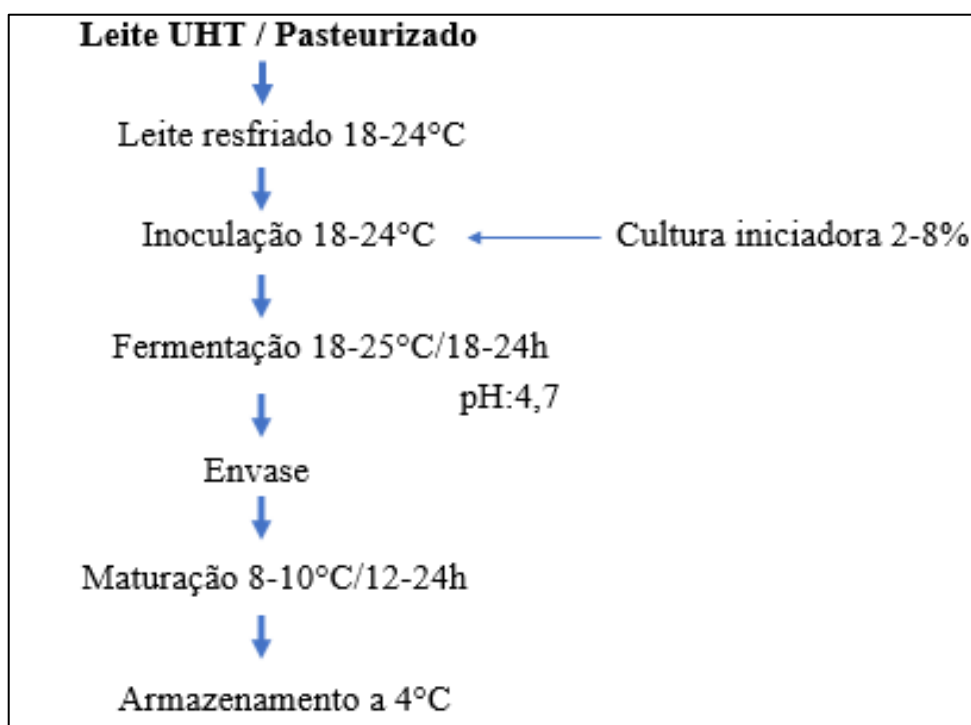


Figura 4 - Produção de kefir pelo método industrial com culturas iniciadoras. Adaptado de Otles et al.⁵⁵

Beshkova et al.³¹ utilizaram dois métodos de produção de kefir com culturas iniciadoras: por fermentação simultânea e por fermentação consecutiva. O processo de fermentação simultânea é feito adicionando 0,45% de sacarose ao leite pasteurizado padronizado (3% gordura), e a seguir é realizada a inoculação com os micro-organismos

iniciadores: cultura do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*), *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis* e *Sacharomyces cerevisiae*. Nesta etapa, ocorre conjuntamente a fermentação láctica e alcoólica. Após a adição das culturas, o leite inoculado é agitado, distribuído em garrafas e incubado a 22°C até atingir pH 4,7. O kefir é maturado a 10°C por um período de 24 horas e finalmente é armazenada a 4°C, ficando pronta para o consumo (Figura 5).

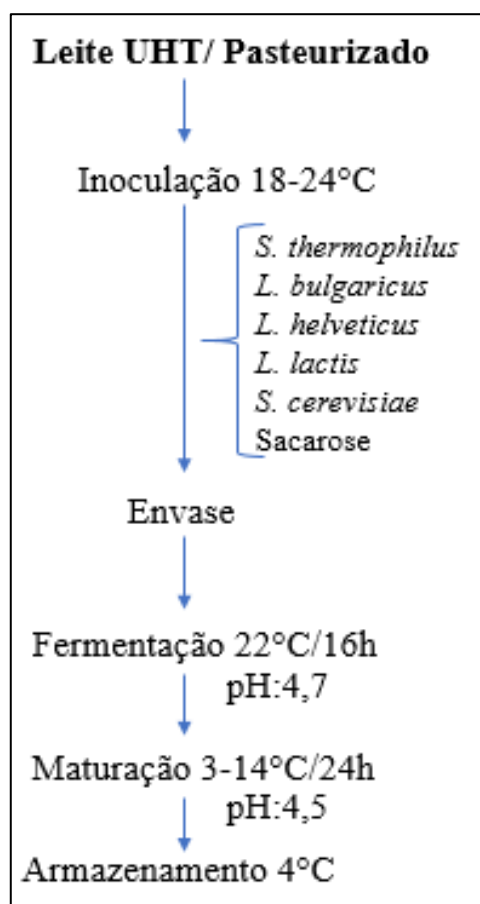


Figura 5 - Produção de kefir pelo método industrial com fermentação simultânea por bactérias e leveduras. Adaptado de Beshkova et al.³¹

No método de fermentação consecutiva é utilizado leite pasteurizado padronizado, 3% de gordura, sendo inoculado com os micro-organismos iniciadores da cultura do iogurte, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, e outros micro-organismos como *L. helveticus* e *L. lactis*. Nesta etapa ocorre a fermentação láctica. A inoculação com bactérias é realizada a 28°C até atingir pH 4,7. O kefir é resfriado a 20°C, sendo a seguir realizada a fermentação por leveduras e 0,45% sacarose. A bebida é agitada e distribuída em garrafas,

seguindo-se incubação a 20°C por 16 h. Por fim, o produto é armazenado a 4°C (Figura 6). Os métodos propostos por Beshkova et al.³¹ produziram uma bebida kefir com alto número de lactococos e lactobacilos viáveis, contendo propriedades sensoriais similares ao kefir feito tradicionalmente.

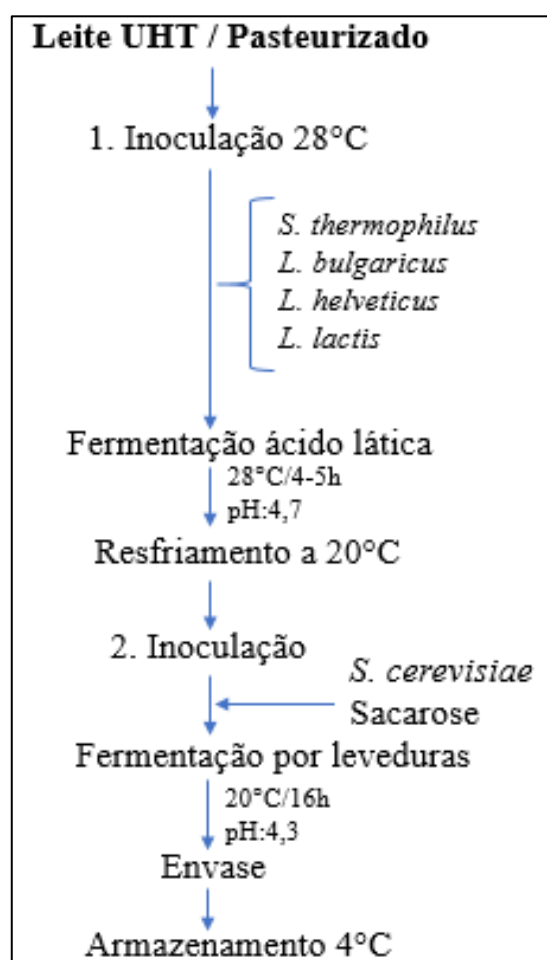


Figura 6 - Produção de kefir pelo método industrial por culturas consecutivas de bactérias e leveduras. Adaptado de Beshkova et al.³¹

2.9.4 Bactérias incorporadas nas culturas iniciadoras de kefir

As cepas de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tem forma de bastonetes curtos com extremidades arredondadas, mostram um pequeno crescimento a temperaturas menores de 10°C, porém tem um crescimento ótimo no leite entre 40 e 45°C e ainda são capazes de crescer a 50-55°C⁵⁹. O *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* é

uma das três subespécies de *L. delbrueckii*. É facultativamente anaeróbico, não móvel, não esporulado e age em cooperação com o *Streptococcus thermophilus* como culturas termofílicas na produção de iogurte. A uma temperatura ótima de aproximadamente 42°C, crescem e acidificam rapidamente resultando em propriedades sensoriais desejadas em comparação com uma cultura única⁶⁰⁻⁶¹. Os carboidratos fermentados por *L. bulgaricus* são frutose, glicose e lactose. O ácido láctico é o principal produto da fermentação; no entanto, produtos secundários, tais como acetaldeído, acetona, acetoína e diacetil, também podem ser produzidos em concentrações menores⁶².

Streptococcus thermophilus são cocos Gram positivos com diâmetro de 0,7 a 0,9 µm, não móveis, anaeróbios facultativos, ocorrendo em pares ou longas cadeias. São homofermentativos, produzindo principalmente L(+) ácido láctico. Fermentam lactose, sacarose, glicose e frutose, com preferência por dissacarídeos, e geralmente não fermentam galactose. Têm crescimento ótimo a 40-45°C, com temperatura máxima de crescimento de cerca de 50-52°C e sem crescimento a 10°C⁶³.

As cepas do gênero *Lactococcus* possuem morfologia de cocos e formam pares de cocos isolados ou de cadeias curtas com diâmetro de 0,5 a 1,5µm em seu meio de crescimento. Sua temperatura ideal de crescimento é de 30°C e podem crescer entre 10 e 45°C⁶⁴.

Dentro das bactérias ácido lácticas o *Lactococcus lactis* é um micro-organismo importante na indústria, secretando ácido láctico como um dos principais produtos de fermentação do metabolismo de carboidratos, contribuindo para a extensão da vida de prateleira, assim como redução do conteúdo de lactose⁶⁵.

O *Lactococcus lactis* é uma bactéria Gram positiva em forma de cocos, heterofermentativa, catalase negativa, não móvel e não produtora de esporos. Existem quatro subespécies de *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae* e *L. lactis* subsp. *tructae*. Sendo as duas primeiras de grande importância para as indústrias de alimentos e laticínios, como culturas iniciadoras e probióticas⁶⁴.

O *Lactobacillus fermentum*, assim chamado porque causa fermentação, é uma espécie obrigatoriamente heterofermentativa. *Lactobacillus fermentum* é um membro do grupo *L. reuteri*. Não cresce a 15°C, mas cresce a 45°C. *Lactobacillus fermentum* utiliza vários carboidratos (celobiose, arabinose, galactose, maltose, manose, melibiose, rafinose, ribose, sacarose, trealose e xilose), mas a fermentação é dependente da estirpe⁶⁶.

Os *Leuconostoc* spp. são cocos Gram-positivos, mesófilos (crescimento ótimo a 25°C), catalase negativos, não móveis, aerotolerantes, obrigatoriamente heterofermentativos. São capazes de crescer a 10°C, mas não a 45°C. Eles geralmente ocorrem em pares e cadeias. São nutricionalmente exigentes, exigindo uma fonte de aminoácidos e vitaminas, bem como um carboidrato fermentável para energia. Geralmente crescem associativamente com lactococos no leite, parece existir uma relação de cooperação entre os dois grupos de bactérias do ácido láctico, o que se pensa estar relacionado com a atividade proteolítica dos lactococos que liberam aminoácidos pela proteólise. *Leuconostoc* spp. usam a via da fosfoquetolase para o metabolismo das hexoses (por exemplo, glicose e galactose), produzindo lactato, etanol e CO₂ como produtos finais⁶⁷.

Élie Metchnikoff, cientista russo ganhador do Prêmio Nobel, é considerado o responsável por iniciar o conceito dos benefícios da ingestão de bactérias ácido lácticas na saúde humana. Desde então, surgiram pesquisas sobre os probióticos, que são microorganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro⁶⁸. Muitas cepas dos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. demonstraram produzir efeitos profiláticos e terapêuticos em humanos. Como resultado, essas cepas são cada vez mais incorporadas em vários produtos alimentícios, especificamente produtos lácteos fermentados e não fermentados⁶⁹.

L. acidophilus são bastonetes Gram-positivos, não formadores de esporos, com extremidades arredondadas, geralmente de 0,6-0,9x1,5-6 µm, que ocorrem isoladamente, em pares e em cadeias curtas. São principalmente homofermentativos, sendo capazes de fermentar lactose, sacarose e frutose, e têm seu crescimento ótimo a 45°C⁷⁰. Os benefícios à saúde associados às cepas de *L. acidophilus* incluem a redução dos sintomas gastrointestinais em indivíduos intolerantes à lactose, alívio dos sintomas da constipação, tratamento da diarreia infantil, prevenção da diarreia dos viajantes e atividade contra o *Helicobacter pylori*⁶⁹.

Bifidobacterium spp. são organismos Gram-positivos, anaeróbios, não-móveis, não esporulados, que produzem ácidos acético e láctico, sem gerar CO₂. Eles têm a capacidade de fermentar glicose, galactose e frutose e algumas espécies podem fermentar a lactose e crescer no leite. A temperatura ideal para o crescimento é de 37-41°C, o mínimo é de 25-28°C e o máximo é de 43-45°C⁷¹. Existem evidências experimentais para apoiar que a administração oral de *Bifidobacterium* spp. é capaz de manter o equilíbrio normal da população microbiana no intestino. Além do seu papel na terapia gastrointestinal, as espécies

de *Bifidobacterium* spp. também oferecem vários outros benefícios nutricionais e terapêuticos. Esses benefícios incluem propriedades antimicrobianas e antimutagênicas, atividade anticarcinogênica, redução do colesterol sérico e melhora nas propriedades de adesão⁷².

O *Bifidobacterium* spp. tem capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, tais como ácidos orgânicos (por exemplo, ácidos láctico e acético), peróxido de hidrogênio, e bacteriocinas para suprimir a multiplicação de bactérias patogênicas. Devido a isso, o *Bifidobacterium* spp. apresenta propriedades antimicrobianas contra bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Assim como a maioria dos organismos probióticos libera vários ácidos graxos de cadeia curta, como os ácidos acético e butírico, esses ácidos podem ser responsáveis pelo efeito antimutagênico observado no *Bifidobacterium* spp. Potenciais efeitos anticarcinogênicos do *Bifidobacterium* spp. podem ser devidos à remoção direta ou indireta de procarcinógenos ou ativação do sistema imunológico do corpo. *Bifidobacterium* spp. pode assimilar ativamente o colesterol durante seu crescimento no intestino delgado e torná-lo indisponível para absorção na corrente sanguínea. A adesão é um critério importante para a seleção de cepas de bactérias probióticas. Estudos mostraram que polissacarídeos produzidos por *B. infantis* estão envolvidos na adesão ao epitélio intestinal⁷².

Cepas selecionadas de *L. casei* também tem sido cada vez mais utilizadas como culturas probióticas em diferentes alimentos, especialmente queijos e leites fermentados. *Lb. casei* são bastonetes Gram-positivos, não móveis, não formadores de esporos, catalase-negativo, e geralmente de 0,7-1,1 x 2,0-4,0 µm, ocorrendo individualmente, em pares ou em cadeias⁷³. Todas as espécies do grupo *L. casei* são lactobacilos facultativamente heterofermentativos. As hexoses (galactose, glicose e frutose são usadas por todas as cepas) são quase inteiramente convertidas em ácido láctico através da via de Embden-Meyerhof. Sob condições limitantes de carboidratos, ácido acético e etanol, principalmente, seguido por ácido butírico, diacetil e ácido fórmico, são produzidos em adição ao ácido láctico⁷⁴.

O *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria heterofermentativa facultativa, e está incluído com outras espécies altamente relacionadas no grupo *L. casei*. As células têm a forma de bastonetes, isolados ou em cadeias curtas. *Lactobacillus rhamnosus* cresce a 15 e 45°C, produz o isômero L- ácido láctico e fermenta carboidratos como arabinose, celobiose, esculina, ribose, sorbitol e sacarose⁶⁶.

2.10. Benefícios do kefir

O consumo do kefir sempre foi associado a benefícios à saúde, incluindo propriedades fisiológicas, profiláticas e terapêuticas⁴. Pesquisas mostraram a utilização do kefir para reduzir os sintomas de intolerância à lactose, estimular o sistema imunológico e diminuir o colesterol. Além disso são atribuídos ao kefir propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas^{37,75,76}. Por se tratar de um alimento lácteo funcional, o kefir tornou-se foco de estudos. Alguns dos efeitos benéficos para a saúde podem estar associados às mudanças bioquímicas que ocorrem no leite, como a produção de ácidos orgânicos e peptídeos bioativos produzidos durante o processo de fermentação e da diversidade da microbiota que atuam de forma independente ou em cooperação^{4,77,78}.

As bacteriocinas são exemplos de peptídeos bioativos que podem ser produzidas pelas bactérias lácticas. Elas são sintetizadas nos ribossomos de bactérias, secretadas extracelularmente e possuem efeito bactericida ou bacteriostático. A bacteriocina Lacticina 3147, por exemplo, é produzida por uma cepa de *Lactococcus lactis* que foi originalmente isolada de um grão de kefir usado na produção doméstica de leite fermentado na Irlanda¹.

Além disso, as espécies microbianas presentes no kefir também podem ter atributos de promoção à saúde ou propriedades probióticas⁷. Zheng et al.⁷⁹ identificaram com sucesso três cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus kefir* de grãos de kefir tibetanos que mostraram propriedades satisfatórias para a aplicação como probióticos. Seus estudos indicaram que as cepas de *Lactobacillus* spp. analisadas podem ser úteis na produção de produtos lácteos com potenciais benefícios à saúde humana.

2.10.1 Impacto do Kefir na microbiota intestinal

Um fator importante dos efeitos probióticos é a capacidade de modular a microbiota intestinal de quem os consome, provocando um aumento de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp., e reduzindo a quantidade de micro-organismos indesejáveis. O efeito sobre a microbiota intestinal é possivelmente derivado de uma combinação de fatores, como a inibição direta de patógenos pela produção de ácidos e bacteriocinas pelos micro-organismos probióticos e a exclusão competitiva de agentes patogênicos na mucosa intestinal¹.

A microbiota do intestino humano desempenha um papel crucial tanto na manutenção da homeostase gastrointestinal quanto na saúde do hospedeiro. Mudanças na sua composição microbiana podem levar a um desequilíbrio entre a abundância de micro-

organismos benéficos e nocivos. Esta condição, definida como a disbiose, pode favorecer a susceptibilidade do hospedeiro a várias doenças, incluindo distúrbios metabólicos, como obesidade e diabetes, doença inflamatória intestinal e doenças atópicas⁸⁰.

Toscano et al.⁸⁰ avaliaram a capacidade do *Lactobacillus kefir* LKF01 DSM32079 (LKEF) colonizar o ambiente intestinal e modificar a composição da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis. Na pesquisa, participaram vinte indivíduos italianos saudáveis, quatro homens e dezesseis mulheres, que foram randomizados em dois grupos, dez indivíduos ingeriram cinco gotas de uma suspensão probiótica de 10^{10} UFC de *L. kefir* 30 minutos antes do café da manhã (administração pré-prandial), enquanto dez indivíduos ingeriram cinco gotas da suspensão probiótica 30 minutos após o café da manhã (administração pós-prandial). Após um mês de administração da cepa de *Lactobacillus kefir* LKF01, esta foi recuperada nas fezes de todos os indivíduos participantes do estudo, com uma carga bacteriana de 10^5 - 10^6 UFC/g de fezes, após administração pré-prandial e pós-prandial. Após um mês de administração da cepa observou-se redução dos gêneros *Bilophila*, *Butyricomonas*, *Flavonifractor*, *Oscillibacter* e *Prevotella*. Um mês após o término da administração da cepa, observou-se redução dos gêneros *Bacteroides*, *Barnesiella*, *Butyricomonas*, *Clostridium*, *Haemophilus*, *Oscillibacter*, *Salmonella*, *Streptococcus*, *Subdoligranolum* e *Veillonella*. *Lactobacillus kefir* LKF01 mostrou uma forte capacidade de modular a composição da microbiota intestinal, levando a uma redução significativa de vários gêneros bacterianos diretamente envolvidos no início da resposta pró-inflamatória e doenças gastrointestinais.

2.10.2. Propriedades antimicrobianas do Kefir

No início dos anos 1900, o imunologista Mechnikoff relatou que o consumo permanente de iogurte contendo bactérias ácido lácticas influenciava positivamente na expectativa de vida dos consumidores, devido à competição das bactérias ácido lácticas com os micro-organismos prejudiciais à saúde. Desde então, muitas pesquisas têm sido realizadas com a finalidade de demonstrar as propriedades antifúngicas e antibacterianas do Kefir¹⁶.

Rattray e O'Connel¹ relataram que o Kefir tem efeito bactericida e bacteriostático sobre patógenos bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos. Powell et al. ressaltaram a atividade antimicrobiana do Kefir sobre variedades de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. Essa atividade antimicrobiana é atribuída ao ácido

lático, ácidos voláteis, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono e bacteriocinas produzidas pela ação das bactérias ácido lácticas presentes no Kefir⁸¹.

Foi avaliado o efeito antibacteriano do Kefir produzido a partir de uma cultura iniciadora comercial contendo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus kefir*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* e *Saccharomyces unisporus*. Foram testadas as atividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739), sendo tais microorganismos usados por serem os patógenos mais comuns veiculados por alimentos. A atividade antibiótica do Kefir foi comparada com ampicilina e gentamicina, sendo adicionado 10 µg/ml desses antibióticos em um disco de papel de 5mm de diâmetro. Foram utilizadas amostras de Kefir fermentado por 24 e 48 horas (0,1ml) para comparação. Os discos de papel com antibióticos ou Kefir foram aplicados na superfície de ágar previamente inoculado com 0,1 ml da suspensão de bactérias patogênicas. Após incubação a 37°C por 24 horas os halos de inibição foram medidos. O diâmetro dos halos de inibição formados pelos antibióticos ou pelas amostras de Kefir obtiveram resultados semelhantes para cada patógeno. O melhor efeito antimicrobiano de Kefir de 24 e 48 horas foi observado contra *Staphylococcus aureus*, com diâmetros de 21,4 e 21,1 mm, respectivamente, não tendo diferença significativa entre eles. Os diâmetros dos halos de inibição para *E. coli* foram de 19,5 mm, 18,6 mm, 20,2 mm e 20,8 mm com Kefir fermentado por 24 horas, Kefir fermentado por 48 horas, ampicilina e gentamicina, respectivamente. Concluiu-se que o efeito antimicrobiano do Kefir foi semelhante ao da ampicilina e da gentamicina⁸².

Yüksekdağ et al.⁸³ determinaram a quantidade de peróxido de hidrogênio produzido pelas bactérias *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Enterococcus durans*, isoladas de amostras de Kefir turco. A concentração de peróxido de hidrogênio foi determinada por espectrofotometria, sendo as medidas obtidas após 24 horas de incubação em leite desnatado. Os autores observaram diferentes quantidades de produção de peróxido de hidrogênio entre os isolados, ressaltando dois isolados de *Lactococcus lactis*, Z1S e Z2S, que produziram maior quantidade de peróxido de hidrogênio (0,17 µg/ml). Os efeitos antimicrobianos foram determinados pelo método de difusão em ágar. Os isolados *Lactococcus lactis* Z1S e Z2S e *Lactococcus cremoris* Z6S

foram capazes de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Carasi et al.⁷⁶ utilizaram em sua pesquisa seis cepas de *Lactobacillus kefir* CIDCA 8321, 8345, 8348, 83111, 83113 e 83115 isolados de Kefir para avaliar suas propriedades antibacterianas. As bactérias patogênicas, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Shigella flexneri* ATCC 9199, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA 101, *Escherichia coli* enterohemorrágica EDL 933, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 e *Bacillus cereus* ATCC 10876 foram utilizadas para testar a atividade antimicrobiana das diferentes cepas de *Lactobacillus kefir*. Para avaliar a inibição do crescimento de agentes patogênicos bacterianos empregou-se o método ágar *spot test*. As suspensões celulares de cepas de *Lactobacillus kefir* foram inoculadas (5 µL) em *spots* em placas de Petri contendo ágar MRS e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após este período, foram adicionados às placas meio BHI contendo os patógenos. Após 18 horas de incubação a 37 °C os halos de inibição ao redor das colônias de *Lactobacillus kefir* foram medidos. Quanto maior o diâmetro, maior o grau de inibição exercido pelas cepas de *Lactobacillus kefir*. Os patógenos Gram-positivos apresentaram maior sensibilidade às cepas de *Lactobacillus kefir* do que os patógenos Gram-negativos, sendo que todas as cepas inibiram o crescimento de *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, mas nenhuma delas inibiu *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC). As cepas *Lactobacillus kefir* CIDCA 8321 e CIDCA 8348 foram capazes de inibir o crescimento dos demais patógenos testados, demonstrando ser as cepas mais ativas contra os agentes patogênicos estudados.

2.10.3. Atividade anticarcinogênica do Kefir

A atividade anticarcinogênica dos produtos lácteos fermentados pode ser atribuída à prevenção de câncer e supressão de tumores iniciais, prolongando as atividades enzimáticas, que convertem as células pro-carcinogênicas a carcinogênicas, ou ativando o sistema imunológico⁸⁴. A ingestão frequente do Kefir é capaz de modular positivamente a composição da microbiota intestinal e do sistema imunológico do indivíduo que o consome. Consequentemente, acredita-se que este leite fermentado possa desempenhar um papel importante na modulação da carcinogênese⁸⁵.

Liu et al.⁸⁶ estudaram os efeitos do Kefir feito a partir de leite de vaca e de leite de soja sobre o crescimento tumoral em camundongos portadores de tumores e a resposta da

imunoglobulina A da mucosa nesses camundongos. Os camundongos foram injetados com $0,2 \times 10^8$ células de Sarcoma 180 (S180) durante sete dias antes de dar início à alimentação com kefir. Os camundongos portadores de tumor foram divididos aleatoriamente em cinco grupos. O grupo controle positivo recebeu 5 ml de água destilada/kg de peso corporal, via oral, uma vez por dia. Os quatro grupos testes foram formados por camundongos que receberam 5 ml/kg de peso corporal de leite reconstituído, Kefir de leite, leite de soja e Kefir de leite de soja, por via oral, uma vez por dia. Os camundongos do grupo controle negativo (camundongos saudáveis) receberam 5 ml de água destilada/kg de peso corporal, por via oral, uma vez por dia. Foram utilizados 10 camundongos em cada grupo. Após 30 dias de tratamento, foi avaliado o crescimento tumoral e então os tumores foram removidos e pesados. O grupo de camundongos alimentados com Kefir de leite de soja apresentaram inibição de 70,9% do crescimento tumoral em relação ao grupo controle positivo, enquanto que o grupo alimentado com Kefir de leite de vaca apresentou inibição de 64,8%. A composição do polissacarídeo a partir de grãos de Kefir de leite de soja é diferente da composição do polissacarídeo a partir de grãos de Kefir de leite. São necessários novos estudos para verificar o efeito a composição do polissacarídeo na atividade antitumoral do Kefiran. Os volumes dos tumores dos grupos controle positivo e leite no dia 30 foram 5,80 e 7,24 vezes maiores que no dia 0, respectivamente. Enquanto os volumes dos tumores dos grupos Kefir de leite e Kefir de soja no dia 30 foram 1,97 e 1,63 maiores que no dia 0, respectivamente.

Nesse mesmo trabalho foi observado necrose no centro dos tumores desenvolvidos nos camundongos. Os volumes das regiões necróticas foram maiores para os grupos de Kefir de leite, leite de soja e Kefir de leite de soja. Além disso, os corpos apoptóticos observados nos tumores dos grupos Kefir de leite e Kefir de leite de soja confirmaram a apoptose. Devido à apoptose das células S180, os autores consideraram que a ingestão do Kefir estimula o sistema imunológico do hospedeiro⁸⁶.

O processamento de antígenos e os eventos celulares iniciais da resposta imune no intestino ocorrem nas placas de Peyer, o tecido linfático intestinal. A placa de Peyer contém os precursores das células plasmáticas de Imunoglobulinas A (Ig A). A secreção de IgA no lúmen proporciona uma barreira imunológica à matéria estranha, particularmente micro-organismos patogênicos e proteínas alimentares alergênicas, impedindo sua adsorção ao epitélio da mucosa e penetração no organismo. Os autores observaram a formação de centros germinativos nas placas de Peyer para os grupos Kefir de leite e Kefir de leite de

soja. Este achado indica que a ingestão de Kefir de leite ou Kefir de leite de soja ativa os folículos linfóides subepiteliais localizados em todo o intestino delgado, aumentando a produção endógena de Ig A, o que pode reduzir o risco associado à exposição a antígenos alimentares⁸⁶. Estes resultados sugerem que o Kefir de leite e o Kefir de leite de soja podem ser considerados alimentos promissores em termos de prevenção do câncer e aumento da resistência mucosa a infecções gastrointestinais.

2.10.4. Atividade da β -galactosidase do Kefir

A intolerância à lactose é uma condição na qual há níveis insuficientes de β -galactosidase, hipolactasia, ou ausência completa de β -galactosidase, alactasia. A intolerância à β -galactosidase pode ser tratada por uma dieta rigorosa sem lactose, uma dieta com baixa concentração de lactose, suplementos com β -galactosidase ou suplementos probióticos. O tratamento adequado é selecionado com base no grau de intolerância à lactose⁸⁷.

A lactose é o principal carboidrato do leite. No mundo, aproximadamente 75% dos adultos tem má digestão da lactose, sendo consequência da diminuição geneticamente programada na metabolização da lactose no intestino após idade de 3 a 5 anos⁸⁸. Uma quantidade significativa da população mundial é intolerante à lactose, devido à insuficiente atividade intestinal da β -galactosidase. A enzima β -galactosidase degrada o dissacarídeo lactose nos monossacarídeos glicose e galactose. Sem atividade enzimática da β -galactosidase, a lactose é levada ao intestino, onde as bactérias intestinais, como os coliformes, a digerem produzindo dióxido de carbono, podendo causar desconforto e sintomas gastrointestinais³⁷.

Muitas pessoas com má digestão da lactose podem tolerar a presença de pequena quantidade de lactose na dieta. Nesse sentido, o consumo de produtos de leite fermentado, como o Kefir, pode ser uma boa opção⁷⁵. No Kefir, a diversa população microbiana possui atividade de β -galactosidase desdobrando a lactose em glicose e galactose, facilitando a sua digestão. Aproximadamente 20 a 40% da lactose presente no Kefir é metabolizada, podendo essa redução ser suficiente para muitos indivíduos com má digestão de lactose que toleram o leite fermentado na sua alimentação¹.

De Vrese et al.⁸⁹ avaliaram as concentrações de galactose venosa plasmática pós-prandial em dez suínos miniatura Gottingen alimentados com Kefir inoculado com grãos frescos e grãos tratados termicamente a 100°C por 10 minutos (controle). Os grãos de Kefir

continham *Lactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis* (subsp. *lactis e cremoris*), levedura fermentadora de lactose *Candida kefir* e levedura não fermentada de lactose *Saccharomyces unisporus*. No grupo alimentado com Kefir de grãos frescos, houve um aumento de 30% da concentração média pós-prandial de galactose plasmática em relação ao outro grupo, indicando uma melhor digestão da lactose. Não houve indução de atividade de β -galactosidase intestinal. Os resultados deste estudo evidenciaram uma melhor digestão e absorção da lactose com a ingestão de Kefir devido à atividade da β -galactosidase microbiana.

Hertzler e Cleancy⁹⁰ realizaram uma pesquisa com 15 adultos saudáveis com má digestão de lactose. Os indivíduos foram divididos em cinco tratamentos, leite, Kefir puro, Kefir saborizado com framboesa, iogurte puro e iogurte saborizado com framboesa. As porções de cada produto foram padronizadas para fornecer 20 g de lactose. As amostras de Kefir continham as bactérias *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* e a levedura *Saccharomyces florentinus*. Foi realizado o teste respiratório do hidrogênio expirado, sendo que as medidas do tratamento leite foram significativamente maiores que iogurte puro, Kefir puro e iogurte saborizado. Os iogurtes e kefir reduziram de forma semelhante a severidade percebida de flatulência em 54% a 71% em relação ao leite. Os autores concluíram que o Kefir melhorou a digestão da lactose, seu uso, portanto, pode ser uma estratégia potencial para superar a intolerância à lactose.

2.10.5. Efeito hipocolesterolêmico do Kefir

A hipercolesterolemia é um aumento do colesterol total no sangue, triglicerídeos, lipoproteínas de alta densidade (HDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Um dos métodos mais comuns e rápidos para controlar o colesterol e os triglicerídeos sanguíneos é a ingestão de fármacos⁹¹. Devido aos elevados custos dos medicamentos e aos efeitos colaterais dos mesmos, o interesse em terapias probióticas para diminuir o colesterol sérico e o risco de doença arterial coronariana vem aumentando⁹².

Os resultados em relação aos benefícios do kefir na redução do colesterol são controversos. Em um estudo realizado por St-Onge M-P et al.⁹³ o consumo de kefir (0,5 litros/dia) por homens adultos, hipercolesterolêmicos, durante 4 semanas, não afetou as concentrações circulantes de colesterol total, HDL, LDL ou triglicerídeos. Por outro lado, *Lactobacillus plantarum* MA2, isolado a partir de grãos de kefir originários do Tibete, foi

efetivo na redução das concentrações de colesterol e triglicerídeos no plasma e no fígado de camundongos com dieta rica em gordura⁹⁴.

O Kefir possui uma grande variedade de micro-organismos benéficos e compostos bioativos, sendo considerado um produto com um grande potencial como alimento funcional. Os efeitos fisiológicos descritos na literatura e apresentados neste trabalho apoiam os benefícios de promoção da saúde do Kefir. No entanto, há necessidade de mais estudos clínicos para avaliar e entender melhor os efeitos fisiológicos do kefir como parte de uma dieta.

2.11. Saborização de kefir com cagaita (*Eugenia dysenterica*)

Muitas espécies nativas do Cerrado fornecem frutos com características sensoriais únicas e altas concentrações de nutrientes. Esses frutos desempenham papéis importantes, tanto econômicos, via comercialização de seus produtos, quanto nutricionais, por seu consumo. Um dos frutos pertencentes ao Cerrado é a *Eugenia dysenterica*, uma fruta exótica pertencente à família *Myrtaceae*, popularmente conhecida como cagaita. Além do consumo *in natura*, existem inúmeras preparações regionais típicas que utilizam polpa de cagaita, principalmente, doces, geleias, licores, refrigerantes, sucos e sorvetes⁹⁵.

A árvore cagaiteira pode atingir até 10 m de altura e possui galhos retorcidos e casca grossa, e o período de frutificação ocorre entre outubro e dezembro⁹⁶. As folhas apresentam propriedades medicinais, sendo empregadas na medicina popular para tratar a diarreia, problemas cardíacos, diabetes, icterícia e reduzir o colesterol⁹⁷. Foi analisado por Costa et al.⁹⁸ a composição do hidrodestilado das folhas e sua atividade antimicrobiana no controle de *Cryptococcus neoformans* isolado de indivíduos infetados pelo vírus da imunodeficiência humana. O extrato de óleo essencial mostrou efeito ativo contra todas as cepas de *Cryptococcus* em concentrações abaixo de 500g/ml, suprimindo o crescimento da mesma.

A cagaiteira produz fruto de cor amarelo, globoso e achatado, com polpa de sabor acidulado e dimensões variando de 3-4 cm de comprimento, por 3-5 cm de diâmetro (Figura 7)⁹⁹. Os frutos oferecem nutrientes e características sensoriais atraentes, como cor, sabor e aroma, mas não são explorados comercialmente em larga escala. A distribuição de cagaiteiras no cerrado é muito ampla, ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal¹⁰⁰.

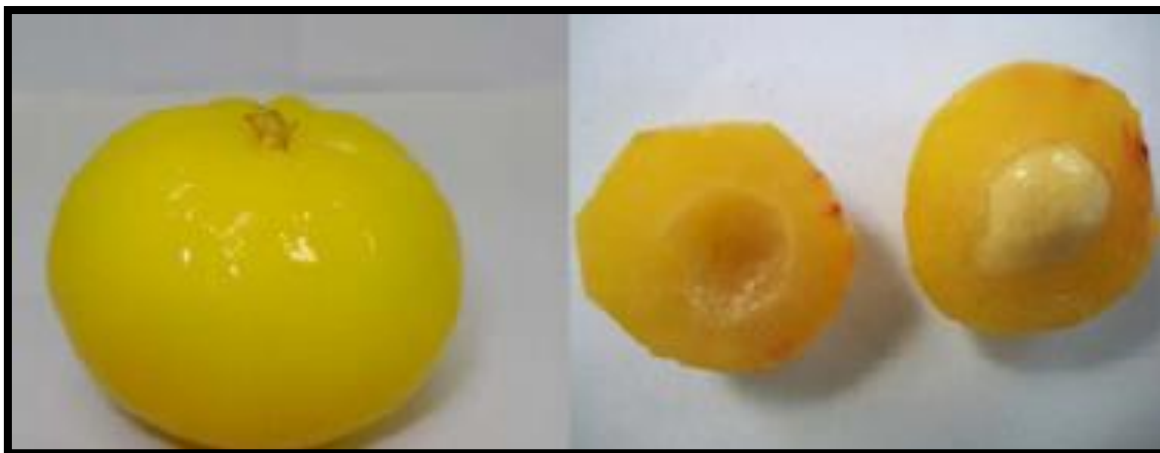


Figura 7 - Ilustração da cagaita (*Eugenia dysenterica*), fonte Cardoso et al.⁹⁵

De acordo com estudo feito por Cardoso et al.⁹⁵ a polpa de cagaita apresentou alto teor de umidade (91,56 g/100 g), vitamina C (34,11 mg/100 g) e folatos (25,74 µg/100 g). Presença de proteína (0,63 g/100 g), cinzas (0,18 g/100 g), lipídios (0,57 g/100 g), carboidratos (5,54 g/100 g), fibra alimentar (1,54 g/100 g) e carotenóides (0,77 mg/100 g) foi observado em sua composição. Ribeiro¹⁰¹ obteve valores entre 13,78 e 14,63 g/100ml de acidez titulável e valores de pH entre 2,90 e 2,69. O consumo de cagaita (100 g) contribui para suprir as necessidades diárias de vitamina C (em média 71,0%), vitamina A (em média 7,5%) e folatos (em média 7,9%). A cagaita apresenta alto rendimento de polpa, reduzido valor energético total e é considerada uma fonte de vitamina C, que desempenha importante papel na saúde humana¹⁰².

A cagaita apresenta na polpa maior teor de ácidos graxos poli-insaturados como o linoleico e linolênico. Possui maior teor de ácido linoleico (10,5%) em comparação com o azeite de oliva e de dendê. O teor de ácido linolênico (11,86%) é superior aos óleos de milho, girassol, amendoim, soja, oliva e dendê⁹⁶.

Frutos de *Eugenia dysenterica* são particularmente ricos em fibras e seu consumo em excesso tem forte atividade laxante. Esta atividade deve-se também à presença de um peptídeo chamado Linaclotide cujo uso para o tratamento da constipação crônica e síndrome do intestino irritável foi avaliado, pela capacidade de estimular a secreção e trânsito intestinal¹⁰².

A cagaita é um fruto muito perecível dificultando a sua comercialização e após colheita apresenta elevada atividade metabólica. O fruto deteriora-se em apenas três dias a temperatura de 28°C, é muito sensível ao calor, fermentando rapidamente, sendo assim é

recomendável não consumir quando é exposto a altas temperaturas podendo provocar diarreia e embriaguez⁹⁶. O armazenamento em geladeira a 15°C pode estender a conservação da cagaita em até treze dias¹⁰³. Uma alternativa para manter as características sensoriais da fruta é adotando técnicas adequadas de conservação, permitindo o aumento da vida útil. Alternativas como o congelamento da polpa e a desidratação podem possibilitar a industrialização da fruta¹⁰⁴.

2.11.1. Propriedades funcionais da cagaita (*Eugenia dysenterica*)

A cagaita apresenta um alto teor de umidade e alto rendimento da polpa. É considerada boa fonte de vitamina C, vitamina A, vitamina B2, cálcio, magnésio, ferro e ácidos graxos poli-insaturados.

De acordo com Santos¹⁰⁵ a cagaita tem potencial antioxidante. Os antioxidantes são substâncias que retarda ou previnem a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucléicos ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia^{106,107} e previnem ou reparam lesões celulares causadas pelas espécies reativas de oxigênio¹⁰⁸. Utilizando os métodos do radical ABTS a partir do seu precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico e o método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), a cagaita *in natura* apresentou atividade antioxidante de 276,07 µmol Trolox/g e EC₅₀ 5,16g de DPPH respectivamente. Fazendo uma comparação com pesquisa de Rufino et al.¹⁰⁹ que determinaram a capacidade antioxidante de alguns frutos tropicais não tradicionais brasileiros, pode-se observar que a capacidade antioxidante da cagaita utilizando o método ABTS foi superior ao açaí, cajá, caju, mangaba entre outras.

Schiassi et al.¹¹⁰ avaliaram a capacidade antioxidante de diferentes frutos do cerrado brasileiro utilizando os métodos ABTS, DPPH e β-caroteno. Observaram que a cagaita apresentou maiores valores em comparação com araçá, buriti, cajá e mangaba, e menor valor em relação ao marolo, seguindo os métodos ABTS e DPPH. No método β-caroteno obteve valores superiores ao araçá, mangaba, cajá, marolo e buriti.

Ribeiro¹⁰¹ avaliou a capacidade antioxidante da cagaita com casca e sem casca, obtendo promissórios e satisfatórios resultados. Sendo a cagaita com casca quem mostrou melhor capacidade antioxidante em todos os testes.

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, ficou famoso por Linus Pauling que demonstrou sua eficácia no tratamento de infecções e câncer¹¹¹. A vitamina C é hidrossolúvel, essencial para algumas espécies, incluindo os seres humanos. Para animais

que não podem sintetizar vitamina C, as melhores fontes alimentares incluem frutas e vegetais. Funciona como um antioxidante considerado como a primeira linha de defesa contra radicais livres e reduzindo espécies reativas de oxigênio para proteger contra a oxidação de lipídios, proteínas e DNA. Também funciona como um co-fator para uma série de enzimas, incluindo aquelas responsáveis pela síntese de colágeno. A deficiência de vitamina C resulta em escorbuto, que se manifesta por falta de apetite, hemorragia, cicatrização prejudicada de feridas e atrofia do músculo esquelético¹¹².

Segundo o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais o consumo diário de vitamina C, para adultos, deve ser equivalente a 45 mg, evitando a deficiência desta vitamina no organismo¹¹³.

A cagaita (*Eugenia dysenterica*) é uma fonte rica em vitamina C. Segundo a pesquisa realizada por Silva et al.⁹⁹ que analisaram a cagaita em diferentes estágios de maturação (verde, semi-madura e madura), o valor de vitamina C do fruto maduro da cagaita foi 27,46 mg/100g de fruto, em quanto aos valores de vitamina C nas polpas de cagaita congeladas a -18°C durante quatro meses tiveram variação de 17,88 a 26,97 mg/100g de polpa. Resultados próximos de vitamina C foram encontrados por Santos¹⁰⁵ para cagaita *in natura* de 29,75mg/100. Já Siqueira et al.¹¹⁴ relatam valores de vitamina C de 64,10mg/100g.

Os carotenoides são pigmentos solúveis em óleo, apresentam coloração amarelo alaranjado ou vermelho, são naturalmente sintetizados por bactérias fotossintéticas, algas, fungos e plantas. Apesar dos carotenoides não serem produzidos por humanos estes compostos são conhecidos por desempenharem vários papéis importantes nas funções fisiológicas humanas, como propriedade antioxidante e pró-vitamina A¹¹⁵. Também podem proteger contra alguns tipos de câncer, limitando o crescimento anormal das células e/ou melhorando a comunicação GAP juncional¹¹⁶.

Nos países em desenvolvimento a deficiência de vitamina A é um grande problema de saúde pública; afetando particularmente crianças pré-escolares e gestantes, podendo causar cegueira, baixo crescimento e morte. As principais fontes de vitamina A são produtos de origem animal, como lácteos, fígado e peixe, que contêm vitamina A pré-formada (retinol) e plantas como vegetais e frutas amarelas ou laranjas, que contêm carotenóides, predominantemente β -caroteno que pode ser convertido em retinol¹¹⁷.

Rocha et al.¹¹⁸ avaliaram diferentes frutos do cerrado Piauiense, obtendo maior teor de β -caroteno para a cagaita (201,23 μ g/100g) comparado com cajuí (136,13 μ g/100g), jatobá (110,68 μ g/100g) e macaúba (132,65 μ g/100g). Cardoso et al.⁹⁵ verificaram teor

superior de β -caroteno para cagaita do cerrado de Minas Gerais (390 $\mu\text{g}/100\text{g}$). Enquanto Santos¹⁰⁵ relatou teor inferior de β -caroteno para cagaita do cerrado Goianiense (88,67 $\mu\text{g}/100\text{g}$).

Os fenóis são potentes antioxidantes, evitam que as biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, ácidos graxos poli-insaturados e açúcares) sofram danos oxidativos através de reações mediadas por radicais livres¹¹⁹. Dentre seus efeitos benéficos estão incluídos ação anti-inflamatória, antidiabética, propriedades cardioprotetoras, neuroprotetoras, antitumorais e antienvhecimento¹²⁰. Santos¹⁰⁵ encontrou valor de 171,76 mg de ácido gálico equivalente/100g de polpa. Enquanto Rocha et al.¹¹⁸ obtiveram 111mg de ácido gálico equivalente/100g de polpa.

Segundo Guedes et al.¹²¹ o mineral mais abundante encontrado em cagaita madura foi o potássio (767,27 mg/100g), seguido pelo fósforo (75,53 mg/100g), cálcio (27,16 mg/100g) e magnésio (20,37 mg/100g). Foram relatados também menores valores para o zinco (0,76 mg/100g), ferro (0,91 mg/100g), manganês (0,41 mg/100g) e cobre (0,27 mg/100g). Enquanto Santos¹⁰⁵ encontrou valor de potássio (1220 mg/100g), fósforo(120 mg/100g), sódio (34,71 mg/100g), magnésio (150 mg/100g), cálcio (450 mg/100g), zinco(1,50 mg/100g), manganês (1,51 mg/100g), ferro (4,43 mg/100g) e cobre (1,65 mg/100g). Já Ribeiro¹⁰¹ relatou para polpa de cagaita com casca: potássio (75,83 mg/100g), fósforo(3,35 mg/100g), sódio(6,80 mg/100g), magnésio (5,92 mg/100g), alumínio (0,23 mg/100g), zinco (0,23 mg/100g), manganês (0,13 mg/100g), ferro (0,06 mg/1000g) e cobre (0,01 mg/100g). O possível motivo dessas variações nos resultados relatados pelos autores pode ser decorrente das condições climáticas do fruto, a procedência, grau de maturação, o tipo de solo, adição de adubos, processamento, entre outros fatores.

A cagaiteira possui grande potencial para utilização em sistemas de produção do agronegócio, sua boa produção favorece a exploração de populações nativas de forma sustentável. Seus frutos apresentam alto potencial para industrialização, portanto, o desenvolvimento de kefir saborizado com cagaita pode ser vantajoso do ponto de vista comercial, ambiental e nutricional.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir e caracterizar o Kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*).

3.2 Específicos

- Analisar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos das matérias-primas (leite UHT e polpa de cagaita).
- Produzir Kefir saborizado com polpa de cagaita, utilizando cultura congelada.
- Avaliar a composição físico-química e microbiológica do Kefir.
- Determinar a vida de prateleira do Kefir.
- Determinar o comportamento reológico do Kefir.
- Realizar análise colorimétrica do Kefir.
- Testar a aceitabilidade do Kefir por meio de análise sensorial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matérias-primas

Para a fabricação do Kefir foram utilizadas a cultura iniciadora eXact® KEFIR 12 (Christian Hansen, Hershholm, Dinamarca), contendo 12 bactérias em sua composição (*Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*) e a cultura iniciadora YoFlex® Harmony 1.0 (Christian Hansen, Hershholm, Dinamarca), contendo três bactérias em sua composição (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum* e *Streptococcus thermophilus*). Produzindo assim kefir com 14 bactérias. Ambas culturas, eXact® KEFIR 12 e YoFlex® Harmony 1.0, foram doadas pela empresa Chr. Hansen Ind. e Com. Ltda., Valinhos - SPP. O transporte da cultura eXact® KEFIR 12 foi realizado em caixa isotérmica contendo gelo seco, conforme instruções do fornecedor, e a mesma foi armazenada em ultrafreezer (-80°C) até o momento de seu fracionamento.

Foi utilizado leite UAT (Ultra Alta Temperatura) integral, adquirido em mercado varejista da cidade de Goiânia-Goiás. A polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*) foi obtida da Cooperativa Central do Cerrado Ltda., Sobradinho – DF, transportada em caixa isotérmica com gelo e armazenada em freezer com temperatura inferior a -18°C. A polpa de cagaita foi submetida a um processo de pasteurização a 90°C por 5 min¹²² em banho-maria, resfriada em banho de gelo e armazenada novamente em freezer (-18°C) até a data de cada processamento.

O açúcar cristal empregado nas formulações foi adquirido em mercado varejista da cidade de Goiânia - GO.

4.2. Fracionamento das culturas iniciadoras

A cultura eXact® KEFIR 12 (500U) é destinada à inoculação de cinco mil litros de leite. Como no experimento foram inoculados volumes de leite menores foi necessário realizar o fracionamento prévio da cultura em leite esterilizado. O leite esterilizado foi produzido adicionando 110g de leite em pó desnatado em um litro de água Milli-Q e autoclavado a 115°C por 10 min¹²³.

A embalagem da cultura eXact® KEFIR 12 foi retirado do ultrafreezer (-80°C) e todo o seu conteúdo (Figura 8) inoculado em um litro de leite esterilizado gelado, ± 4 °C, segundo recomendações do fabricante. A mistura foi homogeneizada e reservada (<10 °C) por dez minutos para hidratação completa dos grânulos. Posteriormente a mistura foi novamente homogeneizada e distribuída em microtubos de 2 ml (1,5 ml em cada microtubo). Após a distribuição, os microtubos foram congelados imediatamente em ultrafreezer (-80 °C).



Figura 8 - Grânulos da cultura eXact® KEFIR 12 imediatamente antes da diluição em leite esterilizado.

Fonte: Arquivo pessoal.

O fracionamento da cultura YoFlex® Harmony 1.0 (50 U) foi realizado seguindo a mesma metodologia descrita acima. No entanto, considerou-se que o conteúdo do pacote seria destinado à inoculação de 500 litros de leite. Desta forma o fracionamento foi realizado em volumes maiores (15 ml).

4.3 Formulação de Kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

O delineamento fatorial triplo foi utilizado para determinar as concentrações de polpa e açúcar das formulações. A partir do delineamento foram geradas nove formulações com diferentes concentrações de polpa de cagaita e açúcar (Tabela 1). Os teores de açúcar variaram de 0 a 12% e os teores de polpa de cagaita variaram de 0 a 20%. Dentre as nove formulações, três não continham polpa de cagaita em sua composição (A0P0, A10P0 e A5P0), e duas não continham açúcar em sua composição (A0P20 e A0P10).

Tabela 1 - Concentrações de açúcar e polpa das formulações de kefir saborizado com polpa de cagaita.

Formulações	Matérias-primas	
	Açúcar	Polpa de cagaita
A0P0	0%	0%
A0P10	0%	10%
A0P20	0%	20%
A5P0	5%	0%
A5P10	5%	10%
A5P20	5%	20%
A10P0	10%	0%
A10P10	10%	10%
A10P20	10%	20%

4.4. Fluxograma de fabricação do Kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

As nove formulações foram separadas, por sorteio, em três processamentos (1, 2 e 3), com intervalo de produção de duas semanas entre eles, com o intuito de possibilitar a logística das análises. No processamento 1, foram fabricadas as formulações A0P0, A10P20 e A5P0, no processamento 2 as formulações A10P0, A0P10 e A5P10 e no processamento 3 as formulações A0P20, A10P10 e A5P20.

As culturas iniciadoras, eXact® KEFIR 12 e YoFlex® Harmony 1.0, previamente fracionadas em leite esterilizado, foram retiradas do ultrafreezer (-80°C) e descongeladas à temperatura ambiente. As culturas foram então inoculadas assepticamente em leite UHT a 30°C armazenado em recipientes de aço inox esterilizados com capacidade de 10 litros, com tampa. Os recipientes, contendo o leite inoculado com as culturas, foram incubados em estufa a uma temperatura de 30°C por cerca de nove horas. Ao atingir pH 4,7, procedeu-se o resfriamento rápido por meio da imersão dos recipientes em água com gelo e a mistura (quebra do gel) com auxílio de uma colher de aço inox esterilizada levando cerca de cinco minutos para atingir a temperatura de 20°C. Neste momento foram adicionados polpa de cagaita pasteurizada e açúcar nas devidas proporções para cada formulação. Foi feita a mistura até obtenção de uma bebida homogênea e em seguida procedeu-se o envase, sendo este realizado assepticamente. A formulação foi envasada com auxílio de leiteiras de aço inox (dois litros) autoclavadas, distribuída em garrafas de vidro transparente (200ml) autoclavadas, deixando 10% de espaço vazio em cada garrafa. As garrafas foram fechadas

com tampas plásticas de rosca, com vedante e lacre de segurança, previamente sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio a 300ppm de cloro ativo, enxaguadas com solução de hipoclorito de sódio a 10ppm de cloro ativo e secas em cabine de segurança biológica sob luz ultravioleta. Logo após o envase, as garrafas foram acondicionadas em geladeira a 5°C.

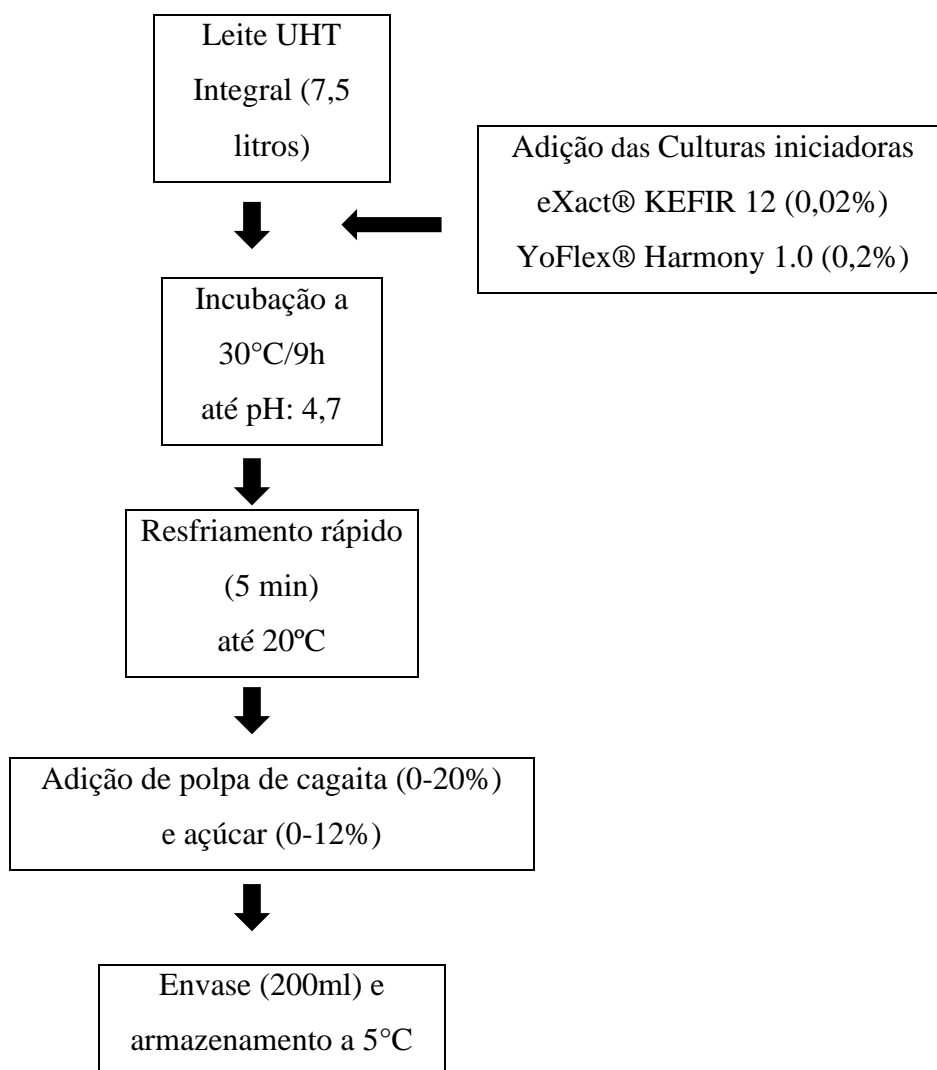


Figura 9 - Fluxograma de produção do kefir saborizado com polpa de cagaita.

4.5. Caracterização físico-química e microbiológica das matérias-primas (polpa de cagaita pasteurizada e leite UHT) e do kefir

As análises físico-químicas foram realizadas no Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

(CPA/EVZ/UFG). Foram realizadas, em triplicata, análises de acidez titulável, pH, teor de umidade, teor de cinzas, proteína total, teor de lipídios, carboidratos e valor energético.

As análises microbiológicas foram realizadas no Centro de Pesquisa em Alimentos, da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (CPA/EVZ/UFG). Foram realizadas análises de Número Mais Provável de coliformes a 35°C e 45°C, contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras, pesquisa *Salmonella* sp. e contagem de bactérias lácticas viáveis.

4.5.1. Caracterização físico-química

A acidez titulável da polpa de cagaita e do kefir foi definida por titulometria potenciométrica utilizando a metodologia da AOAC n° 942.15 B¹²⁴. A quantidade de 10g da amostra foi diluída e homogeneizada em água destilada isenta de gás carbônico (100 ml para polpa e 10 ml para o kefir) e titulada com solução de NaOH 0,1N, sob agitação, até atingir um pH entre 8,2 e 8,4. Sendo o resultado expresso em g/ml. O cálculo foi feito utilizando a seguinte equação: $\text{acidez} = V \times f \times N \times 100 / P$, em que V = volume em ml da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio, P = massa da amostra em g e N = normalidade da solução de hidróxido de sódio.

A acidez titulável do leite UHT foi determinada por titulometria, em que a quantidade de 10g da amostra foi diluída e homogeneizada em 10 ml de água destilada isenta de gás carbônico e titulada com solução de NaOH 0,1N, utilizando como indicador a fenolftaleína a 1%, sobre agitação, até o aparecimento da coloração rósea (aproximadamente 30 segundos)¹²⁴.

Os valores de pH do leite, da polpa de cagaita e do kefir foram determinados por leitura direta utilizando o potenciômetro Thermo Scientific modelo Orionstar (Singapore), segundo a metodologia n° 981.12 da AOAC¹²⁵.

O teor de umidade foi calculado segundo a metodologia estabelecida pela AOAC n° 926.12¹²⁴. Foram pesados 5g da amostra em cadinhos contendo pérolas de vidro. A secagem das amostras foi feita a 102 ± 2 °C na estufa Biovera MM Group Vacucell (Rio de Janeiro, RJ). As pesagens foram realizadas na balança analítica (AX200, Barueri, SP), até que as amostras nos cadinhos apresentassem peso constante. O cálculo foi feito utilizando a seguinte equação: $\text{umidade} = m \times 100 / m'$, em que m = a perda de massa em gramas e m' = massa da amostra em gramas.

O teor de cinzas foi definido seguindo as normas descritas na AOAC n° 900.02¹²⁴. Após a retirada da umidade as amostras foram incineradas a 550 °C na mufla EDG modelo EDG3P-S (São Carlos, SP), assim que resfriaram foram pesadas na balança analítica (AX200, Barueri, SP). O cálculo foi feito utilizando a seguinte equação: teor de cinzas = $(m_2 - m_1) \times 100 / m_0$, em que m_2 = massa do cadinho com amostra após incineração em gramas, m_1 = massa do cadinho vazio em gramas e m_0 = massa da amostra em gramas.

O teor de proteína total foi calculado em função da concentração de nitrogênio total pelo método Kjeldahl seguindo a metodologia estabelecida na AOAC n° 920.154¹²⁴. Este método baseia-se em três etapas; digestão, destilação e titulação. A digestão foi feita em bloco digestor (Tecnal TE-040/25, Piracicaba, SP) até atingir temperatura de 400°C e a amostra apresentar a coloração azul claro. A destilação foi feita no destilador (Tecnal TE-036/1, Piracicaba, SP) utilizando ácido bórico e 25ml de hidróxido de sódio a 50% e finalmente a destilação ocorre utilizando ácido sulfúrico 0,1N até a viragem do indicador. O fator de conversão de nitrogênio total em proteína utilizado para polpa de cagaita foi de 6,25 e para o leite e o kefir foi 6,38¹²⁶.

O teor de lipídios da polpa de cagaita foi determinado pelo método Bligh Dyer¹²⁷. Aproximadamente 3,5 g de amostra foi adicionada no tubo de ensaio, seguido de 10 ml de clorofórmio, 20 ml de álcool metílico e água (de acordo com o teor de umidade da amostra). As amostras foram agitadas por aproximadamente dois minutos e centrifugadas por dois minutos a 1200 rpm. A camada inferior foi retirada com ajuda da pipeta Pasteur e filtrada com 1 g de sulfato de sódio no papel filtro. Foi retirado aproximadamente 5 ml da amostra, secado na estufa a 100 ±2°C e calculado o teor de lipídios.

O teor de lipídios do leite UHT foi determinado seguindo o método de Gerber. Adicionou-se 10 ml de ácido sulfúrico no butirômetro, 11 ml de leite e 1 ml de álcool isoamílico. Posteriormente foram centrifugados a 1200 rpm durante 5 minutos e após ficarem cinco minutos em banho-maria foi feita a leitura diretamente na escala¹²⁶.

O teor de lipídios das bebidas kefir foi calculado pelo método de Rose-Gottlieb, seguindo a norma descrita na AOAC n° 952.96¹²⁴. Baseia-se no uso de hidróxido de amônio para solubilizar a caseína, neutralizar a acidez e reduzir a viscosidade; no álcool etílico para quebrar a emulsão gordura-caseína e na mistura éter etílico-éter de petróleo para extrair a gordura. O éter de petróleo é usado para diminuir a solubilidade das substâncias não lipídicas, solúveis no éter etílico. A gordura assim extraída é determinada gravimetricamente após evaporação dos solventes.

As análises de carboidratos do leite, da polpa de cagaita e do kefir foram calculadas por subtração usando a fórmula: $100 - \% \text{umidade} - \% \text{lipídios} - \% \text{proteína} - \% \text{de cinzas}$ ¹²⁸.

Os valores energéticos totais do leite, da polpa de cagaita e do kefir foram estimados usando a fórmula: $4 \text{ x g carboidrato} + 4 \text{ x g de proteína} + 9 \text{ x de lipídios}$ ¹²⁹.

4.5.2. Caracterização microbiológica

Foi utilizada a metodologia estabelecida no Compendium of Methods 5ª edição 2015¹³⁰ nas análises de Número Mais Provável de coliformes a 35°C e 45°C, contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e bolores e leveduras. A técnica do número mais provável é um método de análise quantitativo que permite determinar o número mais provável do microrganismo alvo na amostra, por meio da inoculação de alíquotas dessa amostra em tubos múltiplos, contendo os meios de cultura adequados (Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) e Caldo *E. coli* (EC)). A contagem total de aeróbios mesófilos, também denominada contagem padrão em placas, foi realizada por plaqueamento em profundidade em ágar padrão para contagem (PCA) e incubação a 35°C por 48 horas. A contagem de bolores e leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície em Ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) e incubação a 25°C por cinco dias.

A metodologia definida para pesquisa de *Salmonella* sp. foi da ISO 6785 (IDF 93:2001)¹³¹ e para contagem de bactérias lácticas viáveis utilizou-se a metodologia definida na ISO 15214:1998¹³², que consiste no plaqueamento em profundidade em ágar de Man Rogosa & Sharpe (MRS) e incubação a 37°C por 72 horas em microaerofilia.

4.6. Análise colorimétrica do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

A avaliação objetiva da cor do kefir foi realizada com ajuda do colorímetro portátil da marca Konica Minolta (Japan), modelo BC-10, utilizando o método CieLAB L* a* b*, criado pela *Commission Internationale de L'Eclairage*. O método baseia-se na capacidade de expressar numericamente as cores. A avaliação da cor foi realizada tendo como fonte de luz lâmpada fluorescente tubular. No sistema L*, a*, b*, o valor L*, eixo vertical corresponde a luminosidade, oscilando de branco (100) a preto (0), o valor a* representa o ponto no eixo que vai de vermelho (+) a verde (-), e o valor b* o ponto no eixo

que vai de amarelo (+) a azul (-)¹³³. As medições das cores foram realizadas 24 horas após cada processamento, sendo feitas três leituras de cada formulação para os valores L*, a* e b*.

4.7. Avaliação reológica do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

O comportamento reológico das amostras foi executado no Laboratório Multiusuário de Análises de Textura, Reologia e HPLC “LabMulti” da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás. Utilizou-se o reômetro Physica, MCR 101 (Anton Parr, Ostfildern, Baden-Württemberg, Germany). Uma alíquota da amostra foi inoculada e espalhada na superfície da placa horizontal e o excesso da amostra retirado. Todas as amostras foram examinadas a 5°C, mantidas por um sistema termostático instalado no reômetro, com três repetições.

4.8. Avaliação sensorial do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

A análise sensorial foi realizada após a aprovação do projeto no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, sob parecer nº 2.729.268 (Anexo I). O produto elaborado foi mantido sob refrigeração. As análises sensoriais foram feitas sete dias após o processamento, após a avaliação dos resultados das análises microbiológicas, para garantir a segurança do produto oferecido aos provadores.

Os participantes não treinados da pesquisa foram recrutados voluntariamente, entre eles alunos de graduação, pós-graduação e funcionários da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás. Aqueles participantes que informaram ter alergia ou intolerância a qualquer um dos ingredientes do produto, leite, açúcar e polpa de cagaita, assim como aqueles que apresentavam qualquer tipo de doença que impedia o consumo de um ou mais ingredientes do produto, não participaram da pesquisa. Todos os participantes receberam um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II) contendo as informações sobre a pesquisa, e assinaram o Termo concordando em participar, sendo informados que poderiam desistir de participar da pesquisa sem prejuízos ou constrangimento.

As amostras de kefir foram analisadas pelo teste de aceitação pelo consumidor usando uma ficha de avaliação sensorial com escala hedônica de nove pontos (Anexo III) para parâmetros como aparência, cor, aroma, sabor, consistência e impressão global, onde os extremos correspondem a “desgostei extremamente” (1) e “gostei extremamente” (9).

Também foi avaliada a intenção de compra, utilizando uma escala de cinco pontos, onde os extremos correspondem a “eu certamente não compraria” (1) e “eu certamente compraria” (5).

A análise sensorial foi feita com 125 participantes não-treinados maiores de 18 anos que avaliaram as diferentes formulações, em cabines individuais e dentro de uma sala iluminada com luz branca (fluorescente). As amostras foram entregues refrigeradas (aproximadamente 12°C), em copos plásticos descartáveis de 50 ml, de cor branca. Cada copo continha em torno de 30 ml de cada amostra, codificados com números aleatórios de três dígitos e foi disponibilizado junto com a amostra a ficha de avaliação sensorial com escala hedônica, bem como água e bolacha para limpeza do palato.

4.9. Análise estatística

Para os resultados das análises físico-químicas das matérias-primas (leite e cagaita) e das análises físico-químicas de vida de prateleira do kefir (pH e acidez), utilizou-se o esquema de parcelas subdivididas em delineamento inteiramente ao acaso. Os resultados obtidos das análises foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Para os resultados da análise sensorial utilizou-se o teste não paramétrico *Kruskall-Wallis*. Também foi realizada análise de correlação de *Spearman* dos atributos avaliados visualmente (cor, impressão global e intenção de compra) com valores obtidos por análise colorimétrica (L^* , a^* e b^*). Para todas estas análises estatísticas citadas anteriormente utilizou-se o software estatístico R version 3.4.1 (R CORE TEAM, 2017)¹³⁴.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização físico-química das matérias-primas

Em cada processamento (1, 2 e 3), realizou-se a caracterização físico-química das matérias-primas. Os resultados das análises físico-químicas do leite UHT estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização físico-química do leite UHT (médias \pm desvio padrão, n=3).

Análises físico-químicas	Processamento 1	Processamento 2	Processamento 3
pH	6,693 \pm 0,015 ^b	6,790 \pm 0,017 ^a	6,780 \pm 0,000 ^a
Acidez (g de ácido láctico/100g)	0,165 \pm 0,001 ^a	0,152 \pm 0,001 ^a	0,158 \pm 0,001 ^a
Umidade (%)	88,133 \pm 0,010 ^b	88,324 \pm 0,052 ^a	88,402 \pm 0,032 ^a
Cinzas (%)	0,728 \pm 0,000 ^c	0,825 \pm 0,014 ^a	0,763 \pm 0,011 ^b
Proteína (%)	3,076 \pm 0,020 ^a	2,979 \pm 0,020 ^b	2,969 \pm 0,040 ^b
Lipídios (%)	3,100 \pm 0,000 ^a	3,100 \pm 0,000 ^a	3,100 \pm 0,000 ^a
Carboidratos (%)	4,963 \pm 0,010 ^a	4,772 \pm 0,046 ^b	4,766 \pm 0,075 ^b
Valor energético total (kcal)	60,058 \pm 0,040 ^a	58,903 \pm 0,193 ^b	58,841 \pm 0,124 ^b

As médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observou-se diferenças estatisticamente significativas em relação aos valores de pH, umidade, proteína, carboidratos e valor energético total do processamento 1 em relação aos processamentos 2 e 3. O leite utilizado nos três processamentos era da mesma marca, mas o lote de produção do leite do processamento 1 foi diferente do lote de produção do leite dos processamentos 2 e 3, sendo este o possível motivo das diferenças observadas nos resultados. O leite utilizado nos três processamentos estava de acordo com os requisitos físico-químicos estabelecidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (UHT) na Portaria N° 146, de 07 de março de 1996¹³⁵.

Os resultados das análises físico-químicas da polpa de cagaita pasteurizada estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização físico-química da polpa de cagaita pasteurizada (médias \pm desvio padrão, n=3).

Análises físico-químicas	Processamento	Processamento	Processamento
	1	2	3
pH	2,997 \pm 0,005 ^c	3,080 \pm 0,000 ^a	3,050 \pm 0,000 ^b
Acidez (g ácido cítrico/100g)	12,416 \pm 0,001 ^a	12,353 \pm 0,050 ^a	12,351 \pm 0,058 ^a
Umidade (%)	91,811 \pm 0,140 ^b	92,323 \pm 0,025 ^a	92,303 \pm 0,092 ^a
Cinzas (%)	0,261 \pm 0,000 ^c	0,364 \pm 0,010 ^a	0,2933 \pm 0,009 ^b
Proteína (%)	1,156 \pm 0,010 ^a	1,158 \pm 0,000 ^a	1,155 \pm 0,010 ^a
Lipídios (%)	0,166 \pm 0,000 ^a	0,1651 \pm 0,000 ^a	0,164 \pm 0,000 ^a
Carboidratos (%)	6,606 \pm 0,147 ^a	5,990 \pm 0,023 ^b	6,084 \pm 0,102 ^b
Valor energético total (kcal)	32,540 \pm 0,559 ^a	30,078 \pm 0,094 ^b	30,438 \pm 0,388 ^b

As médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

A polpa de cagaita utilizada nos três processamentos era do mesmo lote de fabricação, foram pasteurizadas no mesmo dia e mantidas congeladas ($< -18^{\circ}\text{C}$) até a data de cada processamento. As pequenas diferenças observadas entre os resultados dos três processamentos poderiam ser explicadas por diferenças no período de congelamento.

Observa-se no Quadro 1 a composição centesimal da polpa de cagaita reportada por diferentes autores.

Quadro 1 - Comparação da composição centesimal da polpa de cagaita em diferentes trabalhos.

Composição centesimal	Silva et al.⁹⁹	Cardoso et al.⁹⁵	Rocha et al.¹¹⁸	Pfrimer¹³⁶	Dados obtidos
pH	-	-	-	3,22 ± 0,05	3,04 ± 0,04
Acidez (g ácido cítrico/100g)	-	-	-	15,22 ± 0,12	12,37 ± 0,04
Umidade (%)	94,34 ± 0,06	91,56	90,9 ± 8,4	91,90 ± 0,03	92,15 ± 0,26
Cinzas (%)	0,28 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,30 ± 0,10	0,40 ± 0,01	0,31 ± 0,05
Lipídios (%)	0,44 ± 0,03	0,57 ± 0,05	0,57	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,00
Proteína (%)	0,82 ± 0,07	0,63 ± 0,09	2,5 ± 0,2	1,17 ± 0,01	1,16 ± 0,01
Carboidratos (%)	3,08 ± 0,08	5,54 ± 0,65	5,9 ± 1,7	6,38 ± 0,00	6,23 ± 0,30
Valor energético total (kcal)	20,01	29,83 ± 3,43	36,6 ± 7,2	31,59 ± 0,07	31,02 ± 1,20
Origem cagaita (Estado)	Goiás	Minas Gerais	Piauí	Minas Gerais	Minas Gerais

As características físico-químicas foram semelhantes às encontradas por Pfrimer¹³⁶. O teor de umidade e valor energético total foram análogos aos encontrados por Cardoso et al.⁹⁵ e os teores de umidade, cinzas e carboidratos aos observados por Rocha et al.¹¹⁸ Os resultados das análises físico-químicas da cagaita diferiram dos resultados apresentados por Silva et al.⁹⁹ exceto para o teor de cinzas, que foi semelhante. As diferenças nos resultados encontrados nos diferentes trabalhos podem ser devido ao grau de maturação da fruta, procedência, clima, solo, e tipo de processamento da polpa.

5.2. Caracterização microbiológica das matérias-primas

Nos três processamentos realizou-se a caracterização microbiológica do leite UHT e da polpa de cagaita utilizados na produção do kefir (Tabelas 4 e 5). As análises foram feitas no dia de cada processamento, juntamente com as análises microbiológicas das formulações fabricadas naquele processamento.

Tabela 4 - Análise de coliformes a 35°C e a 45°C e Pesquisa de *Salmonella* sp. das matérias-primas leite UHT e polpa de cagaita (n=2).

Matérias-primas	Processamento	Coliformes a 35°C (NMP/ml)	Coliformes a 45°C (NMP/ml)	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. (em 25g)
Leite UHT	1	< 3,0	< 3,0	Ausência
Leite UHT	2	< 3,0	< 3,0	Ausência
Leite UHT	3	< 3,0	< 3,0	Ausência
Polpa de cagaita	1	< 3,0	< 3,0	Ausência
Polpa de cagaita	2	< 3,0	< 3,0	Ausência
Polpa de cagaita	3	< 3,0	< 3,0	Ausência

Tabela 5 - Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos e contagem de bolores e leveduras das matérias-primas leite UHT e polpa de cagaita (médias ± desvio padrão, n=2).

Matérias-primas	Processamento	Contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos (UFC/ml)	Contagem de bolores e leveduras (UFC/ml)
Leite UHT	1	$1,0 \times 10^1 \pm 0,00$	$<1,0 \times 10^2 \pm 0,00$
Leite UHT	2	$3,3 \times 10^4 \pm 0,14$	$<1,0 \times 10^2 \pm 0,00$
Leite UHT	3	$2,1 \times 10^4 \pm 0,14$	$<1,0 \times 10^2 \pm 0,00$
Polpa de cagaita	1	$1,35 \times 10^2 \pm 0,07$	$<1,0 \times 10^2 \pm 0,00$
Polpa de cagaita	2	$1,45 \times 10^2 \pm 0,49$	$<1,0 \times 10^2 \pm 0,00$
Polpa de cagaita	3	$1,15 \times 10^2 \pm 0,07$	$<1,0 \times 10^2 \pm 0,00$

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite UAT (UHT) aprovado pela Portaria N° 146, de 07 de março de 1996 estabelece como requisito microbiológico uma contagem de aeróbios mesófilos com limite máximo aceitável de $1,0 \times 10^2$ UFC/ml¹³⁵. Com base nesse valor, o leite UHT utilizado no processamento 1 estava de acordo com a legislação, porém o leite UHT dos processamentos 2 e 3 estava em desacordo com a legislação, com valor superior ao limite máximo aceitável. Tal alteração não constitui risco microbiológico, uma vez que o kefir também pode ser feito a partir de leite pasteurizado, cujo padrão microbiológico é de 4×10^4 UFC/ml¹³⁷.

A polpa de cagaita pasteurizada utilizada nos três processamentos estava em acordo com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa N° 01 de 7 de janeiro de 2000, que aprovou o Regulamento Técnico Geral para fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta¹³⁸.

5.3. Curva de fermentação do kefir

A fermentação do leite com as culturas iniciadoras foi à temperatura de 30°C até atingir o pH 4,7, o que levou cerca de 9 horas (Figura 10). Tempo maior foi observado por Barukcik et al.⁵⁸ em que o processo de fermentação do kefir produzido a partir de cultura iniciadora (XPL-1 eXact®, Christian Hansen, Hershholm, Dinamarca), independentemente da temperatura de fermentação utilizada (25°C ou 35°C), durou aproximadamente 12 horas. Esta diferença no tempo de fermentação pode ser explicada devido à diferença na composição microbiana das culturas iniciadoras. A XPL-1 eXact® continha cinco micro-organismos (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Leuconostoc* sp.), enquanto a cultura iniciadora utilizada no presente trabalho totalizou 14 micro-organismos.

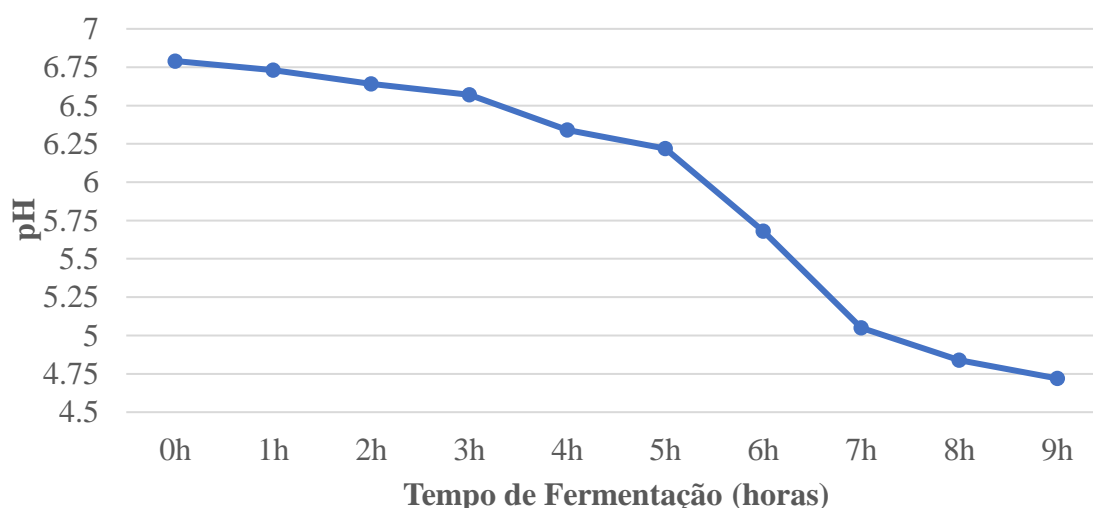


Figura 10 - Curva de fermentação do kefir incubado a 30°C.

As bactérias lácticas metabolizam a lactose presente no leite para suprir suas necessidades energéticas, formando ácido láctico. A produção gradual de ácido láctico e consequente diminuição do pH resulta numa redução da carga superficial (potencial zeta) da micela de caseína a partir da carga líquida negativa a pH 6,7 do leite para perto de carga

neutra com a aproximação do ponto isoelétrico da caseína, em torno de pH 4,6, dependendo da temperatura. Esta mudança na carga superficial das micelas de caseína com a diminuição do pH provoca uma redução na repulsão eletrostática o que permite que as micelas de caseína se agreguem através de ligações hidrofóbicas ocorrendo a formação do gel que constitui o kefir (coagulação do leite)¹³⁹.

5.4. Caracterização físico-química do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

As bebidas kefir foram preparadas a partir de diferentes teores de açúcar (x_1) e polpa de cagaita (x_2), que foram considerados como variáveis “independentes”, e como variáveis resposta, “dependentes”, analisou-se a composição físico-química do kefir (umidade, cinzas, proteína, lipídeos, carboidratos, VET, pH e acidez). Na Tabela 6 estão apresentados os resultados das análises físico-químicas das bebidas kefir no dia 1 (24 horas após processamento).

Tabela 6 - Caracterização físico-química do kefir saborizado com polpa de cagaita no dia 1 (médias \pm desvio padrão, n=3).

F	pH	Acidez (g ácido lático/100g)	Umidade (%)	Cinzas (%)	Proteína (%)	Carboidratos (%)	Lipídios (%)	Valor energético (kcal)
A0P0	4,60 \pm 0,01 ^a	0,79 \pm 0,01 ^b	88,87 \pm 0,03 ^b	0,91 \pm 0,01 ^a	3,32 \pm 0,04 ^a	4,28 \pm 0,05 ^g	2,62 \pm 0,03 ^a	54,00 \pm 0,24 ^f
A0P10	4,43 \pm 0,01 ^e	0,75 \pm 0,01 ^{cd}	89,14 \pm 0,01 ^a	0,82 \pm 0,001 ^c	2,93 \pm 0,02 ^{df}	4,79 \pm 0,01 ^f	2,32 \pm 0,01 ^b	51,76 \pm 0,10 ^g
A0P20	4,37 \pm 0,01 ^f	0,76 \pm 0,01 ^c	89,39 \pm 0,32 ^a	0,75 \pm 0,04 ^d	3,03 \pm 0,03 ^{bc}	4,38 \pm 0,26 ^{fg}	2,44 \pm 0,03 ^{ab}	51,62 \pm 1,28 ^g
A5P0	4,55 \pm 0,02 ^b	0,85 \pm 0,004 ^a	83,40 \pm 0,10 ^e	0,82 \pm 0,03 ^{bc}	2,97 \pm 0,03 ^{cde}	10,47 \pm 0,02 ^c	2,29 \pm 0,03 ^b	74,38 \pm 0,32 ^c
A5P10	4,36 \pm 0,01 ^f	0,74 \pm 0,02 ^{ce}	84,99 \pm 0,03 ^d	0,79 \pm 0,01 ^{cd}	2,94 \pm 0,01 ^{df}	9,02 \pm 0,21 ^d	2,26 \pm 0,18 ^b	68,20 \pm 0,84 ^d
A5P20	4,35 \pm 0,01 ^f	0,73 \pm 0,001 ^{de}	86,12 \pm 0,01 ^c	0,66 \pm 0,01 ^e	3,00 \pm 0,04 ^{bd}	7,84 \pm 0,12 ^e	2,39 \pm 0,14 ^{ab}	64,84 \pm 0,65 ^e
A10P0	4,48 \pm 0,01 ^{cd}	0,72 \pm 0,01 ^e	82,45 \pm 0,23 ^f	0,87 \pm 0,02 ^b	2,91 \pm 0,02 ^{ef}	11,49 \pm 0,20 ^b	2,29 \pm 0,001 ^b	78,16 \pm 0,86 ^b
A10P10	4,51 \pm 0,01 ^c	0,72 \pm 0,01 ^e	81,98 \pm 0,04 ^g	0,66 \pm 0,00 ^e	2,88 \pm 0,03 ^f	12,08 \pm 0,06 ^a	2,40 \pm 0,09 ^{ab}	81,46 \pm 0,53 ^a
A10P20	4,47 \pm 0,01 ^d	0,73 \pm 0,02 ^e	82,24 \pm 0,05 ^{fg}	0,82 \pm 0,01 ^{bc}	3,08 \pm 0,02 ^b	11,53 \pm 0,04 ^b	2,35 \pm 0,01 ^{ab}	79,64 \pm 0,03 ^{ab}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

Maiores diferenças entre as nove formulações foram observadas em relação ao teor de umidade. As bebidas que apresentaram menor teor de umidade foram A10P10, A10P20 e A10P0, 81,98%, 82,24% e 82,45%, respectivamente, todas com 10% de açúcar em sua composição. Por outro lado, as bebidas A0P20, A0P10 e A0P0 foram as que apresentaram maior teor de umidade, 89,39%, 89,14% e 88,87%, respectivamente, o que pode ser explicado por estas não possuírem açúcar em suas composições.

Em relação ao teor proteína do kefir, a formulação A0P0 foi a que apresentou maior teor de proteína, 3,32%, seguida das formulações A10P20, A0P20 e A5P20 com teores de 3,08%, 3,03% e 3,00%, respectivamente. A formulação A0P0 apresentou o maior teor de lipídios, de 2,62%.

As formulações A10P0, A10P20 e A10P10 foram as que apresentaram maiores teores de carboidratos e valor energético total. Isto pode ser explicado pelo maior teor de açúcar nestas formulações (10%). Já as formulações A0P0, A0P20 e A0P10, todas sem açúcar, apresentaram os menores valores de carboidratos e valor energético total.

Os valores de pH das amostras produzidas, que variaram de 4,35 a 4,6 com 1 dia de armazenamento, não diferiram daqueles usualmente detectados no kefir. Barukcik et al.⁵⁸ produziram kefir utilizando grãos de kefir, cultura iniciadora e suas combinações, a 25°C e 35°C, e encontraram valores de pH variando de 4,58 a 4,65. Magalhães et al.¹³ produziram kefir utilizando grãos de kefir em diferentes substratos (leite, soro de queijo e soro de queijo desproteínizado) e relataram valores de pH de 4,3 após 28 horas de fermentação a 25°C para todos os substratos. Ozdestan e Uren¹⁴⁰ analisaram dez amostras de kefir fornecidas por diferentes fabricantes na Turquia na primeira semana de vida de prateleira e encontraram valores de pH entre 4,11 e 4,53. Leite et al.⁴ analisaram kefir brasileiro produzido com grãos de kefir e observaram valores de pH em torno de 4,85 após 24 horas de fermentação a 25°C. Irigoyen et al.¹⁴¹ relataram que o pH do kefir, com taxa de inoculação de 5% de grãos de kefir, foi de 4,4 após 24 horas de fermentação a 25°C. Gul et al.¹⁴² avaliaram amostras de kefir feitas com leite de búfala e leite de vaca, usando cultura iniciadora e grãos de kefir, incubadas a 24°C por 18 horas, em que os valores de pH variaram de 4,26 a 4,64. O ponto de parada da fermentação (pH), o tempo de resfriamento e a capacidade de pós-acidificação das culturas utilizadas podem influenciar nos valores de pH do kefir.

A acidez titulável dos tratamentos variou de 0,72% a 0,85% com 1 dia de armazenamento. No trabalho de Barukcik et al.⁵⁸ os valores obtidos de acidez titulável variaram de $0,686 \pm 0,012\%$ (amostra produzida por grãos de kefir a 35 °C) a $0,803 \pm 0,048\%$

(amostra produzida por cultura iniciadora a 25 ° C). Resultados semelhantes, entre 0,64% e 0,76%, foram obtidos por Gul et al.¹⁴² em amostras de kefir produzidas com leite de vaca e búfala com grãos de kefir e cultura iniciadora.

5.5. Caracterização microbiológica do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

Na Tabela 7 estão apresentados os resultados das análises microbiológicas (análise de coliformes a 35°C e 45°C, pesquisa de *Salmonella* sp. e contagem de bolores e leveduras) das formulações realizadas. Nos dias dos seus respectivos processamentos todas as formulações estavam dentro dos limites estabelecidos pela Instrução Normativa n°46, de 23 de outubro de 2007².

Tabela 7 - Análise de coliformes a 35°C e a 45°C, pesquisa de *Salmonella* sp. e contagem de bolores e leveduras de kefir no dia de fabricação (médias ± desvio padrão, n=2)

Formulações do kefir	Análise de coliformes a 35°C (NMP/ml)	Análise de coliformes a 45°C (NMP/ml)	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. (em 25g)	Contagem de bolores e leveduras (UFC/ml)
A0P0	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A0P10	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A0P20	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A5P0	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A5P10	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A5P20	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A10P0	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A10P10	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00
A10P20	<3	<3	Ausência	<1x10 ² ± 0,00

5.6. Vida de prateleira do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

Os resultados de pH e acidez ao longo de oito semanas de vida de prateleira do kefir podem ser observados nas Figuras 11 e 12 e Tabelas 8 e 9.

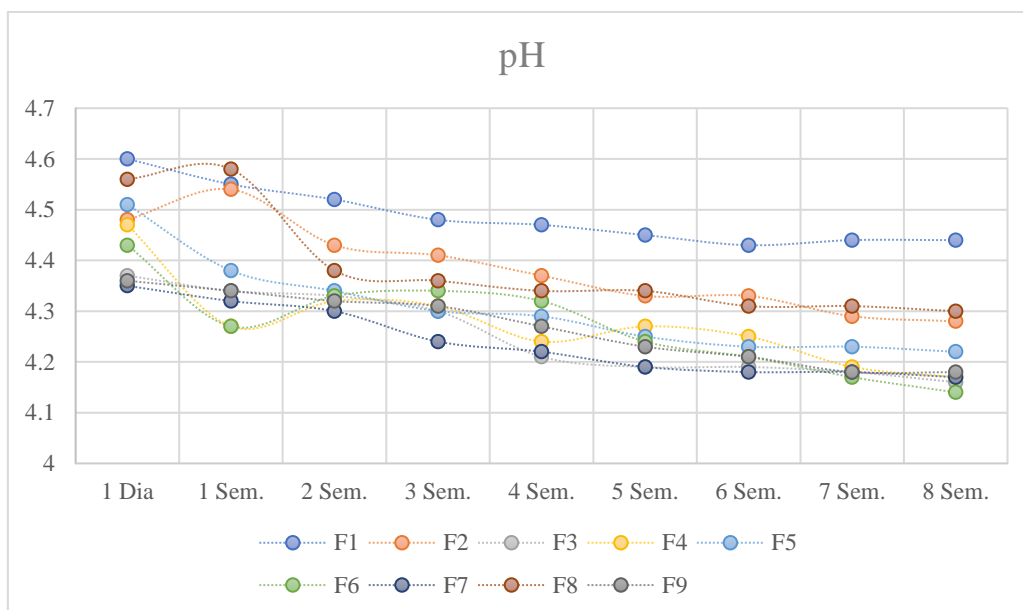


Figura 11 - Valores de pH das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira.

Tabela 8 - Valores de pH das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira (médias \pm desvio padrão, n=3).

Formulações	1 Dia	1 Sem.	2 Sem.	3 Sem.	4 Sem.	5 Sem.	6 Sem.	7 Sem.	8 Sem.
A0P0	4,60 \pm 0,01 ^{aA}	4,55 \pm 0,01 ^{bB}	4,52 \pm 0,01 ^{cA}	4,48 \pm 0,01 ^{dA}	4,47 \pm 0,01 ^{dA}	4,45 \pm 0,01 ^{eA}	4,43 \pm 0,01 ^{fA}	4,44 \pm 0,01 ^{efA}	4,44 \pm 0,01 ^{efA}
A0P10	4,43 \pm 0,01 ^{aE}	4,27 \pm 0,01 ^{cE}	4,33 \pm 0,01 ^{bDE}	4,34 \pm 0,01 ^{bD}	4,32 \pm 0,01 ^{bC}	4,24 \pm 0,01 ^{dDE}	4,21 \pm 0,01 ^{eD}	4,17 \pm 0,01 ^{fE}	4,14 \pm 0,00 ^{gF}
A0P20	4,37 \pm 0,01 ^{aF}	4,34 \pm 0,02 ^{bD}	4,33 \pm 0,01 ^{bDE}	4,30 \pm 0,01 ^{cE}	4,21 \pm 0,01 ^{dG}	4,19 \pm 0,01 ^{deF}	4,19 \pm 0,01 ^{eE}	4,18 \pm 0,00 ^{efE}	4,16 \pm 0,01 ^{fE}
A5P0	4,56 \pm 0,01 ^{bB}	4,58 \pm 0,01 ^{aA}	4,38 \pm 0,01 ^{cC}	4,36 \pm 0,01 ^{dC}	4,34 \pm 0,01 ^{eC}	4,34 \pm 0,01 ^{deB}	4,31 \pm 0,01 ^{fB}	4,31 \pm 0,01 ^{fB}	4,30 \pm 0,01 ^{fB}
A5P10	4,36 \pm 0,01 ^{aFG}	4,34 \pm 0,01 ^{bD}	4,32 \pm 0,01 ^{cE}	4,31 \pm 0,01 ^{cE}	4,27 \pm 0,01 ^{dE}	4,23 \pm 0,00 ^{eE}	4,21 \pm 0,01 ^{eD}	4,18 \pm 0,00 ^{fE}	4,18 \pm 0,00 ^{fE}
A5P20	4,35 \pm 0,01 ^{aG}	4,32 \pm 0,00 ^{bD}	4,30 \pm 0,01 ^{cF}	4,24 \pm 0,00 ^{dF}	4,22 \pm 0,00 ^{eG}	4,19 \pm 0,01 ^{fF}	4,18 \pm 0,01 ^{fE}	4,18 \pm 0,00 ^{fE}	4,17 \pm 0,00 ^{fE}
A10P0	4,48 \pm 0,01 ^{bD}	4,54 \pm 0,01 ^{aB}	4,43 \pm 0,01 ^{cB}	4,41 \pm 0,01 ^{dB}	4,37 \pm 0,01 ^{eB}	4,33 \pm 0,01 ^{fB}	4,33 \pm 0,01 ^{fB}	4,29 \pm 0,01 ^{gC}	4,28 \pm 0,01 ^{gC}
A10P10	4,51 \pm 0,01 ^{aC}	4,38 \pm 0,01 ^{bC}	4,34 \pm 0,01 ^{cD}	4,30 \pm 0,01 ^{dE}	4,29 \pm 0,01 ^{dD}	4,25 \pm 0,00 ^{eD}	4,23 \pm 0,01 ^{efC}	4,23 \pm 0,00 ^{efD}	4,22 \pm 0,01 ^{efD}
A10P20	4,47 \pm 0,01 ^{aD}	4,27 \pm 0,01 ^{cE}	4,32 \pm 0,02 ^{bE}	4,31 \pm 0,02 ^{bE}	4,24 \pm 0,01 ^{dF}	4,27 \pm 0,00 ^{cC}	4,25 \pm 0,01 ^{dC}	4,19 \pm 0,01 ^{eE}	4,17 \pm 0,01 ^{eE}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

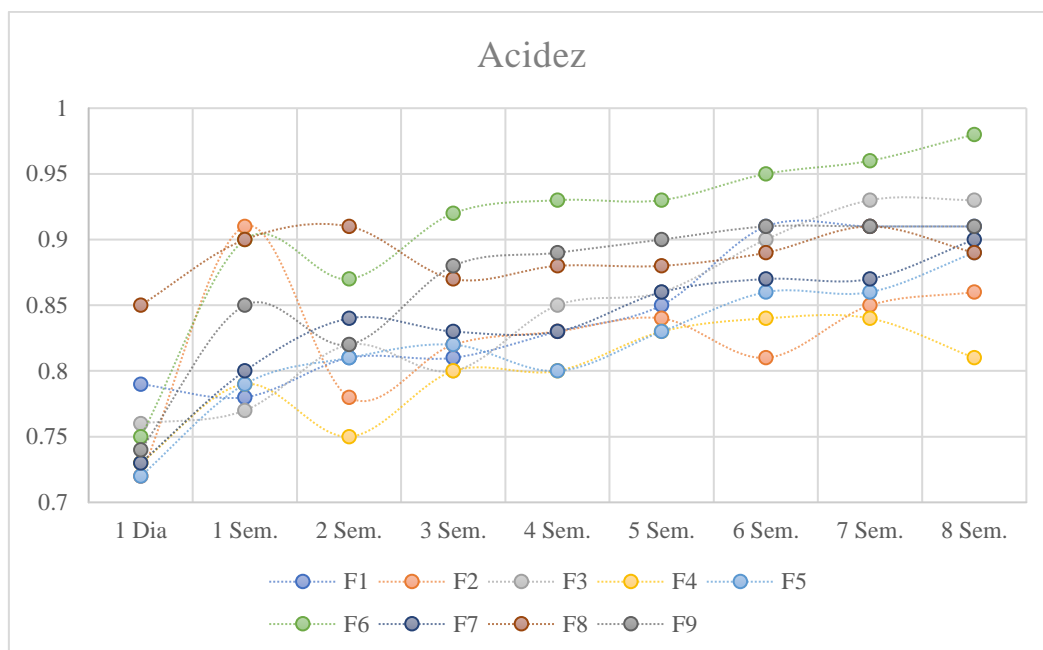


Figura 12 - Valores de acidez (% ácido láctico) das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira.

Tabela 9 - Valores de acidez (% ácido láctico) das nove formulações do kefir saborizado com cagaita ao longo de oito semanas de vida de prateleira (médias \pm desvio padrão, n=3).

F	1 Dia	1 Sem.	2 Sem.	3 Sem.	4 Sem.	5 Sem.	6 Sem.	7 Sem.	8 Sem.
A0P0	0,79 \pm 0,01 ^{eB}	0,78 \pm 0,00 ^{eE}	0,81 \pm 0,00 ^{dD}	0,81 \pm 0,00 ^{dDE}	0,83 \pm 0,00 ^{cDE}	0,85 \pm 0,00 ^{bDE}	0,91 \pm 0,01 ^{aB}	0,91 \pm 0,01 ^{aC}	0,91 \pm 0,01 ^{aCD}
A0P10	0,75 \pm 0,01 ^{fCD}	0,90 \pm 0,00 ^{dAB}	0,87 \pm 0,01 ^{eB}	0,92 \pm 0,01 ^{cA}	0,93 \pm 0,00 ^{cA}	0,93 \pm 0,00 ^{cA}	0,95 \pm 0,00 ^{bA}	0,96 \pm 0,00 ^{bA}	0,98 \pm 0,01 ^{aA}
A0P20	0,76 \pm 0,01 ^{gC}	0,77 \pm 0,00 ^{fE}	0,82 \pm 0,01 ^{dD}	0,80 \pm 0,01 ^{eE}	0,85 \pm 0,00 ^{cD}	0,86 \pm 0,01 ^{cD}	0,90 \pm 0,00 ^{bBC}	0,93 \pm 0,00 ^{aB}	0,93 \pm 0,01 ^{aB}
A5P0	0,85 \pm 0,00 ^{dA}	0,89 \pm 0,00 ^{bB}	0,91 \pm 0,00 ^{aA}	0,87 \pm 0,00 ^{cB}	0,87 \pm 0,00 ^{cC}	0,88 \pm 0,00 ^{bcC}	0,89 \pm 0,00 ^{bc}	0,91 \pm 0,01 ^{aBC}	0,92 \pm 0,02 ^{aBC}
A5P10	0,74 \pm 0,01 ^{gCE}	0,85 \pm 0,00 ^{cC}	0,82 \pm 0,00 ^{fCD}	0,88 \pm 0,00 ^{dB}	0,89 \pm 0,00 ^{cdB}	0,90 \pm 0,01 ^{bcB}	0,91 \pm 0,00 ^{bB}	0,91 \pm 0,00 ^{bc}	0,93 \pm 0,01 ^{aBC}
A5P20	0,73 \pm 0,00 ^{eDEF}	0,80 \pm 0,01 ^{dD}	0,84 \pm 0,00 ^{cC}	0,83 \pm 0,00 ^{cC}	0,83 \pm 0,00 ^{cE}	0,86 \pm 0,00 ^{bCD}	0,87 \pm 0,01 ^{bD}	0,87 \pm 0,00 ^{bD}	0,90 \pm 0,01 ^{aDE}
A10P0	0,72 \pm 0,01 ^{gF}	0,91 \pm 0,00 ^{aA}	0,78 \pm 0,00 ^{fE}	0,82 \pm 0,01 ^{dCD}	0,83 \pm 0,01 ^{dE}	0,84 \pm 0,01 ^{cdEF}	0,81 \pm 0,01 ^{eF}	0,85 \pm 0,00 ^{bcE}	0,86 \pm 0,00 ^{bF}
A10P10	0,72 \pm 0,01 ^{fEF}	0,79 \pm 0,01 ^{eDE}	0,81 \pm 0,01 ^{dD}	0,82 \pm 0,01 ^{cdCE}	0,80 \pm 0,01 ^{deF}	0,83 \pm 0,01 ^{cF}	0,86 \pm 0,00 ^{bDE}	0,86 \pm 0,01 ^{bDE}	0,89 \pm 0,02 ^{aE}
A10P20	0,73 \pm 0,00 ^{eEF}	0,79 \pm 0,01 ^{cDE}	0,75 \pm 0,01 ^{dF}	0,80 \pm 0,00 ^{bcE}	0,80 \pm 0,01 ^{bcF}	0,83 \pm 0,00 ^{aF}	0,84 \pm 0,01 ^{aE}	0,84 \pm 0,01 ^{aE}	0,81 \pm 0,01 ^{bG}

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

Numericamente as formulações tiveram uma pequena redução do pH e pequeno aumento da acidez ao longo das oito semanas de vida de prateleira. A queda do pH e o aumento da acidez do Kefir durante o armazenamento refrigerado (5°C) são decorrentes da pós-acidificação e estão relacionados à metabolização da lactose pela microbiota contida no produto¹⁴³.

Irigoyen et al.¹⁴¹ produziram kefir a partir de grãos de kefir e observaram que o pH não variou significativamente durante os 28 dias de armazenamento a 5°C±1°C. De acordo com Montanuci et al.¹⁴⁴ o pH das formulações de Kefir fermentadas com cultura iniciadora inicialmente caiu, mas depois retornou aos valores iniciais durante o período de armazenamento de 28 dias a 4°C. Esta manutenção do pH pode ser atribuída à proteólise de células microbianas ou assimilação de lactato pelas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, presentes nos grãos de kefir e na cultura iniciadora utilizada.

Em relação à acidez Montanuci et al.¹⁴⁴ não observaram alteração significativa ao longo dos 28 dias de armazenamento, mantendo-se <1 g de ácido láctico/100g. Por outro lado, Contim et al.¹⁴⁵ que produziram kefir natural e kefir saborizado com polpa de graviola a partir de grãos de kefir, observaram aumento progressivo da acidez titulável durante os 28 dias de estocagem a 4°C.

Gronnevik et al.¹⁴⁶ analisaram amostras de kefir de cinco produções comerciais norueguesas. As amostras foram produzidas por inoculação direta com 0,2% (v/v) de cultura-mãe feita a partir de grãos de kefir, a 20-22°C por aproximadamente 20 horas até atingir pH 4,5. As amostras foram armazenadas a 5,5-6°C e analisadas ao longo de oito semanas. Os autores observaram que o pH diminuiu significativamente durante a primeira semana de armazenamento de 4,50±0,05 para 4,41±0,05 e permaneceu nesse nível durante as outras semanas, enquanto nenhuma mudança significativa foi encontrada nos níveis de ácido láctico durante o armazenamento.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, da Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 estabelece que o kefir deve apresentar acidez titulável menor que 1 g de ácido láctico/100g. Todas as formulações mantiveram o valor de acidez titulável dentro do padrão estabelecido pela legislação durante as oito semanas de armazenamento².

Os resultados das análises de contagem de bactérias lácticas ao longo de oito semanas de armazenamento refrigerado estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Contagem de bactérias lácticas viáveis (\log_{10} UFC/ml) em kefir saborizado com polpa de cagaita, ao longo de oito semanas de armazenamento refrigerado (médias \pm desvio padrão, n=2).

Formulações	1 dia	2 semanas	4 semanas	6 semanas	8 semanas
A0P0	7,56 \pm 0,025 ab B	7,60 \pm 0,023 a A	7,47 \pm 0,052 ab A	7,55 \pm 0,061 ab A	7,45 \pm 0,032 b A
A0P10	7,13 \pm 0,14 c E	7,44 \pm 0,022 a AB	7,38 \pm 0,016 ab AB	7,30 \pm 0,000 b B	7,42 \pm 0,009 ab A
A0P20	7,49 \pm 0,00 a BD	7,11 \pm 0,131 b DE	7,23 \pm 0,036 b BCD	7,18 \pm 0,018 b BD	7,13 \pm 0,002 b BC
A5P0	7,84 \pm 0,013 a A	7,18 \pm 0,008 CDE	7,26 \pm 0,067 b BC	7,03 \pm 0,017 d D	7,07 \pm 0,013 cd BC
A5P10	7,30 \pm 0,005 a DE	7,27 \pm 0,033 ab BD	7,16 \pm 0,023 b CD	7,23 \pm 0,065 ab BC	7,21 \pm 0,015 ab B
A5P20	7,54 \pm 0,071 a BC	7,13 \pm 0,058 b CDE	7,07 \pm 0,003 b D	7,02 \pm 0,088 b D	7,02 \pm 0,088 b C
A10P0	7,37 \pm 0,066 a CD	7,30 \pm 0,011 ab BC	7,22 \pm 0,019 b BCD	7,19 \pm 0,000 b BD	7,04 \pm 0,006 c BC
A10P10	7,52 \pm 0,128 a BC	7,07 \pm 0,013 b E	7,10 \pm 0,019 b CD	7,18 \pm 0,041 b BD	7,11 \pm 0,012 b BC
A10P20	7,48 \pm 0,050 a BD	7,19 \pm 0,065 bc CDE	7,29 \pm 0,042 b AC	7,06 \pm 0,030 c CD	7,08 \pm 0,059 c BC

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

A Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 estabelece que a contagem de bactérias lácticas no produto final e durante seu prazo de validade deve ser de no mínimo $7,0 \log_{10}$ UFC/g². Todas as formulações mantiveram as contagens de bactérias lácticas dentro do padrão estabelecido pela legislação durante as oito semanas de armazenamento.

Segundo SHAH¹⁴⁷, a diminuição do pH durante o armazenamento (pós-acidificação) e o acúmulo de ácidos orgânicos são os principais fatores para a perda de viabilidade de alguns gêneros de bactérias ácido lácticas nos leites fermentados. Esses fatores estão relacionados à redução do pH bacteriano intracelular causado por uma forma indissociável de ácido láctico, que causa um colapso no gradiente eletroquímico de prótons em células sensíveis¹⁴⁸.

Todas as formulações apresentaram contagens de BAL semelhantes com oito semanas de armazenamento à temperatura de refrigeração, demonstrando que as diferenças nas concentrações de açúcar e de polpa de cagaita não influenciaram significativamente na sobrevivência das BAL. Os componentes do leite, como as proteínas e lipídios, proporcionam proteção às BAL. Esses componentes contribuem para sobrevivência agindo como uma espécie de microcápsulas que protegem as BAL das dificuldades do ambiente onde se encontram^{149,150}.

As contagens de BAL se mantiveram estáveis ao longo das oito semanas de armazenamento, com contagens entre 7,02 log UFC/ml e 7,84 log UFC/ml. Contagens mais elevadas foram observadas por MONTANUCI et al.¹⁴⁴ produziram kefir com leite integral ou desnatado, a partir de grãos de kefir ou cultura iniciadora, com adição de leite em pó, com adição ou não de inulina. As amostras foram incubadas a 25°C por 24 horas e a cultura iniciadora utilizada (Lyofast MT 036 LV, Clerici-Sacco, Cadorago, Itália) era composta por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* spp. e *Saccharomyces cerevisiae*. Estes autores observaram contagem total de BAL entre 10,78 e 12,84 log UFC/ml durante o período de armazenamento (28 dias). Possivelmente a adição de leite em pó, para aumentar o conteúdo de sólidos totais, tenha contribuído para uma maior contagem de BAL, uma vez que o uso de leite em pó cria um ambiente rico em lactose, o substrato preferido das BAL¹⁵¹.

Magalhães et al.¹³ avaliaram a composição microbiana do kefir brasileiro, produzido a partir de grãos de kefir e incubado a 25°C por 24 horas e observaram contagens de bactérias ácido lácticas variando de 7,21 log UFC/ml a 12,41 log UFC/ml. Já Ertekin e

Guzel-Seydim³⁰ encontram contagens variando de 9,3 log UFC/ml a 9,9 log UFC/ml em amostras de kefir de leite integral ou desnatado, produzido com grãos de kefir, com ou sem adição de substitutos de gordura (inulina e Dairy Lo[®]).

Gronnevik et al.¹⁴⁶ analisaram amostras de kefir produzidas com cultura-mãe feita a partir de grãos de kefir, incubadas a 20-22°C por 20 horas. Os lactobacilos e os lactococos estavam presentes em níveis de 8 log UFC/ml no kefir recém-fermentado. Após quatro semanas de armazenamento, os números diminuíram significativamente em 2 e 3 unidades logarítmicas, respectivamente, e mantiveram no mesmo nível após oito semanas de armazenamento.

As diferenças nas contagens de BAL entre o presente trabalho e os demais poderiam ser explicadas por diferenças na taxa de inoculação, tipo de substrato, tempo e temperatura de fermentação e composição microbiana dos grãos ou cultura iniciadora.

5.7. Caracterização reológica do kefir saborizado com polpa de cagaita

O estudo das propriedades reológicas é fundamental para entender o comportamento reológico dos corpos ou materiais. Contribui para o conhecimento da sua estrutura, por exemplo, a relação do tamanho e a forma molecular das substâncias em solução e sua viscosidade. Na indústria realizam-se com frequência medidas reológicas das matérias primas e dos produtos em elaboração, sendo de grande utilidade para o controle de qualidade dos processos. A reologia fornece ajuda ao desenho das máquinas, é preciso que tubulações, bombas, etc., sejam adequadas às características dos produtos com que vão ser utilizadas e correlacionar a aceitação do consumidor com alguma propriedade reológica definida¹⁵².

Observa-se na Figura 13, as curvas de fluxo em todas as formulações do kefir apresentaram comportamento não linear, isto é, a relação entre a tensão de cisalhamento e a taxa de cisalhamento não foi constante, comportamento típico de um fluido não-Newtoniano. Observou-se que à medida que a taxa de cisalhamento aumentou a tensão de cisalhamento aumentou. O mesmo comportamento foi observado por Ertekin e Guzel-Seydim³⁰ que descreveram o comportamento não-Newtoniano nas amostras produzidas a partir de leite fermentado com grão de kefir, em que os valores da tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento são proporcionais.

Em relação à viscosidade aparente com a taxa de cisalhamento (Figura 14) em todas as formulações observou-se que à medida que a taxa de cisalhamento aumentou a viscosidade diminuiu, sendo esta uma característica dos fluidos pseudoplásticos. Atribuiu-

se este resultado à composição microbiológica da cultura iniciadora e partículas de gordura com menor tamanho, que favorecem a formação de redes proteicas frágeis e vulneráveis à deformação e alinhamento das partículas em relação ao fluxo causado pela taxa de cisalhamento. A diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento pode ser justificada pela alteração estrutural da amostra devido às forças hidrodinâmicas geradas e ao maior alinhamento das moléculas na direção da tensão aplicada¹⁵³.

Barukcic et al.⁵⁸ observaram que as amostras de kefir elaboradas com cultura iniciadora apresentaram maior viscosidade com temperatura de fermentação de 35°C quando comparadas com as de 25°C, uma possível explicação seria que a composição microbiana da cultura iniciadora, composta de bactérias ácido lácticas mesofílicas como *Lactococcus* sp e termofílicas como o *Streptococcus thermophilus*, são responsáveis pela excelente textura que apresentam à temperatura de 35°C e pH de 4,6. Os autores relataram que em todas as formulações, à medida que a taxa de cisalhamento aumentou a viscosidade diminuiu, sendo esta uma característica dos fluidos não-Newtonianos pseudoplásticos.

A adição de polpa de cagaita não alterou o comportamento reológico do kefir. Oliveira et al.¹⁵⁴ descreveram o comportamento reológico do néctar de cagaita pasteurizado a 65°C e 75°C como pseudoplástico. O comportamento pseudoplástico dos néctares de cagaita pode ser uma explicação para a adição da polpa de cagaita não ter interferido no comportamento reológico do kefir, também pseudoplástico.

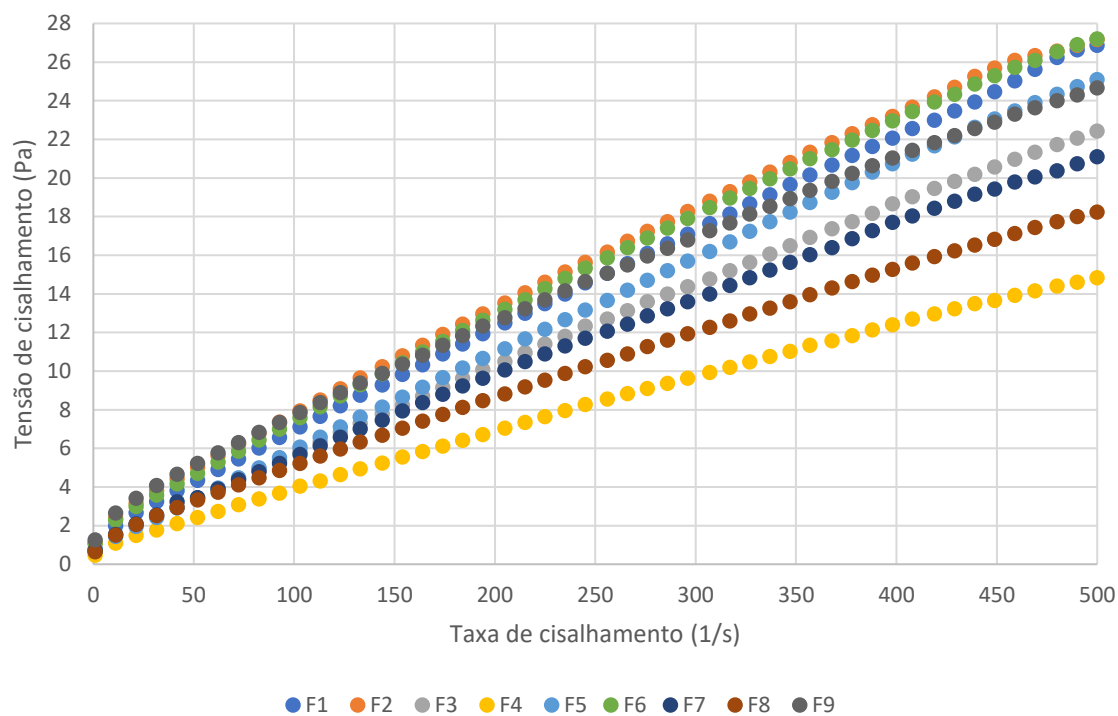


Figura 13 - Relação entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento do kefir.

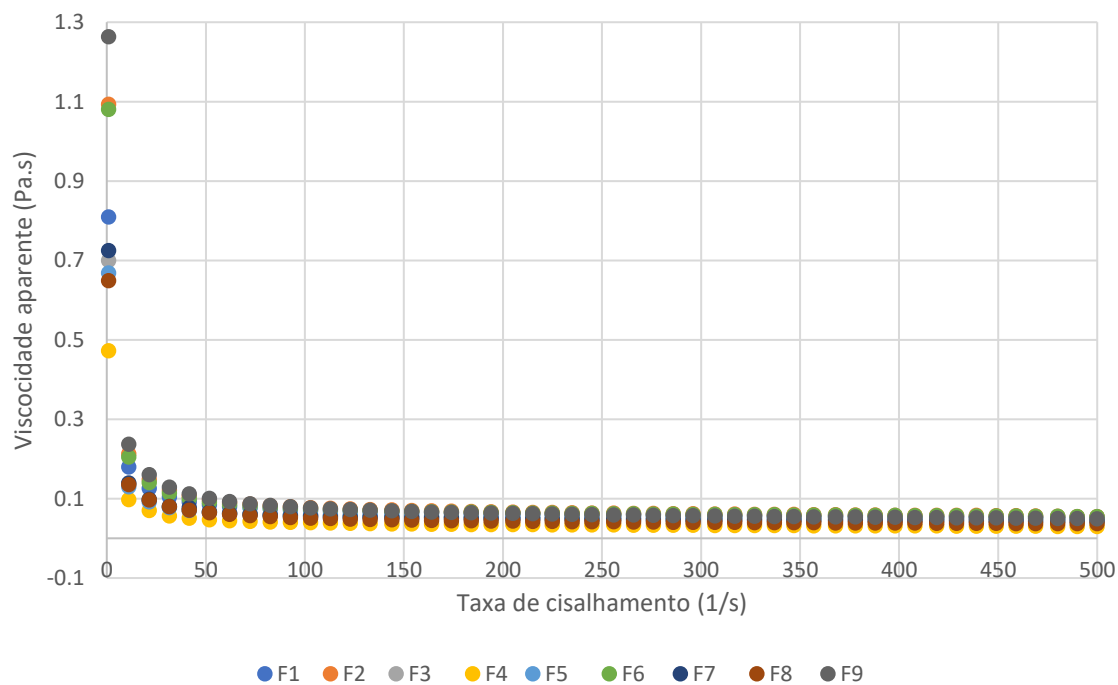


Figura 14 - Relação entre viscosidade aparente e taxa de cisalhamento do kefir.

5.8. Caracterização da cor do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

Na Tabela 11 observa-se os valores L, a* e b* do kefir.

Tabela 11 - Análise colorimétrica do kefir saborizado ou não com polpa de cagaita.

Formulações	L	a*	b*
A0P0	84,83 ± 0,06 ^a	-1,03 ± 0,15 ^e	5,03 ± 0,06 ^g
A0P10	80,13 ± 0,06 ^d	-0,50 ± 0,10 ^{cd}	11,667 ± 0,06 ^e
A0P20	78,10 ± 0,10 ^f	-0,63 ± 0,06 ^d	14,967 ± 0,12 ^b
A5P0	83,27 ± 0,12 ^c	-1,767 ± 0,06 ^f	6,400 ± 0,00 ^f
A5P10	80,33 ± 0,40 ^d	-0,567 ± 0,12 ^{cd}	12,600 ± 0,10 ^d
A5P20	80,23 ± 0,06 ^d	-0,367 ± 0,06 ^{bc}	13,600 ± 0,52 ^c
A10P0	84,30 ± 0,10 ^b	-1,60 ± 0,10 ^f	5,400 ± 0,27 ^g
A10P10	80,10 ± 0,26 ^{de}	-0,27 ± 0,06 ^{ab}	11,433 ± 0,15 ^e
A10P20	79,60 ± 0,10 ^e	-0,13 ± 0,06 ^a	16,633 ± 0,12 ^a

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).
Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

As formulações A0P0, A10P0 e A5P0 apresentam valores mais próximos nos caracteres L, a* e b*, o que era esperado já que estas não possuem polpa de cagaita em sua composição. As formulações A0P20, A10P20 e A5P20, que contém na sua composição concentrações de polpa de cagaita maiores (20%) apresentaram valores L, a* e b* próximos, sendo os valores de b* maiores em relação às demais formulações e, portanto, com uma coloração amarela mais intensa. As formulações A10P10, A0P10 e A5P10 apresentam valores próximos nos caracteres L, a* e b*, resultados esperados pois essas formulações contêm na sua composição a mesma concentração de polpa de cagaita (10%).

5.9. Análise sensorial do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)

A análise sensorial de kefir foi realizada com 125 provadores não treinados, estes avaliaram diferentes atributos como aparência, cor, aroma, sabor, consistência, impressão global e intenção de compra das bebidas. Os resultados das avaliações feitas pelos

provadores estão apresentados na Tabela 12. Os coeficientes de correlação entre o atributo cor e os valores L, a* e b* e entre os atributos sensoriais estão apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 12 - Valores médios e desvios dos atributos de aceitação e intenção de compra das amostras do kefir saborizado com polpa de cagaita (médias \pm desvio padrão, n=125).

Formulações	Aparência	Cor	Aroma	Sabor	Consistência	Imp. Global	Int. Compra*
A0P0	7,63 \pm 1,47 ^a	7,62 \pm 1,43 ^a	6,48 \pm 1,66 ^a	6,10 \pm 1,22 ^c	7,36 \pm 1,59 ^{ab}	6,91 \pm 1,74 ^{bc}	3,60 \pm 1,13 ^{bc}
A0P10	6,74 \pm 1,54 ^c	6,74 \pm 1,49 ^d	6,26 \pm 1,78 ^a	3,79 \pm 2,00 ^d	6,83 \pm 1,56 ^c	5,00 \pm 1,95 ^d	2,05 \pm 1,01 ^e
A0P20	6,70 \pm 1,54 ^c	6,80 \pm 1,50 ^d	6,35 \pm 1,66 ^a	3,77 \pm 1,93 ^d	6,47 \pm 1,78 ^c	4,82 \pm 1,98 ^d	1,95 \pm 1,02 ^e
A5P0	7,36 \pm 1,62 ^a	7,45 \pm 1,56 ^{ab}	6,37 \pm 1,70 ^a	6,41 \pm 1,79 ^c	7,48 \pm 1,31 ^{ab}	6,81 \pm 1,65 ^{bc}	3,35 \pm 1,16 ^{cd}
A5P10	6,95 \pm 1,59 ^{bc}	6,90 \pm 1,54 ^{cd}	6,49 \pm 1,61 ^a	6,41 \pm 2,11 ^c	7,34 \pm 1,51 ^{ab}	6,66 \pm 1,74 ^{bc}	3,38 \pm 1,09 ^{cd}
A5P20	6,94 \pm 1,47 ^c	7,02 \pm 1,40 ^{cd}	6,56 \pm 1,64 ^a	6,37 \pm 1,64 ^c	7,23 \pm 1,47 ^b	6,63 \pm 1,55 ^c	3,33 \pm 1,08 ^d
A10P0	7,63 \pm 1,26 ^a	7,51 \pm 1,36 ^{ab}	6,70 \pm 1,59 ^a	7,63 \pm 1,58 ^a	7,73 \pm 1,19 ^a	7,56 \pm 1,25 ^a	4,09 \pm 0,95 ^a
A10P10	7,32 \pm 1,44 ^{ab}	7,25 \pm 1,34 ^{bc}	6,76 \pm 1,74 ^a	7,72 \pm 1,45 ^a	7,46 \pm 1,34 ^{ab}	7,53 \pm 1,26 ^a	4,13 \pm 0,98 ^a
A10P20	6,63 \pm 1,74 ^c	6,57 \pm 1,82 ^c	6,39 \pm 1,80 ^a	7,20 \pm 1,82 ^b	7,35 \pm 1,40 ^{ab}	7,05 \pm 1,51 ^b	3,78 \pm 1,10 ^b

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de adjust.fdr ($p < 0,05$).

Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

Tabela 13 - Coeficientes de correlação de Pearson e níveis de significância para as variáveis cor e valores de L*, a* e b*, das amostras do kefir saborizado com polpa de cagaita.

	Cor	L*	a*	b*
Cor	-	0,85**	-0,65	-0,8833**
L*		-	-0,75*	-0,85**
a*			-	0,65
b*				-

*p<0,05; **p<0,01

Tabela 14 - Coeficientes de correlação de Pearson e níveis de significância para os atributos sensoriais das amostras do kefir saborizado com polpa de cagaita (p<0,01).

	Aparência	Cor	Aroma	Sabor	Consistência	Impressão global	Intenção de compra
Aparência	-	0,7918	0,4634	0,3841	0,5001	0,5232	0,4249
Cor		-	0,4627	0,3354	0,471	0,4681	0,3655
Aroma			-	0,3873	0,3704	0,4645	0,3866
Sabor				-	0,4755	0,8256	0,8435
Consistência					-	0,5574	0,4889
Impressão global						-	0,8105
Intenção de compra							-

Ao analisar as correlações entre o atributo cor (analisado visualmente) e os valores obtidos por análise instrumental (L*, a* e b*) (Tabela 13), observa-se que o atributo cor apresentou correlação significativa com as variáveis L* ($\rho=0,85$; $p<0,01$) e b* ($\rho= -0,8833$; $p<0,01$). O valor de b* é provavelmente mais útil ao se avaliar o atributo cor do kefir saborizado com polpa de cagaita, porque b* expressa o valor de amarelo a azul e a polpa de cagaita tem coloração amarela. Observou-se correlação negativa entre o atributo cor e o valor de b*, isto significa que com um aumento no valor de b* (ou seja, mais amarelo) ocorre uma redução na nota do atributo cor. Portanto as bebidas com maior concentração de polpa (mais amarelas) tiveram notas menores para cor. Uma possível explicação para este resultado seria a percepção da cor mais amarela como sendo uma coloração artificial.

As formulações que tiveram maiores notas para os atributos “cor” foram A0P0, A10P0 e A5P0. Nenhuma delas continha polpa de cagaita em sua composição, já os teores de açúcar de 0%, 10% e 5%, respectivamente, portanto, quanto à “cor”, os avaliadores preferiram as bebidas com coloração branca. Isto pode ser confirmado pela alta correlação positiva ($\rho=0,85$; $p<0,01$) entre o atributo “cor” e a variável L^* (Tabela 13) que representa a luminosidade, em que quanto maior o valor de L^* mais branca é a amostra. Estas mesmas amostras (A0P0, A10P0 e A5P0) foram também as que apresentaram maiores notas para o atributo “aparência”. Observou-se alta correlação positiva entre os atributos “cor” e “aparência” ($\rho=0,7918$; $p<0,01$) (Tabela 14).

Quanto ao atributo “aroma” não houve diferença estatística entre as nove formulações. Todas as formulações apresentaram notas superiores a 6, o que na ficha de avaliação correspondia à “gostei ligeiramente”. Portanto, a adição de polpa de cagaita não influenciou as notas quanto ao “aroma”.

As formulações A10P0 e A10P10 foram as que tiveram maiores notas para os atributos “sabor” e “impressão global”. Estas mesmas formulações, A10P0 e A10P10 foram as que tiveram maiores notas para “intenção de compra”, todas com médias acima de quatro, que na ficha de avaliação sensorial representava “eu provavelmente compraria”. A bebida A10P0 não continha polpa de cagaita, apenas açúcar, 10%. Já a bebida A10P10 além de 10% de açúcar também continha 10% de polpa. Portanto, as bebidas com maior “intenção de compra” foram aquelas com maior teor de açúcar (10%) e menor teor ou ausência de polpa de cagaita. Observou-se alta correlação positiva (Tabela 14) entre a “intenção de compra” e os atributos “sabor” ($\rho=0,8435$; $p<0,01$) e “impressão global” ($\rho=0,8105$; $p<0,01$), e também entre “sabor” e “impressão global” ($\rho=0,8256$; $p<0,01$).

As formulações que tiveram piores notas para “intenção de compra” foram A0P20 e A0P10, que continham 20% e 10% de polpa de cagaita, respectivamente, e não continham açúcar em suas composições. Estas mesmas formulações (A0P20 e A0P10) foram as que tiveram piores notas para os atributos “sabor”, “consistência” e “impressão global”. O motivo da rejeição, portanto, foi relacionado com presença de polpa de cagaita e ausência de açúcar nestas formulações, uma vez que o açúcar ajuda a mascarar a acidez da polpa, responsável pela baixa aceitação. Com exceção destas duas bebidas (A0P20 e A0P10), todas as demais formulações tiveram notas acima de 6 para o atributo “sabor”, o que correspondia a “gostei ligeiramente” na ficha de avaliação.

Os Índices de aceitabilidade das formulações de kefir estão apresentados na Tabela 15. O cálculo do Índice de Aceitabilidade (IA) foi realizado dividindo a nota média da impressão global pela nota máxima (9) e multiplicando por 100.

Tabela 15 - Índice de aceitabilidade do kefir saborizado com polpa de cagaita.

Formulações	Índice de aceitabilidade (%)
A0P0	76,78
A0P10	55,56
A0P20	53,56
A5P0	75,67
A5P10	74
A5P20	73,67
A10P0	84,00
A10P10	83,67
A10P20	78,33

Formulações: A0P0 (0% de açúcar e 0% de polpa), A0P10 (0% de açúcar e 10% de polpa), A0P20 (0% de açúcar e 20% de polpa), A5P0 (5% de açúcar e 0% de polpa), A5P10 (5% de açúcar e 10% de polpa), A5P20 (5% de açúcar e 20% de polpa), A10P0 (10% de açúcar e 0% de polpa), A10P10 (10% de açúcar e 10% de polpa), A10P20 (10% de açúcar e 20% de polpa).

Segundo Dutcosky¹⁵⁵ para que um produto possa ser classificado como aceito, o índice de aceitação deve ser maior que 70. Portanto, com exceção das formulações A0P20 e A0P10, todas as demais formulações foram aceitas. A formulação A0P0, mesmo não tendo açúcar em sua composição, apresentou bom índice de aceitação. As formulações A10P0 e A10P10 foram as que tiveram melhor aceitabilidade, com Índices de aceitação superiores a 80%. Resultado semelhante foi observado por Souza et al.¹⁵⁶ que avaliaram a aceitação sensorial do kefir de café produzido a partir de grãos de kefir, o índice de aceitação para aparência global de 85,25%.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todas as formulações de kefir apresentaram características físico-químicas e microbiológicas dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, a não ser pelo fato de ser um kefir fermentado apenas por bactérias, portanto sem leveduras em sua composição.

A saborização de kefir com a polpa de cagaita contribui para a preservação do meio ambiente ao incentivar a preservação e produção de uma árvore nativa do Cerrado e contribui com o desenvolvimento social ao utilizar polpas provenientes da agricultura familiar, além disso, fornece nutrientes importantes, como a vitamina C, aos consumidores.

Todas as nove formulações fabricadas da bebida kefir apresentaram longa vida de prateleira, mantendo as contagens de bactérias ácido lácticas acima de 10^7 UFC/g e a acidez abaixo de 1g de ácido láctico/100g durante as oito semanas de armazenamento sob refrigeração (5°C).

Com exceção de duas formulações (A0P20 e A0P10) que não continham açúcar, todas as demais formulações de kefir tiveram boa aceitação na análise sensorial, com notas entre “gostei ligeiramente” (nota 6) e “gostei extremamente” (nota 9) para os atributos aparência, cor, aroma, sabor, consistência e impressão global. As formulações que tiveram maiores notas para os atributos sabor e impressão global foram A10P0 e A10P10. Estas mesmas formulações foram as que também tiveram maiores notas para a intenção de compra, com notas acima de 4, que na ficha de avaliação sensorial correspondia a “eu provavelmente compraria”, sendo a A10P10 a bebida mais indicada por ser saborizada com a polpa de cagaita.

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que o kefir pode ser produzido industrialmente utilizando culturas iniciadoras e apresentar longa vida de prateleira e boa aceitação pelo consumidor brasileiro. Aliado a isso, os estudos científicos tem evidenciado os efeitos benéficos associados ao consumo do kefir, o que o confirma como um produto lácteo promissor para ser explorado em países como o Brasil, onde seu consumo não é significativo.

REFERÊNCIAS

1. Rattray FP, O'Connell MJ. Fermented Milks | Kefir A2 - Fuquay, John W. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2011. p. 518-24.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Aprova o regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados. Brasília. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, DF. 24 out.2007. Seção 1. p.4.
3. Codex Alimentarius. Milk and Milk Products. 2a ed. Roma: World Health Organization. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2011. 244p.
4. Leite AMO, Leite DCA, Del Aguila EM, Alvares TS, Peixoto RS, Miguel MAL, et al. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. J. Dairy Sci. 2013;96(7):4149-59.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398 de 30 de abril 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Diário Oficial da União, Brasília (03 maio 1999); 2.
6. Leite AMO, Miguel MA, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VM, Mayo B, et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. J Dairy Sci. 2015;98(6):3622-32.
7. Marsh AJ, O'Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. PloS one. 2013;8(7):e69371.
8. Rea M, Lennartsson T, Dillon P, Drinan F, Reville W, Heapes M, et al. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. J. Appl. Bacteriol. 1996;81(1):83-94.
9. Yang Y, Shevchenko A, Knaust A, Abuduresule I, Li W, Hu X, et al. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. J. archaeol. sci. 2014;45:178-86.
10. Farnworth ER. Kefir—a complex probiotic. Food Science and Technology Bulletin: Fu. 2006;2(1):1-17.
11. Farnworth ER, Mainville I. Kefir—A fermented milk product. Handbook of Fermented Functional Foods, Second Edition: CRC Press; 2008. p. 89-127.
12. Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. J Dairy Res. 2001;68(4):639-52.
13. Magalhães KT, Pereira GVdM, Campos CR, Dragone G, Schwan RF. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. Brazilian Journal of Microbiology. 2011;42:693-702.

14. Kabak B, Dobson AD. An introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(3):248-60.
15. Garofalo C, Osimani A, Milanović V, Aquilanti L, De Filippis F, Stellato G. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol.* 2015;49:123-33.
16. Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23(2):67-74.
17. Motaghi M, Mazaheri M, Moazami N, Farkhondeh A, Fooladi MH, Goltapeh EM. Kefir production in Iran. *World j. microbiol. biotechnol.* 1997;13(5):579-81.
18. Chen TH, Wang SY, Chen KN, Liu JR, Chen MJ. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *J Dairy Sci.* 2009;92(7):3002-13.
19. Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26(3):434-7.
20. Kok-Tas T, Seydim AC, Ozer B, Guzel-Seydim ZB. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. *J Dairy Sci.* 2013;96(2):780-9.
21. Piermaría J, Bengoechea C, Abraham AG, Guerrero A. Shear and extensional properties of kefir. *Carbohydr. polym.* 2016;152:97-104.
22. Cheirsilp B, Shimizu H, Shioya S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 2003;100(1):43-53.
23. Badel S, Bernardi T, Michaud P. New perspectives for *Lactobacilli* exopolysaccharides. *Biotech. adv.* 2011;29(1):54-66.
24. Medrano M, Racedo SM, Rolny IS, Abraham AG, Perez PF. Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. *J Agric Food Chem.* 2011;59(10):5299-304.
25. Rodrigues KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;25(5):404-8.
26. Gao J, Gu F, He J, Xiao J, Chen Q, Ruan H, et al. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. *Eur. food res. technol.* 2013;236(3):549-56.
27. Latorre-García L, del Castillo-Agudo L, Polaina J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. *World j. microbiol. biotechnol.* 2007;23(6):785-91.
28. Lu M, Wang X, Sun G, Qin B, Xiao J, Yan S, et al. Fine structure of Tibetan kefir grains and their yeast distribution, diversity, and shift. *PLoS One.* 2014;9(6):e101387.

29. Leite AMO, Mayo B, Rachid CTCC, Peixoto RS, Silva JT, Paschoalin VMF, et al. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* 2012;31(2):215-21.
30. ErtekİN B, Guzel-Seydīm ZB. Effect of fat replacers on kefir quality. *J. sci. food agric.* 2010;90(4):543-8.
31. Beshkova DM, Simova ED, Simov ZI, Frengova GI, Spasov ZN. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiol.* 2002;19(5):537-44.
32. Miguel MGdCP, Cardoso PG, Lago Lda, Schwan RF. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Res. Int.* 2010;43(5):1523-8.
33. E C Moreira M, Santos M, H M, Pereira I, Ferraz V, Barbosa LC, et al. Atividade antiinflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. 2008. 1738-42.
34. Filipčev B, Šimurina O, Bodroža-Solarov M. Effect of native and lyophilized kefir grains on sensory and physical attributes of wheat bread. 2007. 367-77.
35. Altay F, Karbancıoğlu-Güler F, Daskaya-Dikmen C, Heperkan D. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *Int. j. food microbiol.* 2013;167(1):44-56.
36. Puerari C, Magalhães KT, Schwan RF. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Res. Int.* 2012;48(2):634-40.
37. Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: functional properties of kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2011;51(3):261-8.
38. Pogacić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., Samaržija, D., 2013. Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo* 63 (1), 3-14.
39. Tamime, A. Y. (2006). Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: Tamime, A. Y. (ed.), *Fermented Milk* Blackwell Science Ltd, Oxford, UK, p. 174-216.
40. Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G, Spasov Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2002;28(1):1-6.
41. Dobson A, O'Sullivan O, Cotter PD, Ross P, Hill C. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. *FEMS Microbiol Lett.* 2011;320(1):56-62.
42. Guzel-Seydim Z, Wyffels JT, Seydim AC, Greene AK (2005) Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *Int J Dairy Technol* 58:25-29.
43. Jacques N, Casaregola S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. *Int. j. food microbiol.* 2008;126(3):321-6.

44. Zhou J, Liu X, Jiang H, Dong M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiol.* 2009;26(8):770-5.
45. Bottazzi V, Bianchi F. A Note on Scanning Electron Microscopy of Micro-organisms associated with the Kefir Granule. 2008. 265-8.
46. Chin-Wen L, Hsiao-Ling C, Liu J-R. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. *Aust J Dairy Technol.* 1999;54(1):14.
47. Magalhães KT, Pereira MA, Nicolau A, Dragone G, Domingues L, Teixeira JA, et al. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresour. technol.* 2010;101(22):8843-50.
48. Arezou A, Shuhaimi M, Manap YA, Rosfarizan M. Characterization of headspace volatile flavor compounds formed during Kefir production: application of solid phase microextraction. *Int. J. Food Prop.* 2009;12(4):808-18.
49. Beshkova DM, Simova ED, Frengova GI, Simov ZI, Dimitrov ZP. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *Int. dairy j.* 2003;13(7):529-35.
50. Güzel-Seydim ZB, Seydim AC, Greene AK, Bodine AB. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. *J. food compos. anal.* 2000;13(1):35-43.
51. Suriasih K, Wayan R, Aryanta, Mahardika G, Mantik Astawa N. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. 2012;6:12-22.
52. García Fontán MC, Martínez S, Franco I, Carballo J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *Int. dairy j.* 2006;16(7):762-7.
53. Garrote, G.L., Abraham, A.G., and De Antoni, G.L. (2010). "Microbial Interactions in Kefir: a Natural Probiotic Drink," in *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria*, eds F. Mozzi, R.R. Raya, and G.M. Vignolo (Ames, IO: Wiley-Blackwell), 327–340.
54. Garrote G, Abraham A, De Antoni G. Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. 1997. 77–84 Garrote GL, Abraham AG, De Antoni G (1997) Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study. *Lebensm-Wiss u-Technol* 30:77-84.
55. Otlés S, Cagindi O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pak J Nutr.* 2003;2:54-9.
56. Sarkar S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. *Br. food j.* 2008;110(3):283-95.
57. Schawn RF, Magalhães-Guedes KT, Dias DR. Kefir-grains and beverages: a review. *Sci. agrar. parana.* 2015;14(1):1-9.

58. Barukčić I, Gracin L, Režek Jambrak A, Božanić R. Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir produced by kefir grains and commercial kefir starter. 2017;67(3):169-76.
59. Rizzello C, De Angelis M. Lactic Acid Bacteria | *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus delbrueckii* Group. 2011. p. 119-24.
60. Hao P, Zheng H, Yu Y, Ding G, Gu W, Chen S, et al. Complete sequencing and pan-genomic analysis of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* reveal its genetic basis for industrial yogurt production. PLoS One. 2011;6(1):e15964.
61. Horiuchi H, Sasaki Y. Short communication: effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. J Dairy Sci. 2012;95(6):2904-9.
62. Teixeira P. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. In Batt, Carl, A.; Tortorello, Mary-Lou (eds.) - Encyclopedia of Food Microbiology. Reino Unido: Academic Press, 2014. 425-31.
63. Hutkins R, Goh YJ. STREPTOCOCCUS | *Streptococcus thermophilus*. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). Oxford: Academic Press; 2014. p. 554-9.
64. Khemariya P, Singh S, Nath G, Gulati AK. Probiotic *Lactococcus lactis*: A review. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology. 2017;5(6):556-62.
65. Roissart H, Luquet. 1994. Lactic acid bacteria: fundamental and technological aspects. Uriage, Loriga, France 1:605. ISBN 2 9507477 0 1.
66. Ibrahim SA. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: Other Species. Reference Module in Food Science: Elsevier; 2016.
67. Liu SQ. Lactic Acid Bacteria: *Leuconostoc* spp. Reference Module in Food Science: Elsevier; 2016.
68. Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics—From Metchnikoff to bioactives. Int. dairy j. 2008;18(7):714-28.
69. Gopal PK. *Lactobacillus* spp: *Lactobacillus acidophilus*. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH, editores. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2011. 91-5.
70. Ozogul F, Hamed I. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus acidophilus*. Reference Module in Food Science: Elsevier; 2016.
71. Prasanna PHP, Grandison AS, Charalampopoulos D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. Food Research International. 2014;55:247-62.
72. Shah NP. *Bifidobacterium* spp.: Applications in Fermented Milks. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH, editores. Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition). San Diego: Academic Press; 2011. 388-94.

73. Minervini F. *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus casei* Group. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweneeny PLH, editores. *Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2011. 96-03.
74. Gobbetti M, Minervini F. LACTOBACILLUS | *Lactobacillus casei*. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2014. p. 432-8.
75. Ahmed Z, Wang Y, Ahmad A, Khan ST, Nisa M, Ahmad H, et al. Kefir and health: a contemporary perspective. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2013;53(5):422-34.
76. Carasi P, Diaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell Mde L. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *Biomed Res Int*. 2014;2014:208974.
77. Kesenkaş H, Yerlikaya O, Özer E. A functional milk beverage: Kefir. 2013. 53-5.
78. Powell JE, Witthuhn RC, Todorov SD, Dicks LMT. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int. dairy j*. 2007;17(3):190-8.
79. Zheng Y, Lu Y, Wang J, Young L, Pan C, Huang Y. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. *Plos one*. 2013;8(7).
80. Toscano M, De Grandi R, Miniello VL, Mattina R, Drago L. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. *Dig Liver Dis*. 2017;49(3):261-7.
81. Helander IM, Von Wright A, Mattila-Sandholm TM. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends food sci. technol*. 1997;8(5):146-50.
82. Ulusoy BH, Çolak H, Hampikyan H, Erkan ME. An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Turk Mikrobiyol Cem Derg*. 2007;37(2):103-7.
83. Yüksekdağ ZN, Beyatli Y, Aslim B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT - Food sci. technol*. 2004;37(6):663-7.
84. Sarkar S. Potential of kefir as a dietetic beverage—a review. *Br. food j*. 2007;109(4):280-90.
85. Rosa DD, Dias MMS, Grzeskowiak LM, Reis SA, Conceicao LL, Peluzio M. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutr Res Rev*. 2017;30(1):82-96.
86. Liu JR, Wang SY, Lin YY, Lin CW. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutr Cancer*. 2002;44(2):183-7.
87. Parker AM, Watson RR. Chapter 16 - Lactose Intolerance. In: Watson RR, Collier RJ, Preedy VR, editors. *Nutrients in Dairy and their Implications on Health and Disease*: Academic Press; 2017. 205-11.

88. John, S. M., & Deeseenthum, S. Properties and benefits of kefir – A review. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 2015; 37(3), 275–282.
89. de Vrese M, Keller B, Barth CA. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *Br J Nutr.* 1992;67(1):67-75.
90. Hertzler SR, Clancy SM. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J Am Diet Assoc.* 2003;103(5):582-7.
91. Aazmi S, Teh LK, Ramasamy K, Rahman T, Salleh MZ. Comparison of the anti-obesity and hypocholesterolaemic effects of single *Lactobacillus casei* strain Shirota and probiotic cocktail. *Int J Food Sci Technol.* 2015; 50(7):1589–97
92. Richardson DP, Eggersdorfer M. Opportunities for product innovation using authorised European Union health claims. *Int. j. food sci. technol.* 2015;50(1):3-12.
93. St-Onge MP, Farnworth ER, Savard T, Chabot D, Mafu A, Jones PJ. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complement Altern Med.* 2002;2:1.
94. Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;84(2):341-7.
95. Cardoso LdM, Martino HSD, Moreira AVB, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Res. Int.* 2011;44(7):2151-4.
96. Marinotto, C., Paiva, R., Soares, F.P., Santos, B.R., Nogueira, R.C., 2008. Cagaiteira (*Eugenia dysenterica* DC.) Universidade Federal de Lavras, Lavras.
97. Silva RSM, Chaves LJ, Naves RV. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do Estado de Goiás, Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura.* 2001;23(2):330-4.
98. Costa TR, Fernandes OF, Santos SC, Oliveira CM, Liao LM, Ferri PH, et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J Ethnopharmacol.* 2000;72(1-2):111-7.
99. Silva MR, Santos Júnior RTO, Ferreira CCC. Estabilidade da vitamina C em cagaita in natura e durante a estocagem da polpa e refresco. *Pesqui. Agropecu. Trop.*, 2008; 38(1): 53-58.
100. Oliveira MES, Pantoja L, Duarte WF, Collela CF, Valarelli LT, Schwan RF, et al. Fruit wine produced from cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) by both free and immobilised yeast cell fermentation. *Food Res. Int.* 2011;44(7):2391-400.
101. Ribeiro EMG., 2011 Atividade antioxidante e polifenóis totais do fruto de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) com e sem casca. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidad Federal de Rio de Janeiro.

102. Lima TB, Silva ON, Oliveira JTA, Vasconcelos IM, Scalabrin FB, Rocha TL, et al. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: A novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. *Peptides*. 2010;31(8):1426-33.
103. CHITARRA, M. I. F; CHITARRA, A. B. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2005. v.1, 785p.
104. Rodrigues LJ. Desenvolvimento e Processamento Mínimo de Pitaia Nativa (*Selenicereus setaceus* Rizzi) do Cerrado Brasileiro. [Tese]. Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras; 2010.
105. Santos MNG. Avaliação de polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica* Dc.) submetida ao congelamento e atomização. [DISSERTAÇÃO]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia; 2015.
106. Lima AR, Barbosa VC, Santos Filho PR, Gouvêa CMCP. In vitro evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of bardana. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2006;16(4):531-6.
107. Freire JM, Abreu CMPd, Rocha DA, Corrêa AD, Marques NR. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. *Ciênc. Rural*. 2013;43(12):2291-6.
108. Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food chem.* 2005;92(3):491-7.
109. Rufino MdSM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food chem.* 2010;121(4):996-1002.
110. Schiassi MCEV, Souza VRd, Lago AMT, Campos LG, Queiroz F. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food chem.* 2018;245:305-11.
111. Grant WB. Vitamins. Reference Module in Life Sciences: Elsevier; 2017.
112. Combs GF, McClung JP. Chapter 10 - Vitamin C. In: Combs GF, McClung JP, editors. *The Vitamins (Fifth Edition)*: Academic Press; 2017. p. 267-95.
113. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. Brasília, 2005.
114. Siqueira EM, Rosa FR, Fustinoni AM, de Sant'Ana LP, Arruda SF. Brazilian savanna fruits contain higher bioactive compounds content and higher antioxidant activity relative to the conventional red delicious apple. *PLoS One*. 2013;8(8):e72826.
115. Ngamwonglumlert L, Devahastin S. Carotenoids. In: Melton L, Shahidi F, Varelis P, editors. *Encyclopedia of Food Chemistry*. Oxford: Academic Press; 2019. p. 40-52.

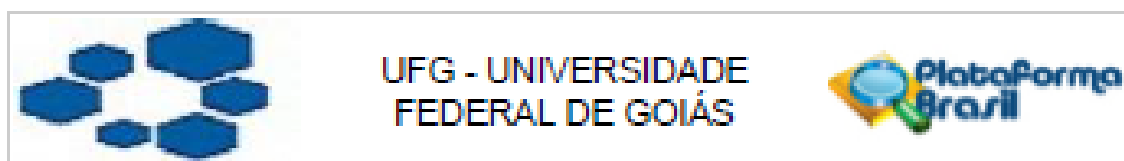
116. Tanaka T, Shnimizu M, Moriwaki H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*. 2012;17(3):3202-42.
117. Gurmu F, Hussein S, Laing M. The potential of orange-fleshed sweet potato to prevent vitamin A deficiency in Africa. *Int J Vitam Nutr Res*. 2014;84(1-2):65-78.
118. Rocha MS, Figueiredo RWd, Araújo MAdM, Moreira-AraÚJo RSdR. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado Piauiense. *Rev. Bras. Frutic*. 2013;35(4):933-41.
119. Heleno SA, Martins A, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food chem*. 2015;173:501-13.
120. Zhang Y, Wu S, Qin Y, Liu J, Liu J, Wang Q, et al. Interaction of phenolic acids and their derivatives with human serum albumin: Structure–affinity relationships and effects on antioxidant activity. *Food chem*. 2018;240:1072-80.
121. Guedes MNS, Rufini JCM, Marques TR, Melo JOF, Ramos MCP, Viol RE. MINERALS AND PHENOLIC COMPOUNDS OF CAGAITA FRUITS AT DIFFERENT MATURATION STAGES (*Eugenia dysenterica*). *Rev. Bras. Frutic*. 2017;39.
122. Bastos CTRM. Ladeira TMS. Rogez H. Pena RS. Estudo da eficiência da pasteurização da polpa de taperebá (*Spondias mombin*). *Alimentos e Nutrição*. Araraquara. 2008. 19(2): 123-131.
123. Hinrichs J, Atamer Z. Heat Treatment of Milk | Sterilization of Milk and Other Products. 2011. p. 714-24.
124. Association Of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, Arlington: A.O.A.C.1995. chapter 37.
125. Association Of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists Arlington: A.O.A.C. 1996. chapter 33.
126. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP. 1985..
127. Bligh EG, Dyer WJ. A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Can. J. Biochem. Physiol*. 1959;37(8):911-7.
128. Soares Soares Junior M, Bassinello P, Caliari M, Velasco P, Reis R, Tavares de Carvalho W. Bebidas saborizadas obtidas de extratos de quirera de arroz, de arroz
129. Merrill AL, Watt BK. Energy value of foods-basis and derivation. Energy value of foods-basis and derivation. 1955.
130. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods Editors: Yvonne Salfinger and Mary Lou Tortorello 2015 American Public Health Association eISBN: 978-0-87553-022-2. English
131. Iso 6785 IdF 93:2001 specifies a method for the detection of *Salmonella* spp. in milk and milk products. English

132. Iso 15214:1998 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria -- Colony-count technique at 30 degrees C. English
133. Broadbent AD. Colorimetry, Methods. In: Lindon JC, Tranter GE, Koppenaal DW, editors. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition). Oxford: Academic Press; 2017. 321-7p.
134. R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing, reference index version 2.11.1 (2010-05-31). Copyright (C) 2010. Vienna: The R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2010. ISBN 3-900051-07-0.
135. BRASIL. Portaria do Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária (MAARA) nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova padrões microbiológicos, físicos e químicos para leite e derivados Diário Oficial Brasília.11:3977-86.
136. Pfrimer RT. Desenvolvimento e avaliação de bebida láctea fermentada acrescida de leite e saborizada com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*). 2018.
137. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de dezembro de 2011. Seção 1.
138. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 01, de 7 de janeiro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico Geral para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para polpa de fruta, em conformidade com o Anexo I desta Instrução Normativa. Diário Oficial da União, Goiás, 10 de janeiro de 2000. Seção 1; p.259.
139. Lucey JA, Tamehana M, Singh H, Munro PA. A comparison of the formation, rheological properties and microstructure of acid skim milk gels made with a bacterial culture or glucono- δ -lactone. *Food Res. Int.* 1998;31(2):147-55.
140. Ozdestan O, Üren A. Biogenic amine content of kefir: A fermented dairy product. 2010. 101-7p.
141. Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez FC. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food chem.* 2005;90(4):613-20.
142. Gul O, Mortas M, Atalar I, Dervisoglu M, Kahyaoglu T. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. *J Dairy Sci.* 2015;98(3):1517-25.
143. Aportela-Palacios A, Sosa-Morales ME, Vélez-Ruiz J. Rheological and physicochemical behavior of fortified yogurt, with fiber and calcium. 2005. 333-49 p.

144. Montanuci FD, Pimentel TC, Garcia S, Prudencio SH. Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk kefir. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2012. 32, 850–861.
145. Silva Rocha Contim L, Maria Aguiar Oliveira I, Cardoso Neto J. Avaliação microbiológica, físico-química e aceitação sensorial do kefir com polpa de graviola. 2018. 1-9p.
146. Grønnevik H, Falstad M, Narvhus JA. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *Int. dairy j.* 2011;21(9):601-6.
147. Shah NP. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J Dairy Sci.* 2000;83(4):894-907.
148. CRUZ AG. Leites fermentados e iogurtes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Eds.). *Probióticos e prebióticos em alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 2011.
149. Gibbs BF, Kermasha S, Alli I, Mulligan CN. Encapsulation in the food industry: a review. *Int J Food Sci Nutr.* 1999;50(3):213-24.
150. Shahidi F, Han XQ. Encapsulation of food ingredients. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1993;33(6):501-47.
151. Makras L, Van Acker G, De Vuyst L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):6531-7.
152. Rao MA, Rizvi S, Datta A, Ahmed J. *Engineering Properties of Foods*, Fourth Edition. 2014.
153. Alpaslan M, Hayta M. Rheological and sensory properties of pekmez (grape molasses)/tahin (sesame paste) blends. *J. food eng.* 2002;54(1):89-93.
154. Oliveira FL, de Oliveira CFD, Pinto EG. Comportamento reológico de néctar de cagaita descrito pelo modelo lei de potência. *J of neotropical agrc.* 2016;3(3):15-9.
155. Dutcosky SD. *Análise sensorial de alimentos*. *Análise sensorial de alimentos*. 2011.
156. Souza MH, Silva IS, Barbosa MC, Belizário RM, Cabral RMS, Ribeiro DF, Rodrigues FC. *DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO SENSORIAL DE KEFIR DE CAFÉ*. II Seminário Científico da FACIG; 2016; Espírito Santo, Brasil. *Anais do Seminário Científico da FACIG*. 2016;2:1-5.

ANEXO I

PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA KEFIR SABORIZADA COM POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora*)

Pesquisador: Juan Carlos Roberto Saavedra More

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 89290718.1.0000.5083

Instituição Proponente: Escola de Veterinária e Zootecnia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

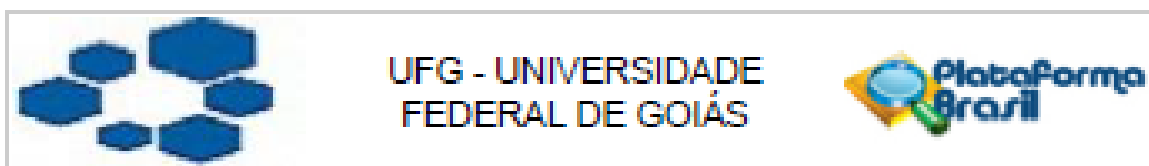
Número do Parecer: 2.729.268

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA KEFIR SABORIZADA COM POLPA DE ARATICUM (*Annona crassiflora*). Pesquisador Responsável: Juan Carlos Roberto Saavedra More. pesquisadores participantes: EDMAR SOARES NICOLAU e CLARICE GEBARA MURARO SERRATE CORDEIRO TENORIO. CAAE: 89290718.1.0000.5083

Trata-se de um projeto de mestrado, onde será realizada a análise sensorial em funcionários e alunos (total de 100 participantes) da Escola de Veterinária e Zootecnia e Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Goiás, entre julho e dezembro de 2018. O objetivo da pesquisa é avaliar a preferência pelo tipo de fruta usada para saborização do Kefir (araticum) e intenção de compra pelo consumidor. Para tal, serão aplicados os testes de preferência e intenção de compra, segundo a metodologia descrita pelo manual de Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2008). A casuística de 100 participantes será de ambos os sexos com faixa etária entre 18 e 64 anos e com a característica de serem consumidores habituais de leite e derivados. Os indivíduos pertencentes ao grupo de risco como alérgicos ou com restrições de consumo a qualquer um dos componentes do produto (lactose, proteínas do leite, açúcar, frutas) serão excluídos do estudo. O produto elaborado (kefir saborizado) será armazenado sob refrigeração até ser realizada a análise, que será feita após a avaliação dos resultados das análises microbiológicas, para garantir a segurança do produto que

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.ppl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.726.260

será oferecido aos participantes. As amostras serão apresentadas aos participantes que avaliarão os atributos aparência geral, cor, aroma, textura e sabor, estabelecendo uma preferência entre as amostras, além da intenção de compra do produto desenvolvido. Os participantes registrarão suas notas em fichas com escala hedônica estruturada de 9 a 5 pontos para cada amostra, como descrito na Ficha de análise sensorial do anexo 2.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Produzir e caracterizar a bebida Kefir saborizada com polpa de araticum (*Annona crassiflora*).

Objetivo Secundário:

Produzir uma bebida Kefir saborizada com polpa de araticum, utilizando grãos de Kefir.

Determinar a composição físico-química da bebida Kefir.

Determinar a composição microbiológica da bebida Kefir.

Determinar o comportamento reológico da bebida Kefir.

Analisar a composição do leite.

Analisar os parâmetros físico-químicos da polpa de araticum.

Analisar os parâmetros microbiológicos da polpa de araticum.

Testar a aceitabilidade da bebida Kefir por meio de análises sensoriais.

Determinar a vida de prateleira da bebida Kefir.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

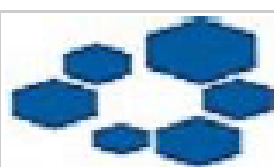
Riscos:

Apesar do pesquisador não citar nenhum risco aos participantes, deve-se mencionar que poderá ter algum risco durante o processo de degustação do produto, assim como existe um risco de exposição do participante e que este risco é minimizado pela garantia de sigilo e anonimato, segundo o exposto no TCLE.

Benefícios:

Espera-se com esta pesquisa determinar a melhor condição de produção e a vida de prateleira da bebida de leite fermentado Kefir, com características probióticas e boa aceitabilidade pelos consumidores. Padronizar a produção, de modo que a sua composição esteja de acordo com a legislação vigente, tomando possível a produção e comercialização da mesma. Uma vez que a

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIÂNIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.ppl.ufg@gmail.com



UFG - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



Continuação do Parecer: 2.729.260

bebida kefir será saborizada com polpa de araticum, espera-se ressaltar o valor dos frutos do cerrado Brasileiro, que são ricos em nutrientes. Incentivar o consumo da bebida kefir por meio da divulgação de informações sobre a bebida e seus benefícios. Espera-se publicar artigos científicos em revistas de impacto, apresentar trabalhos em eventos científicos nacionais e internacionais e oferecer subsídios aos órgãos de fiscalização sobre o processamento da bebida kefir.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante e factível.

Apenas há um ponto a ser questionado que é em relação a quantidade de participantes. Na FR, no projeto e na metodologia proposta das informações básicas do projeto, assim como no número de participantes e no Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa consta como 100 participantes. No entanto, no resumo diz que serão 50 (realizada com 50 provedores não treinados durante o período de julho de 2018 a dezembro de 2018), assim como no desenho consta-se o número de 50 provedores de ambos os sexos com faixa etária entre 18 e 64 anos.

O TCLE está adequadamente elaborado, porém não consta que haverá ressarcimento ao participantes no caso de despesa oriunda da pesquisa e não está em papel timbrado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

PB INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO 1130988.pdf; folha Rosto Juan.pdf; ficha de avaliação sensorial Juan.docx; Anuência Vet.pdf; Anuência EA.pdf; Carta CEP Juan.pdf; Termo de Compromisso CEP Juan.pdf; Projeto de pesquisa CEP Juan.docx; ORÇAMENTO.docx; CRONOGRAMA.docx; TCLE JUAN.docx.

Os cronogramas apresentados nos documentos estão com as datas ajustadas e a previsão do início da aplicação das fichas de avaliação é para dois de julho de 2018 e o término em dezembro de 2018.

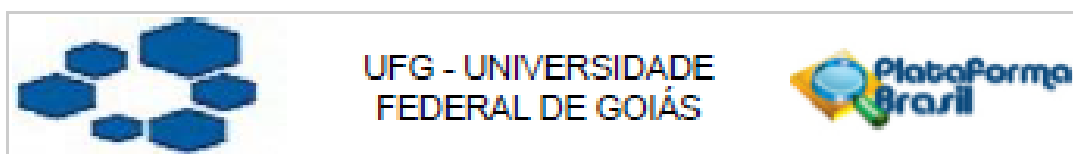
O Orçamento é de 26.431,30, sendo por financiamento próprio.

O termo de compromisso está adequado, com menção às resoluções CNS 466/2012 e 510/2016, assim como está assinada por todos os pesquisadores.

O documento carta ao CEP trata-se de uma declaração do pesquisador principal de que a coleta de dados não foi iniciada e esta terá início somente após a aprovação do CEP.

Anuência EA e Anuência Vet, são os termos de anuência da Escola de Agronomia e Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, onde afirmam a concordância para o desenvolvimento do projeto de pesquisa e assumem o compromisso de resguardo e bem estar dos participantes da pesquisa. Os documentos estão devidamente carimbados e assinados pelos respectivos diretores das Escolas

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIÂNIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.729.266

de Agronomia e Escola de Veterinária e Zootecnia.

A ficha de avaliação refere-se ao instrumento de coleta de dados, com breves questões para avaliar o grau de satisfação ao produto em teste.

A FR, folha de rosto, está devidamente assinada e com o carimbo do diretor da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

O TCLE está em arquivo do word.

Recomendações:

Recomenda-se a revisão das informações básicas do projeto para igualar o número de participantes da pesquisa em todos os tópicos.

Incluir o TCLE em papel timbrado da UFG e incluir um item que garante o ressarcimento ao participante de gastos advindos da pesquisa. Trocar a palavra "sujeito" por participante.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

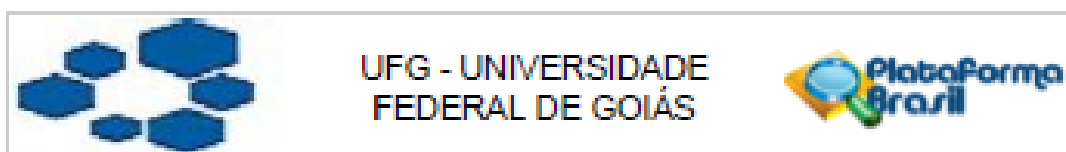
Considera-se o presente projeto aprovado, s.m.j deste comitê, condicionado a apresentar um arquivo com o TCLE que contemple os seguintes itens:

1. Papel timbrado.
2. Incluir um item que assegure o ressarcimento ao participante, no caso de gastos advindos da pesquisa.
3. Substituir a palavra "sujeito" por participante.
4. Incluir no TCLE que o participante será instruído a permanecer sob observação no local onde foi efetuada a ingestão do kefir.
5. Descrever o procedimento de atendimento e acompanhamento do participante durante e após a ingestão do kefir.

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência

Endereço: Prédio da Retoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIÂNIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.ppl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.739.260

de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para março de 2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1130988.pdf	09/05/2018 13:35:11		Aceito
Folha de Rosto	folhaRostro_Juan.pdf	09/05/2018 13:34:05	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Outros	Ficha_de_avaliacao_sensorial_Juan.docx	08/05/2018 10:45:54	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Outros	Anuencia_Vet.pdf	08/05/2018 10:43:29	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Outros	Anuencia_EA.pdf	08/05/2018 10:41:40	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Outros	Carta_CEP_Juan.pdf	08/05/2018 10:39:10	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Outros	Termo_de_Compromisso_CEP_Juan.pdf	08/05/2018 10:38:39	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa_CEP_Juan.docx	08/05/2018 10:31:44	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	08/05/2018 10:31:08	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	08/05/2018 10:29:19	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TGLEJUAN.docx	08/05/2018 10:27:25	Juan Carlos Roberto Saavedra More	Aceito

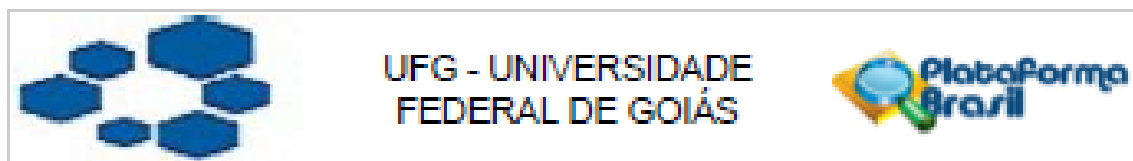
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Ca. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.ppl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.729.260

GOIANIA, 21 de Junho de 2018

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
UF: GO Município: GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.ppl.ufg@gmail.com

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa intitulada “**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA KEFIR SABORIZADA COM POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)**”. Meu nome é **Juan Carlos Roberto Saavedra More**, sou o **pesquisador responsável** e minha área de atuação é **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos**. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte deste estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas pertence a você e a outra pertence ao pesquisador responsável. Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado(a) de forma alguma. Mas se aceitar participar, as dúvidas sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas pelo pesquisador responsável, via e-mail jsaavemore@gmail.com ou telefone (62)993027905. Caso persistam dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215. Se você aceitar participar, irá avaliar os produtos quanto a avaliação global e intenção de compra, para tanto preencherá uma ficha de avaliação do produto tomando cerca de 15 minutos. A ficha e os dados coletados serão de uso exclusivo nesta pesquisa e de acesso limitado aos pesquisadores.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA

- Título: **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA KEFIR SABORIZADA COM POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)**

O propósito desta pesquisa será caracterizar físico-química, sensorial e microbiologicamente a bebida kefir e padronizar o seu processo de produção, a fim de obter um produto de ótima qualidade. Além disso, melhorar as suas características sensoriais por meio da adição de aroma e sabor de uma fruta regional do cerrado, a cagaita, o que agregará valor ao produto final. Antes das análises sensoriais, para garantir a segurança do alimento, serão realizadas as análises microbiológicas e físico-químicas das bebidas.

Os participantes da pesquisa (provadores) deverão ter acima de 18 anos, ter interesse e disponibilidade para participar e contribuir com este estudo. **Não poderão participar desta pesquisa pessoas com alergia ou intolerância a leite ou derivados lácteos, nem a qualquer um de seus ingredientes** (leite integral pasteurizado, culturas kefir, açúcar e polpa de cagaita). Como forma de garantir a privacidade, as fichas usadas nos testes sensoriais serão de uso exclusivo nesta pesquisa e de acesso limitado aos pesquisadores. Além disso, os nomes dos voluntários não serão divulgados.

Trata-se de um produto elaborado dentro das Boas Práticas de Fabricação (BPF), Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), o que garante a segurança do alimento. Além disso, caso algum provador apresente reação adversa comprovada ao produto oferecido na presente pesquisa este será encaminhado para atendimento médico.

Você não terá nenhuma despesa para participar da pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Vale ressaltar que se você aceitar participar irá avaliar a bebida kefir

saborizada com polpa de cagaita e preencherá uma ficha de avaliação do produto, a qual será de uso exclusivo nesta pesquisa e de acesso limitado aos pesquisadores. Há garantia do sigilo que assegura a privacidade dos sujeitos quanto aos dados confidenciais envolvidos na pesquisa. Você tem liberdade de recusar participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento sem penalização alguma e sem qualquer prejuízo, do mesmo modo, tem a liberdade de se recusar a responder questões que lhe causem desconforto emocional e/ou constrangimento nos questionários que forem aplicados na pesquisa. Em caso de danos imediatos ou futuros em decorrência de sua participação na pesquisa você tem direito de pleitear indenização.

Nome e Assinatura do pesquisador

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, inscrito(a) sob o RG/CPF//n.º de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado “**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BEBIDA KEFIR SABORIZADA COM POLPA DE CAGAITA (*Eugenia dysenterica*)**”. Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informado(a) e esclarecido(a), pelo pesquisador responsável **Juan Carlos Roberto Saavedra More**, sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, _____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) participante

Assinatura do(a) pesquisador(a) responsável

ANEXO III
FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL COM ESCALA HEDÔNICA

Nome: _____ Data: _____

Você está recebendo amostras codificadas da bebida de leite fermentado Kefir. Por favor, prove-as e avalie cada uma das amostras, utilizando as escalas abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto e sua intenção de compra. Escreva a nota que você considera correspondente a cada amostra. Recomendamos comer bolacha e beber água entre uma amostra e outra para retirar o sabor residual.

NOTAS/ESCALA:

- 9 – gostei extremamente
- 8 – gostei muito
- 7 – gostei moderadamente
- 6 – gostei ligeiramente
- 5 – indiferente (não gosta/nem desgosta)
- 4 – desgostei ligeiramente
- 3 – desgostei moderadamente
- 2 – desgostei muito
- 1 – desgostei extremamente

INTENÇÃO DE COMPRA

NOTAS/ESCALA:

- 5. Eu **certamente** compraria
- 4. Eu **provavelmente** compraria
- 3. Eu **tenho dúvida** se compraria ou não compraria
- 2. Eu **provavelmente não** compraria

Código da amostra	Atributos						
	Aparência	Cor	Aroma	Sabor	Consistência	Impressão global	Intenção de compra

Código da amostra	Comentários (opcional)