

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E TECNOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



AMANDA GENTIL POLIZELI
LARISSA FERNANDES DA CRUZ

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE AÇAÍ
(*Euterpe oleracea* Mart.) COM DIFERENTES GRÃOS DE
KEFIR, BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR
ABTS**

BELÉM - PA

2019

AMANDA GENTIL POLIZELI

LARISSA FERNANDES DA CRUZ

**ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE AÇAÍ
(*Euterpe oleracea* Mart.) COM DIFERENTES GRÃOS DE
KEFIR, BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE POR
ABTS**


Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para obtenção de
grau de Tecnólogo (a) em Alimentos, da
Universidade do Estado do Pará.


Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maricely Janette
Uria Toro


Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes
Soares Oliveira

Data de aprovação: 25/10/2019

Banca examinadora:

 Orientadora
Prof^ª. Dr^ª. Maricely Janette Uria Toro
Dr^ª. em Química Analítica
Universidade do Estado do Pará

 - Membro
Prof^ª. Luciane do Socorro dos Santos Brasil
Dr^ª. em Química
Universidade do Estado do Pará

 - Membro
MSc. Gelson Celso Albuquerque Chagas Junior
Nutricionista, Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal do Pará

BELÉM - PA

2019

“Para todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você.”

(J. A. Redmerski.)

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pela força, pelas oportunidades e por cada conquista alcançada.

Aos nossos pais, irmãos e avós que sempre estiveram ao nosso lado em todos os momentos de nossas vidas, por serem nossos maiores incentivadores nessa caminhada e desejarem nossa felicidade e sucesso. Nós amamos vocês;

Aos nossos irmãos de vida, por nos olhar sem julgar, por estar sem forçar e por permanecer por amar. Obrigada pela dádiva que é a amizade de vocês;

À nossa avelha rainha, vulgo orientadora Maricely, por todo carinho, ensinamento, amizade e paciência ao longo dessa caminhada;

À nossa coorientadora Maria de Lourdes por todo apoio e conhecimento despendido para conosco;

Às pessoas que não mediram esforços para nos ajudar, nos ouvirem vibrar, nos ouvirem chorar e também que cresceram com a gente. Em especial, Jacqueline, Maurício, Luan, Adilson e Yuri, nós deixamos a vocês o nosso muito obrigada;

À professora Luciane Brasil por abrir portas a nós nos momentos de dificuldade e por ser um amor de pessoa;

À professora Alessandra Lopes e ao Doutorando Gilson que nos receberam de braços abertos na UFPA, e nos deram a oportunidade de desenvolver nossa pesquisa;

E por fim... aos nossos "pipis", por serem nosso refúgio e saberem a hora certa de nos amar.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar.”

(WALTERS, GRAHAM. Procurando Nemo, 2003.)

RESUMO

Os grãos kefir são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas que quando em substrato, fermentam, obtendo assim uma bebida fermentada. Tendo em vista suas propriedades nutricionais aliadas às propriedades naturais do fruto açaí, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de uma bebida fermentada de açaí e kefir. Testes preliminares foram desenvolvidos, selecionando as amostras F1, F2 e F3, estando a F1 dentro do que preconiza a legislação. Foram elaboradas e avaliadas as características físico-químicas, microbiológicas das bebidas fermentadas F1, F2 e F3 as quais foram elaboradas utilizando diferentes quantidades de açaí, leite, açúcar e kefir, F1 (85 g de açaí; 85 g de leite; 30 g de kefir de leite), F2 (160 g de açaí; 10 g de açúcar; 30 g de kefir de água) e F3 (170 g de açaí; 30 g de kefir de água), sendo estas fermentadas a ± 2 °C por 72h. As formulações elaboradas mostraram resultados de fermentação satisfatórios. As bebidas elaboradas, F1 e F2, obtiveram os melhores resultados para as fermentações. Os parâmetros físico-químicos sólidos totais, proteína, umidade e cinzas permaneceram semelhantes a bebida controle, sendo comprobatório que o processo de fermentação não foi capaz de alterar esses parâmetros, com exceção a bebida F1 que possuía em sua formulação a matéria-prima leite. As formulações F1, F2 e F3 apresentaram valores de antocianinas e flavonoides superiores às literaturas de bebidas fermentadas com kefir e apresentaram atividade antioxidante. E quanto a carga microbiana, houve o aumento, em detrimento da inclusão dos grãos de kefir e encontraram-se em condições higiênico sanitária para consumo. Por fim, o desenvolvimento das bebidas fermentadas com kefir contribuíram para inovação na área de alimentos agregando valor ao fruto regional com a inclusão do mesmo em novas tecnologias.

Palavras-Chave: Kefir; Açaí; Fermentação.

ABSTRACT

Kefir grains are described as a symbiotic association of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria that when fermented in substrate, ferment, getting a fermented drink. Considering your nutritional properties combined with the natural properties of the acai fruit, the present work aims to develop a fermented beverage acai and kefir. Preliminary tests were developed, selecting the samples F1, F2 and F3, being the F1 within what the legislation recommends. The physicochemical, microbiological characteristics of the fermented beverages F1, F2 and F3 were elaborated and evaluated using different amounts of acai, milk, sugar and kefir, F1 (85 g of acai; 85 g of milk; 30 g of milk kefir), F2 (160 g acai; 10 g sugar; 30 g water kefir) and F3 (170 g acai; 30 g water kefir) fermented at $\pm 2^{\circ}\text{C}$ for 72h. The elaborated formulations showed satisfactory fermentation results. The elaborated drinks, F1 and F2, obtained the best results for the fermentations. The physicochemical parameters, total solids, protein, moisture and ash remained similar to the control drink, and it was evidenced that the fermentation process was not able to change these parameters, except for the F1 drink which had in its formulation the raw material milk. The formulations F1, F2 and F3 presented higher anthocyanin and flavonoid values than the literature of kefir fermented beverages and showed antioxidant activity. As for microbial load, there was an increase, to the detriment of the inclusion of kefir grains and were in sanitary hygienic conditions for consumption. Finally, the development of kefir fermented beverages contributed to food innovation and added value to the regional fruit by including it in new technologies.

Keywords: Kefir; Açai; Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da fermentação alcoólica e láctica.....	24
Figura 2 - Reação do ABTS.....	28
Figura 3 - Kefir branco (A) e Kefir transparente (B).....	30
Figura 4 - Fluxograma para teste preliminar das bebidas fermentada F1, F2 e F3.....	31
Figura 5 - Fluxograma para teste preliminar das bebidas fermentadas F4, F5 e F6.....	32
Figura 6 - Fluxograma para elaboração das bebidas fermentadas F1,F2 e F3.....	33
Gráfico 1 - Curva de fermentação tempo x acidez.....	44
Gráfico 2 - Curva de fermentação tempo x pH.....	44
Gráfico 3 - Curva padrão de glicose (g/L).....	47
Gráfico 4 - Curva padrão de Trolox para as amostras Controle, F1 e F3.....	48
Gráfico 5 - Curva padrão de Trolox para a amostra F2.....	48
Gráfico 6 - Curva padrão de Ácido Gálico (g/L) para análise de compostos fenólicos...	49

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Padrões microbiológicos para o kefir.....	21
Quadro 2 - Padrões físico químico para o kefir.....	22
Quadro 3 - Padrões físico-químico para o Açaí.....	29
Quadro 4 - Padrões microbiológicos para o Açaí.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas da matéria-prima açai.....	41
Tabela 2 - Características microbiológicas da matéria-prima açai.....	41
Tabela 3 - Característica físico-química da matéria-prima leite.....	42
Tabela 4 - Características microbiológicas da matéria-prima leite.....	42
Tabela 5 - Resultados das análises físico-químicas sólidos totais, umidade, proteína, lipídeos, cinza e açúcares totais das bebidas fermentadas e controle.....	46
Tabela 6 - Resultados de atividade antioxidante, compostos fenólicos e antocianinas totais.....	49
Tabela 7 – Resultado das análises microbiológicas das bebidas fermentadas e controle...	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS- Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

a.c - Antes de Cristo

ADNS – Ácido 3,5 - dinitrosalicílico

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC – Association of Official Analytical Chemists

ATP- Adenosina trifosfato

BAL- Bactérias ácido-láticas

BHI – Caldo Infuso Cérebro Coração

BP – Baird Parker

BS - Ágar Bismuto Sulfito

CCNT- Centro de Ciências Naturais e suas Tecnologias

Claims- Alegação

cm- Centímetros

CO²- Dióxido de carbono

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMB – Ágar Eosina Azul de etileno

EUA Estados Unidos da América

FAO- Food Agriculture Organization

FOSHU foods for specified health use

g- Grama

gms – Grama de matéria seca

AGE – Ácido gálico equivalente

HCl – Ácido Clorídrico

KB - Kefir branco

KT - Kefir Transparente

L- Litro

µL – Microlitro

mL- Mililitro

M – Molaridade

MRS – Man, Rogosa e Sharpe

NaOH – Hidróxido de Sódio

nm – Nanometro

NMP – Número mais provável

PCA – Plate Count Agar

PDA – Potato Dextrose Agar

pH- Potencial Hidrogeniônico

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

rpm – Rotações por minuto

RTIQ- O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade

SC – Selenito Cistina

Trolox- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico 97%

TT – Tetrionato

UEPA- Universidade do Estado do Pará

UFC- Unidades Formadoras de Colônia

UHT- temperatura ultra alta

v- Volume

XLD - Xilose Ágar Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1.	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2.	OBJETIVO ESPECIFICO.....	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1.	ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	18
3.2.	KEFIR.....	19
3.2.1.	Histórico.....	19
3.2.2.	Definição.....	19
3.2.3.	Microbiota do kefir.....	20
3.2.4.	Características físico-químicas do kefir.....	21
3.2.5.	Manutenção dos grãos.....	22
3.2.6.	Fermentação	23
3.2.7.	Benefícios para a saúde.....	24
3.3.	AÇAI.....	26
3.3.1.	Histórico.....	26
3.3.2.	Definição.....	26
3.3.3.	Mercado.....	26
3.3.4.	Propriedades nutricionais.....	27
3.3.5.	Características físico-químicas e microbiológicas do açaí	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1.	MATERIAL.....	30
4.1.1.	Obtenção da matéria-prima.....	30
4.2.	MÉTODOS.....	30
4.2.1.	Manutenção dos grãos.....	30
4.2.2.	Preparação das bebidas fermentadas.....	31
4.2.2.1.	Testes preliminares.....	31
4.2.2.2.	Elaboração das bebidas fermentadas.....	32
4.2.2.3.	Binômio tempo x acidez e tempo pH.....	33
4.2.3.	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	33
4.2.3.1.	Acidez total titulável.....	33
4.2.3.2.	pH.....	34

4.2.3.3.	Densidade.....	34
4.2.3.4.	Sólidos solúveis totais (°Brix)	34
4.2.3.5.	Açúcares totais por ADNS.....	34
4.2.3.6.	Proteína.....	35
4.2.3.7.	Lipídeos totais.....	35
4.2.3.8.	Umidade e sólidos totais.....	36
4.2.3.9.	Cinzas.....	36
4.2.4.	COMPOSTOS BIOATIVOS.....	36
4.2.4.1.	Atividade antioxidante.....	36
4.2.4.2.	Determinação de antocianinas totais.....	37
4.2.4.3.	Compostos fenólicos.....	37
4.2.5.	ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	38
4.2.5.1.	Coliformes totais.....	38
4.2.5.2.	Determinação de <i>Escherichia coli</i>	38
4.2.5.3.	<i>Satphylococcus aureus</i>	38
4.2.5.4.	<i>Salmonella sp</i>	39
4.2.5.5.	Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas.....	39
4.2.5.6.	Bactérias lácticas.....	39
4.2.5.7.	Bolores e leveduras.....	39
4.2.5.8.	Leveduras específicas.....	40
4.2.5.9.	Bactérias acéticas.....	40
4.2.5.10.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1.	Caracterização química e microbiológica das matérias-primas utilizadas na elaboração das bebidas fermentadas com kefir.....	41
5.2.	Curva de fermentação, caracterização química e microbiológica das bebidas fermentadas com kefir.....	43
5.2.1.	Curva de fermentação	43
5.2.2.	Caracterização físico-química.....	45
5.2.3.	Caracterização microbiológica.....	51
6	CONCLUSÃO.....	54
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

1 INTRODUÇÃO

O kefir também conhecido como quefir, tibicos, cogumelos tibetanos, plantas de iogurte, cogumelos do iogurte e a palavra “kefir”, deriva do turco keif e significa e significa “bem-estar” ou “bom sentimento” (OTLES; CAGINDI, 2003). Os grãos são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, e apresentam tamanhos entre 0,5-3,5cm de diâmetro, volume de 0,5-20,0mL/grão, forma irregular, amarelados ou esbranquiçados (WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

Geralmente, o kefir é elaborado a partir de leite de vaca, porém muitos tipos de leites, tais como cabra, ovelha, égua, búfala e camela também podem ser utilizados (SURIASIH *et al.*, 2012). Além disso, segundo Anselmo (2010), a fermentação também pode ocorrer em água com açúcar mascavo e suco de frutas.

O açaí é o fruto proveniente da palmeira tropical (*Euterpe oleracea Mart*) que é bastante difundida e cultivada na Amazônia brasileira. A polpa é largamente consumida pela população paraense, sendo esta, a principal atividade econômica de muitas famílias ribeirinhas da região (Silva *et al.*, 2017).

O interesse de crescimento exponencial também disponibilizou uma diversificada prateleira, com o lançamento de novos produtos derivados (bebidas funcionais, energéticas, alcoólicas, contendo extrato de açaí, sucos, sorvetes, refrigerantes) com alto valor agregado à “marca” açaí. As novas formas de consumo se dissiparam no fenômeno natural de globalização, conquistando importantes mercados nacionais e internacionais, infiltrando-se às classes nobres de consumidores que o utilizam por motivações outras como estética e saúde (YUYAMA *et al.*, 2011; SILVA e SILVA, 2006; SAMPAIO, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2010).

Culturas probióticas têm sido adicionadas para conferir propriedades funcionais aos alimentos, especialmente em leites fermentados e iogurtes. Contudo, a aplicação de probióticos em outras matrizes alimentares ainda é incipiente. Recomenda-se a diversificação dos produtos para atender a dietas para fins especiais (PRADO *et al.*, 2008).

A partir dos constantes estudos, foi evidenciado o benefício do kefir, principalmente com ação na melhora da atividade intestinal, por ser tolerável por indivíduos com dificuldade de digestão da lactose, possuir atividade microbiana (GAMBA *et al.*, (2016); MIAO *et al.*, (2016), ação anti-inflamatória (CHEN *et al.*, (2012); PRADO *et al.*, (2016), ação antitumoral

(FARNWORTH, 2005) e por possuir capacidade antioxidante (FAHMY e ISMAIL, 2015; SATIR e GUZELSEYDIM, 2015). A partir disso, Prado *et al.*, (2008), expõem a importância de desenvolvimento de novos produtos e necessidade de aprimorar produtos tradicionais.

O presente trabalho mostrará a possibilidade de desenvolvimento de um novo produto capaz de exaltar as propriedades naturais do fruto regional bem como agregar valor ao mesmo a partir de sua utilização como substrato para o kefir, desta forma, valorizando a cultura da região e criando um sentimento de identificação entre o consumidor e o produto.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Elaborar e analisar um produto produzido a partir da fermentação utilizando diferentes colônias de kefir (kefir de água e kefir de leite) tendo como substrato o açaí.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar as condições microbiológicas e físico-químicas das matérias primas: Kefir e açaí.

Desenvolver formulações da bebida fermentada de açaí com cepas de kefir de leite e kefir de água sobre diferentes tempos de fermentação.

Analisar e comparar as diferentes formulações a partir de análises físico-químicas, compostos bioativos e antioxidantes.

Analisar microbiologicamente as formulações desenvolvidas no que rege a legislação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ALIMENTOS FUNCIONAIS

O conceito de alimentos funcionais foi inicialmente introduzido no Japão em meados dos anos 1980, em referência aos alimentos usados como parte de uma dieta normal que demonstram benefícios fisiológicos ou reduzem o risco de doenças crônicas, além de suas funções básicas nutricionais.

Esses alimentos, designados para “uso específico de saúde” (FOSHU, de *foods for specified health use*), trazem um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-estar japonês, e o conceito foi rapidamente adotado no mundo. No entanto, as denominações das alegações, ou *claims*, bem como os critérios para sua aprovação, variam de acordo com a regulação local ou regional (COSTA; ROSA; 2016).

No Brasil, a legislação vigente, aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), em 1999, não define o termo “alimentos funcionais”, mas sim alegação de propriedade funcional que é “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”; e alegação de propriedade de saúde que “é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde” (SILVA *et al.*, 2016).

Dentre os alimentos conceituados como funcionais, estão os probióticos que podem trazer benefícios à saúde quando administrados de modo contínuo em quantidades adequadas. (FAO, 2001 e SCHREZENMEIR; DE VERSE, 2001). Culturas probióticas têm sido adicionadas para conferir propriedades funcionais aos alimentos, especialmente em leites fermentados e iogurtes. Contudo, a aplicação de probióticos em outras matrizes alimentares ainda é incipiente. Recomenda-se a diversificação dos produtos para atender a dietas para fins especiais (PRADO *et al.*, 2008).

Segundo Brasil (2007), leite fermentado é um produto adicionado ou não de outra substância alimentícia, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. Dentre os leites fermentados, estão: iogurte, leite acidófilo, Kefir, Kumys e coalhada.

Em vista da mudança do perfil epidemiológico e nutricional da população brasileira, a procura pelos alimentos considerados funcionais e de componentes responsáveis pelo seu efeito

têm aumentado em consequência do crescente conhecimento sobre a relação do alimento com a saúde, do aumento das comprovações científicas sobre suas funcionalidades, da necessidade de prevenir doenças ao invés de curá-las e dos elevados custos para tratá-las (HENRIQUE *et al.*, 2018).

Em detrimento desses estudos, o kefir é classificado como probiótico pela FAO/WHO (2006) e também pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2002), onde ambas definem o probiótico como sendo organismos vivos que, em quantidades adequadas, são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal trazendo benefícios ao indivíduo.

3.2. KEFIR

3.2.1. Histórico

A origem do kefir ainda é incerta, mas autores afirmam que trata-se de uma bebida originária das montanhas da região do Cáucaso (WITTHUHN *et al.*, 2005; LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006), entretanto o kefir pode ter surgido, independentemente, em diferentes regiões, resultando populações microbianas específicas e distintas, que produziam bebidas com diferentes propriedades sensoriais e microbiológicas (MIGUEL *et al.*, 2010). Em estudo realizado por Yang *et al.*, (2014), foram encontrados vestígios de kefir em tumbas no cemitério de Xiaohe na China, os autores evidenciaram a utilização do kefir nos anos de 1980-1450 a.c., no estudo, há relatos que as tribos locais consumiam o kefir como uma alternativa ao leite, já que as mesmas apresentavam intolerância à lactose.

No fim do século XIX, uma expedição russa foi à região do Cáucaso com a finalidade de conseguir grãos de kefir e utilizá-los no tratamento de doença, como a tuberculose, em casa de saúde, pois já se falava em propriedades “milagrosas” atribuídas ao produto. Em 1908, o produto chegou a Moscou, e começou a ser difundido para outras regiões. Ao longo dos anos, o consumo de kefir ficou restrito aos indivíduos que tinham grãos em suas residências e os utilizavam, repetindo sucessivamente o processo. O produto é encontrado nos comércios dos países como Rússia, Turquia, EUA, Canadá e França (SANTOS, 2008).

3.2.2. Definição

Kefir é um leite fermentado, ligeiramente efervescente e espumoso, de fácil preparo e economicamente acessível, originado da ação da microbiota natural presente nos grãos ou grumos de kefir (Witthuhn *et al.*, 2004; Marchiori, 2007).

O kefir também é conhecido como “quefir”, “tibicos”, “cogumelos tibetanos”, “plantas de iogurte”, “cogumelos do iogurte” e a palavra “kefir”, deriva do turco keif e significa “bem-estar” ou “bom sentimento” (OTLES; CAGINDI, 2003). Os grãos são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, e apresentam tamanhos entre 0,5-3,5cm de diâmetro, volume de 0,5-20,0mL/grão, forma irregular, amarelados ou esbranquiçados (WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

No Brasil, há uma legislação específica que define esse produto. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados define kefir como sendo um leite fermentado o qual é adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, sendo obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, cuja fermentação é realizada com o cultivo de ácidos-láticos elaborados com grãos de kefir (BRASIL, 2007). Os principais produtos finais dessa fermentação, segundo Ertekin; Guzel-Seydim (2009); e Ferreira *et al.*, (2010), são o ácido lático, acetaldeído, acetoína, etanol, diacetil e dióxido de carbono.

3.2.3. Microbiota do Kefir

A composição microbiana dos grãos de kefir pode variar de acordo com a região de origem, o tempo de fermentação, o substrato utilizado, as técnicas de manipulação (WITTHUHN *et al.*, 2004) e a porcentagem dos grãos inoculados (GARROTE *et al.*, 1998). Na composição microbiológica do kefir, estão presentes bactérias ácido láticas, leveduras e alguns fungos miceliais (WITTHUHN, *et al.*, 2005).

Segundo Pogačić *et al.*, (2013); Takizawa *et al.*, (1998); Witthuhn *et al.*, (2005) e Chen *et al.*, (2008), são presentes no grão, leveduras homofermentativas como *Kluyveromyces marxianus*; e leveduras heterofermentativas como *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*, *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. casei*, *L.kefiri*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum*, *L. parakefir*), *Lactococcus* (*L. lactis subsp. lactis*), *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), *Acetobacter*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados (BRASIL, 2007) impõe como padrão de qualidade para o kefir, as contagens mínimas de bactérias apresentada no quadro abaixo:

Quadro 1 - Padrões microbiológicos para o kefir.

Produto	Contagem de bactérias lácticas totais (UFC/g) Norma FIL 117A: 1988	Contagem de leveduras específicas (UFC/g) Norma FIL 94 B: 1990
<i>Kefir</i>	mín. 10 ⁷	mín. 10 ⁴

Fonte: BRASIL, 2007.

Farnworth (2005) relatou que nos grãos de kefir, as bactérias mais numerosas são as lácticas (10^8 - 10^9 UFC/mL) seguido das leveduras (10^5 - 10^6 UFC/mL) e bactérias ácido acéticas (10^5 - 10^6 UFC/mL). Os estudos de Leite *et al.*, (2012) reforçam que dentre três diferentes tipos de kefir analisados no Brasil, as espécies de bactérias mais comumente encontradas em sua composição são as *Lactobacillus*, *kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefir* enquanto que a majoritariedade das leveduras foi representada pela *Saccharomyces cerevisiae*.

As bactérias ácido lácticas se localizam na superfície dos grãos enquanto que as leveduras predominam no centro (LIN *et al.*, 1999). Essas vivem e compartilham seus bioprodutos como fonte de energia e fatores de crescimento e é justamente essa associação de microrganismos que é responsável pela fermentação láctica e alcoólica (WITTHUHN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012; HAMET *et al.*, 2013).

Embora a maior parte dos micro-organismos presentes nos grãos de kefir sejam representados por bactérias, as leveduras são importantes para o equilíbrio microbiológico e desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto final (CASSANEGO *et al.*, 2015).

3.2.4. Características físico-químicas do kefir

A composição físico-química do kefir varia, consideravelmente, com o tipo de leite empregado na fermentação. Um kefir típico contém 89-90% (m/m) de umidade, 0,2% de lipídios, 3,0% de proteína, 6,0% de carboidratos, 0,7% de cinzas e 1% de álcool e de ácido láctico. O kefir possui 1,98 g/L de dióxido de carbono e 0,48% de álcool, sendo que o conteúdo de CO₂ aumenta com a elevação da concentração de grãos de kefir (SARKAR, 2007). No entanto, em um estudo realizado por Liut Kevicius e Sarkinas (2004), foram encontrados nos grãos de kefir, 86,3% de umidade, 4,5% m/m de proteínas, 1,2% m/m de cinzas e 0,03% m/m de lipídios.

A Instrução Normativa N° 46 de 23 de Outubro de 2007 (BRASIL, 2007), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que trata de Padrões de Identidade e Qualidade de Leites e Fermentados, define os padrões físico-químicos para o kefir, conforme o quadro abaixo:

Quadro 2 - Padrões físico-químico para o kefir.

KEFIR		
Matéria gorda láctea (g/100g)	Creme	Mín. 6,0
	Integral	3,0 a 5,9
	Parcialmente desnatado	0,6 a 2,9
	Desnatado	Máx. 0,5
Proteínas lácteas (g/100g)	Mín. 2,9	-
Acidez (g de ácido láctico /100g)	<1,0	-
Etanol (% v/m)	0,5 a 1,5	-

Fonte: BRASIL (2007).

Os dados encontrados por Gorski, (1994) e Mesquiari, (1999) se mostraram dentro dos padrões estabelecidos com cerca de 0,8% (m/m) de ácido láctico, álcool na proporção de 0,1 a 2,0% (m/v) e os autores acrescentaram que o conteúdo de gordura é dependente do leite utilizado, a textura é macia, possui um sabor ácido com pH entre 4,2 e 4,6, é picante e levemente efervescente, resultando numa bebida muito refrescante. As características de sabor picante e sensação efervescente podem ser consideradas como o sabor típico do kefir, o qual é devido principalmente à ótima proporção (3:1) entre diacetil e diacetaldeído.

3.2.5. Manutenção dos grãos

Geralmente, o kefir é elaborado a partir de leite de vaca, porém muitos tipos de leites, tais como cabra, ovelha, égua, búfala e camela também podem ser utilizados (SURIASIH *et al.*, 2012). Além disso, segundo Anselmo (2010), a fermentação também pode ocorrer em água com açúcar mascavo e suco de frutas. Ainda segundo o autor, a vantagem da fermentação feita em água com açúcar mascavo, quando comparado ao leite, é a presença de um leve sabor ácido e um aroma moderado de levedura fresca como a cerveja, além da absorção mais rápida pelo organismo.

Beshkova *et al.*, (2002) expõe que para a manutenção adequada dos grãos, estes devem ser colocados juntamente com o substrato em um recipiente de vidro, esterilizado permanecendo por 24 h em temperatura ambiente de ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), sendo posteriormente coados. O líquido obtido pode ser consumido ou pode ser levado à etapa de maturação, ficando em temperatura de 10°C por mais 24 h. Ao fim, pode ser consumido e, os grãos anteriormente coados, são adicionados a mais substrato para nova fermentação.

Com relação à variação de concentração de grão de kefir para a preparação do kefir, Garrote *et al.* (2001) demonstraram que 10 g/L de grãos de kefir resulta em um produto viscoso e não muito ácido e a concentração recomendada de grãos de kefir utilizados para obter uma bebida ácida com baixa viscosidade e alta efervescência é de 100 g/L. Para Sarkar (2008) 5% de grãos de kefir resultou na produção de etanol e ácidos voláteis.

3.2.6. Fermentação

O kefir é o único produto lácteo cultivado devido à combinação de fermentação láctica e alcoólica (TAS *et al.*, 2012).

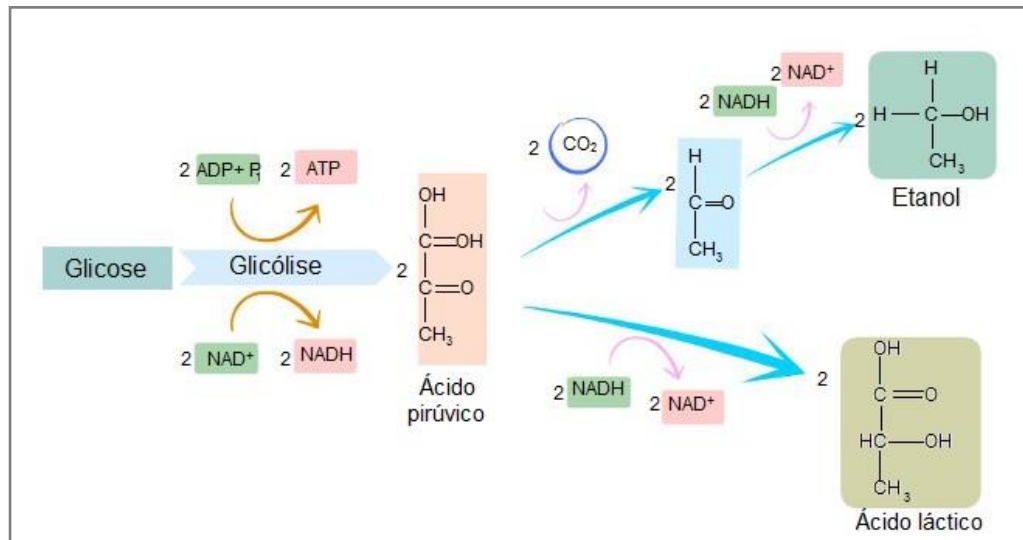
Há dois tipos de fermentação láctica, a homo e heteroláctica sendo a fermentação homoláctica mais comum nos produtos lácteos. Esta fermentação ocorre por ação de enzimas de bactérias lácticas sobre a lactose, que a quebram, obtendo-se primeiramente glicose e galactose, e posteriormente reduzem a glicose ($\pm 90\%$) para ácido láctico, como ex., *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis*. Quanto a fermentação heteroláctica, esta ocorre a partir do metabolismo das bactérias do gênero *Leuconostoc* e alguns *Lactobacillus* heterofermentadores (FRANCO; LANDGRAF, 2005) que desdobram a lactose a ácido láctico e outros metabólitos, como etanol e CO^2 , que são formados em partes aproximadamente iguais (FERREIRA, 1987).

A fermentação láctica auxilia fornecendo um ambiente adequado para o crescimento das leveduras (LOPITZ-OTSOA, *et al.*, 2006). Como consequência da fermentação pelas bactérias ácido-láticas (BAL), há a diminuição do pH com acúmulo de ácido láctico (TAMIME, 2006), até que essa produção seja inibida e os componentes que originam o flavor sejam produzidos (acetaldeído, diacetil, etc) juntamente com aroma de leite fermentado (LOPITZ-OTSOA, *et al.*, 2006).

Na fermentação alcoólica, as leveduras, em condições aeróbicas e sob baixas concentrações de glicose, crescem bem; entretanto, produzem pouco etanol. Em condições anaeróbicas, o crescimento é lento e o piruvato produzido durante o catabolismo é transformado em acetaldeído e CO^2 . O acetaldeído é então reduzido a etanol pela ação da enzima álcool

desidrogenase. A reação geral produz dois moles de etanol e dióxido de carbono para cada mol de glicose consumido, e a energia da reação é armazenada como dois moles de ATP, para ser usada na biossíntese ou manutenção (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Abaixo, segue o esquema de ambas fermentações.

Figura 1 – Esquema da fermentação alcoólica e láctica.



Fonte: Santos (2019).

O produto da fermentação pode ser bebida puro ou, se não apreciar a acidez, pode-se adicionar um pouco de adoçante ou mesmo misturar nas sopas, nos sumos de fruta ou batidos. Tem, igualmente, uma efervescência natural, de gosto “carbonatado” que lhe confere sabor único e o seu odor agradável muito característico (ANSELMO *et al.*, 2010).

As características finais do kefir podem ser modificadas alterando-se o binômio tempo/temperatura do processo fermentativo. Um tempo maior de fermentação à temperatura ambiente irá resultar num produto mais ácido, ao passo que o período longo de armazenamento a temperatura de refrigeração resulta num produto com teor alcoólico mais elevado. Em adição, para redução significativa da lactose deve-se fermentar o kefir por mais tempo (FERREIRA, 2001).

3.2.7. Benefícios para a saúde

Os atributos nutricionais do kefir são devido aos componentes químicos como as vitaminas, proteína e minerais sendo que o processo de fermentação induz o aumento do seu perfil nutricional (SARKAR, 2007).

O kefir é rico em vitamina B1, B12, cálcio, aminoácidos essenciais, ácido fólico e vitamina K, (OTLES e CADINGI, 2003) sendo esse conteúdo de vitaminas influenciado pelo tipo de leite e a microbiota (SARKAR, 2007). Quanto a presença de minerais, no estudo de Otles e Cadingi (2003), foram encontrados em abundância o cálcio e magnésio, que são importantes para o funcionamento adequado do sistema nervoso. Além desses minerais, também foram relatados no estudo de Liut Kevivius e Sarkinas (2004), os minerais potássio, cálcio, magnésio, fósforo e micro minerais como cobre, zinco, ferro, manganês, cobalto e molibdênio.

Otles e Cadingi (2003) também relataram que as proteínas do kefir, devido ao processo fermentativo, são parcialmente digeridas, facilitando a sua utilização pelo organismo. A partir das mudanças no perfil de aminoácidos, foi observado a maior presença treonina, serina, alanina, lisina e amônia do que no leite ou iogurte. Outro pesquisador reportou a presença de valina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, fenilalanina e triptofano (SARKAR, 2007).

As enzimas proteolíticas dos microrganismos que realizam a fermentação podem contribuir para a liberação de peptídeos bioativos, conferindo ao kefir efeitos antioxidantes benéficos à saúde. Durante o processo de fermentação, também ocorre a produção do kefiran por *Lactobacillus kefiranofaciens*, que se constitui em heteropolissacarídeo com proporções equivalentes de glicose e galactose, e se distingue por sua ação antitumoral, antifúngica, antibacteriana, imunomoduladora, anti-inflamatória e antioxidante (CAVARARO *et al.*, 2018).

Dias *et al.*, (2012) relatam a presença de um ambiente desfavorável as bactérias patogênicas durante o processo fermentativo. Bosch *et al.*, (2006); Farnworth, (2005); e Magalhães *et al.*, (2010) explicam que a produção de ácido orgânico, láctico e acético proveniente do catabolismo dos carboidratos na fermentação, é responsável pelo decréscimo do pH, que por sua vez, produz um ambiente hostil para os microrganismos.

A partir dos constantes estudos sobre o kefir, foi evidenciado o benefício de seu consumo, principalmente com ação na melhora da atividade intestinal, por ser tolerável por indivíduos com dificuldade de digestão da lactose, possuir atividade microbiana (GAMBA *et al.*, (2016); MIAO *et al.*, (2016), ação anti-inflamatória (CHEN *et al.*, (2012); PRADO *et al.*, (2016), ação antitumoral (FARNWORTH, 2005) e por possuir capacidade antioxidante (FAHMY e ISMAIL (2015); SATIR e GUZELSEYDIM (2015). A partir disso, Prado *et al.*, (2008), expõe a importância de desenvolvimento de novos produtos e necessidade de aprimorar produtos tradicionais.

3.3. Açaí

3.3.1. Histórico

O açaizeiro (Divisão: Angiospermae; Classe: Monocotyledonae; Ordem: Arcales; Família: Palmae; Gênero: *Euterpe*; Espécie: *Euterpe oleracea Mart.*) é uma palmeira nativa da Amazônia brasileira, encontrada também na Colômbia, no Equador, nas Guianas, em Trinidad e Tobago e na Venezuela. Sua importância socioeconômica e cultural concerne na extração de frutos e palmito. O açaí roxo é o mais comum e o mais consumido, existindo também outros ecotipos de açaizeiro (açaí branco, açaí-açu, açaí-espada, açaí-sangue-de-boi, açaí tinga e açaí chumbinho) (OLIVEIRA, NETO e PENA, 2007).

Açaí é um termo de origem tupi yasa'y(i) e significa literalmente “palmeira de água”. Tornou-se conhecida como palmeira amazônica, de cujo fruto se prepara um suco, designado atualmente pelos que dele fazem uso como “vinho de açaí” (MOURÃO 2010).

3.3.2. Definição

A bebida da polpa de açaí, ou simplesmente açaí, é o alimento mais popular da dieta do consumidor paraense, principalmente da cidade de Belém. Está enraizado na gastronomia da população do Pará e, nesse século, transformou-se em consumo de massa e incorporou-se ao marketing de turismo no Estado do Pará (SANTANA *et al.*, 2014).

O processo de obtenção deste produto se restringe à imersão do fruto em água morna por tempo determinado, a fim de amolecer o mesocarpo antes do despulpamento. Após o amolecimento, o despulpamento é realizado com o auxílio de máquinas (mecânicas ou elétricas), ou manualmente, podendo ser feito com ou sem adição de água. Em seguida, o produto obtido passa por uma peneira, obtendo a polpa para consumo (ALEXANDRE, CUNHA e HUBINGER 2004).

3.3.3. Mercado

O maior consumidor do açaí é o estado do Pará. O suco do açaí é um elemento complementar se não básico nas refeições do dia a dia do povo paraense, essencialmente nas populações de baixa renda. Atrelado ao consumo da população local está expansão em território nacional e internacional deste produto de forma acelerada nos últimos dez anos. Logo a exploração deste fruto pode proporcionar ao estuário amazônico, região nativa da espécie, um melhor padrão de vida (VEDOVETO, 2018).

O interesse de crescimento exponencial também disponibilizou uma diversificada prateleira, com o lançamento de novos produtos derivados (bebidas funcionais, energéticas, alcoólicas, contendo extrato de açaí, sucos, sorvetes, refrigerantes) com alto valor agregado à “marca” açaí. As novas formas de consumo se dissiparam no fenômeno natural de globalização, conquistando importantes mercados nacionais e internacionais, infiltrando-se às classes nobres de consumidores que o utilizam por motivações outras como estética e saúde (YUYAMA *et al.*, 2011; SILVA e SILVA, 2006; SAMPAIO, 2006; SCHAUSS *et al.*, 2010).

O mercado de açaí está em expansão, por seu consumo estar ligado a nutrição saúde e alimentação natural. Os principais consumidores do produto no exterior são Estados Unidos, Japão, Argentina e Chile. Porém a oferta está inferior a demanda, devido a problemas ligados a obtenção da matéria-prima como escoamento, infraestrutura e armazenamento. Muito embora os produtores têm ampliado a oferta através de novos cultivos ou extração nativa (CONAB, 2015; NOGUEIRA *et al.*, 2013).

3.3.4. Propriedades Nutricionais

O açaí, além de apresentar um sabor delicioso e refrescante, é uma fruta com valor nutricional altamente energético, contendo alto teor de lipídios, carboidratos, proteínas, tornando-o um alimento calórico. Ainda apresenta, em sua composição, compostos bioativos, como polifenóis, da classe dos flavonoides, em destaque as antocianinas (DARNET *et al.*, 2011; KANG *et al.*, 2010).

Considerado um alimento com alto potencial antioxidante, o açaí possui em sua composição quantidade considerável de antocianinas responsáveis pela sua coloração, além de ser rico em pelo menos cinco flavonóides antioxidantes: quercetina, catequina, epicatequina, rutina e astrobina. Tais flavonóides são carreadores diretos de radicais livres, desta forma, desempenham um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares (FERNANDO 2013).

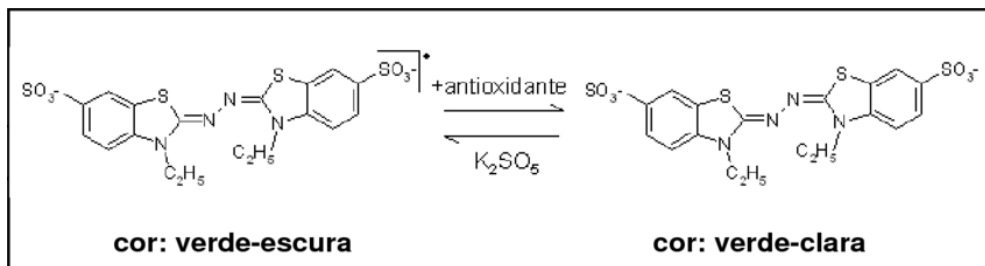
As antocianinas são os compostos hidrossolúveis que contribuem com a maior capacidade antioxidante, além de serem responsáveis pela cor vermelha escura característica da polpa do açaí. Quanto mais escuro o tom vermelho da polpa do açaí, maior será a concentração de antocianinas (BRITO *et al.*, 2007).

Devido ao fruto apresentar propriedades físico-químicas com poder antioxidante, que atuam inibindo ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres, estudos indicam

a possibilidade de o açaí fazer parte dos grupos dos alimentos funcionais (DELPOZOINSFRAN *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2015).

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Figura 2. Reação do ABTS.



Fonte: EMBRAPA (2007).

O radical DPPH[•] já vem pronto para uso e é solúvel em solventes orgânicos, enquanto o ABTS^{•+} necessita ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas, e, é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas e lipofílicas (ARNAO, 2000).

Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS, que apresenta a cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do ABTS^{•+} a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional. Os resultados são expressos em função do Trolox, um padrão antioxidante submetido as mesmas condições de análise (TIVERON, 2010).

3.3.5. Características físico-químicas e microbiológicas do açaí

A Instrução Normativa N° 37 de 1 de Outubro de 2018 (BRASIL, 2018), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento que trata de Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Açaí, define os padrões físico-químicos e microbiológicos para o kefir, conforme os quadros 3 e 4 abaixo:

Quadro 3 - Padrões físico-químico para o Açaí.

Parâmetro	Mínimo	Máximo
pH	4	6,2
Acidez total expressa em ácido cítrico (g/100g)	-	3,2
Açúcares totais naturais do açaí (g/100gms)	-	6
Proteínas (g/100gms)	7	-
Polifenóis Totais (g/100gms)	1,80	-
Antocianinas (g/100gms)	0,44	-
Obs.: gms = gramas de matéria seca		

Fonte: Brasil (2018).

Quadro 4 - Padrões microbiológicos para o Açaí.

Parâmetro	Mínimo	Máximo
Soma de bolores e leveduras	-	10 ³ UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente	
<i>Salmonella sp</i>	Ausente em 25g	
<i>Staphilococcus aureus</i>	-	<10 ² /g
<i>Trypanossoma cruziviável</i>	Não detectável em 25g	

Fonte: Brasil (2018).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Obtenção da matéria-prima

A polpa de açaí foi adquirida em um centro comercial da região de Belém, sendo esta devidamente certificada com selo de qualidade emitido pela Secretaria Municipal de Saúde (SESMA). A polpa foi acondicionada em embalagens de polietileno de 500 mL transparentes e armazenada sob refrigeração em temperatura de 0 a 7 °C sendo levada diretamente para o laboratório de química localizada na Universidade do Estado do Pará (UEPA) onde permaneceu congelada em temperatura de -18 a -25 °C, conforme preconiza a EMBRAPA (2007), até o início dos processos experimentais.

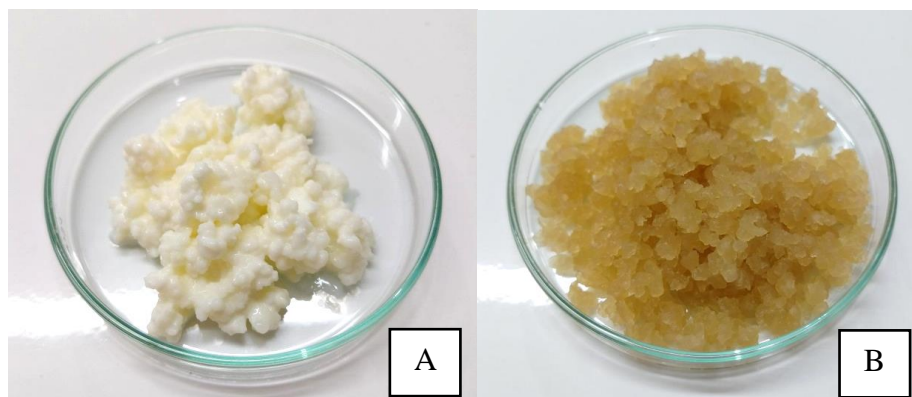
Já as colônias de kefir, tanto de água quanto o de leite foram obtidos através de doação colaborativa realizada na região de Belém. Após recebidos, foi dada continuidade no processo desenvolvimento dos grãos. Os restantes das matérias-primas necessárias, como leite e açúcar mascavo, foram obtidos no comércio local em Belém do Pará.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Manutenção dos grãos

Para a manutenção dos grãos de kefir utilizou-se utensílios de vidro e polietileno esterilizados em estufa a 170 °C por 60 minutos. O kefir de leite permaneceu em leite integral UHT comercial e o kefir de água mantido em solução de água com açúcar mascavo, ambos em temperatura ambiente, e estes foram peneirados e suas fontes de alimentação renovados a cada dois dias, a partir da troca do seu substrato. Os grãos foram inoculados (10% m/v) em 200 mL de leite ou em água contendo açúcar mascavo. Este processo foi executado até a finalização as análises.

Figura 3 - Kefir branco (A) e Kefir transparente (B)



4.2.2. Preparação das bebidas fermentadas

As matérias-primas (açai e leite) foram previamente analisadas antes das elaborações para certificar-se que estavam dentro dos padrões físico-químicos e microbiológicos estabelecidos pela legislação.

4.2.2.1. Testes preliminares

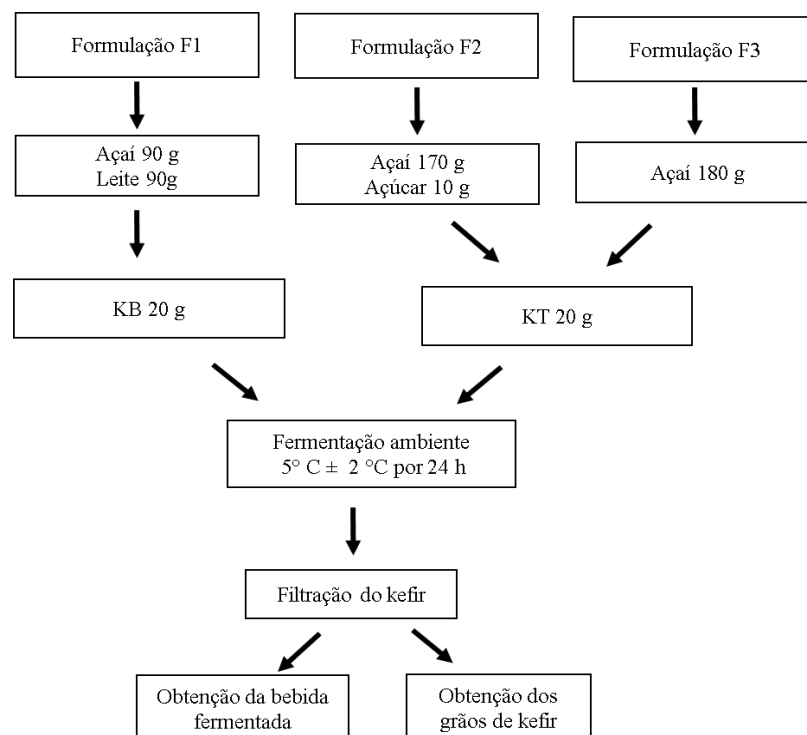
Foram realizados os testes preliminares que serviram para avaliar o crescimento e influência do kefir em diferentes formulações. Foram desenvolvidas seis diferentes formulações as quais tinham como proporção de kefir 20 g de grãos para 180 g de substrato (1:9).

Para a quantidade de açúcar, foi utilizada a proporção de 5% (g/g), e para a formulação que possui leite, utilizado um percentual de 45% (g/g) do total da bebida.

Os ingredientes utilizados para elaboração e suas respectivas proporções, levando em consideração de 200 g de bebida, estão descritos nas Figuras 4 e 5.

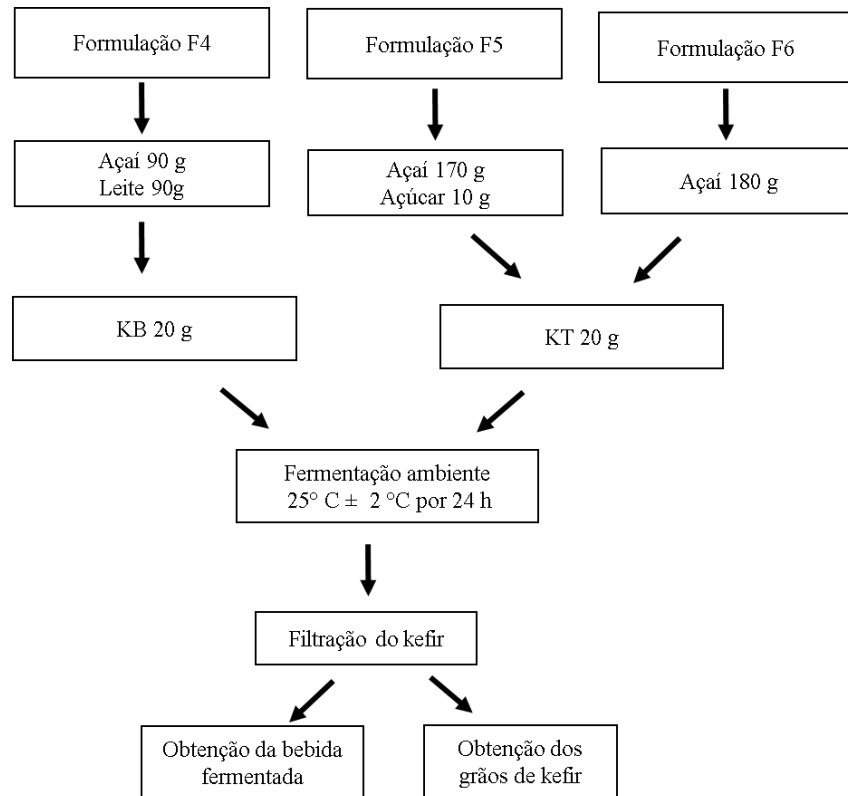
Das 6 formulações realizadas, a F1, F2 e F3 foram fermentadas em temperatura de (± 2 ° C) e a F4, F5 e F6 em temperatura ambiente (± 25 ° C) por um período de 24 horas. Além disso, as formulações F1 e F4, foram fermentadas com kefir de leite (KB) e as formulações F2, F3, F5 e F6 com kefir de água (KT). As fermentações executadas, seguiram os fluxogramas expostos abaixo:

Figura 4 - Fluxograma para teste preliminar das bebidas fermentada F1, F2 e F3.



Fonte: Autores (2019).

Figura 5 - Fluxograma para teste preliminar das bebidas fermentada F4, F5 e F6.



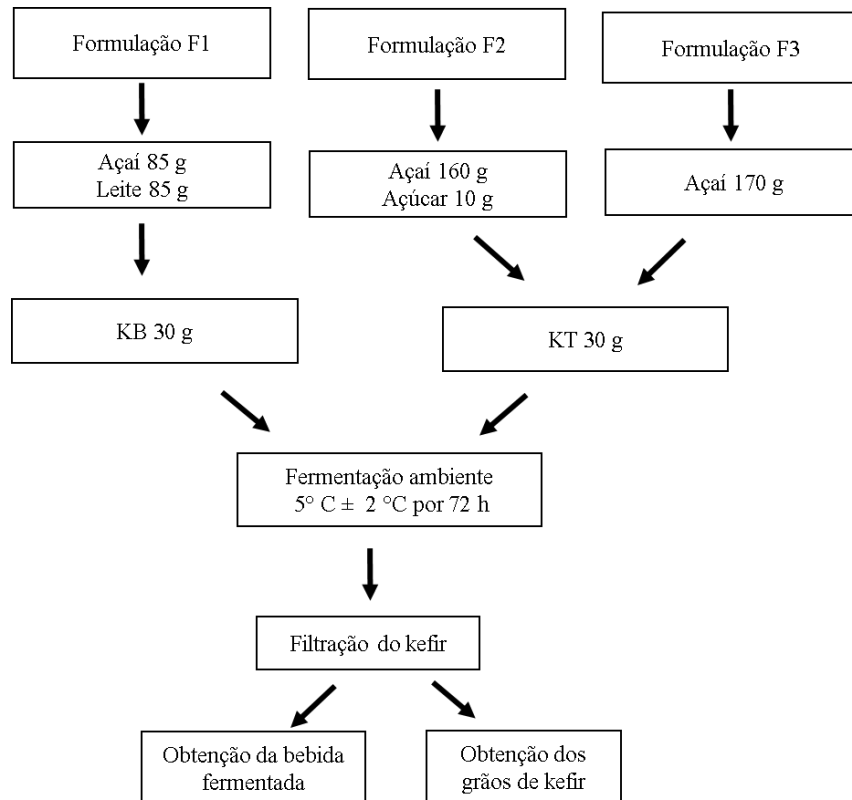
Fonte: Autores (2019).

4.2.2.2. Elaboração das bebidas fermentadas

Após, foram selecionadas as amostras que apresentaram melhores parâmetros sensoriais com a manutenção da cor e sabor, de forma que a bebida, apesar de fermentada, mantivesse as características originais da polpa com cor arroxeadada, odor e sabor característico do fruto, deste modo, as formulações F4, F5 e F6 que não atingiram esses parâmetros foram descartadas. Além disso, as formulações citadas ultrapassaram o valor de acidez desejado, sendo superiores ao que estabelece a legislação Brasil (2007).

Selecionada as amostras F1, F2 e F3, estas foram reformuladas, mantendo a temperatura de fermentação de $(2^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C})$, a proporção de açúcar foi ajustando a relação de grãos para 15% (g/g) e o tempo de fermentação para 72 horas tendo o fluxograma para as novas formulações exposto na Figura 6. Para a formulação com leite, foi utilizada a nova proporção de 42,5% para leite e para açaí. Foi elaborado também uma bebida controle contendo apenas 200 g de açaí, ou seja, sem inoculação de grãos, que foram mantidas sob as mesmas condições que as formulações F1, F2 e F3 para comparação dos resultados encontrados.

Figura 6 - Fluxograma para elaboração das bebidas fermentadas F1, F2 e F3.



Fonte: Autores (2019).

4.2.2.3. Binômio tempo × acidez e tempo × pH

Durante as 72 horas do processo fermentativo, foi realizada análise de pH e acidez das formulações. Para a determinação desses parâmetros, foram coletadas, a cada 12 horas de fermentação, 10 g de amostra. Os resultados obtidos a partir dessas análises tornaram possíveis a elaboração de uma curva de fermentação para verificar o aumento da acidez e decréscimo pH em um período de tempo.

Obtida as bebidas fermentadas, estas foram armazenadas e congeladas em sacos herméticos 12 × 17 cm para a realização das análises físico-químicas e microbiológicas as quais todas foram realizados em triplicata.

4.2.3. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.2.3.1. Acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada por titulação potenciométrica, segundo metodologia descrita pela AOAC (2016). Pesou-se, aproximadamente, 10 gramas da amostra e diluiu-se em 10mL de água destilada. A amostra diluída foi titulada com solução de hidróxido

de sódio (NaOH) 0,1 mol/L, sob agitação contínua, até pH = 8,3. Os resultados foram expressos em g/100 g.

Para determinação da acidez total, foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{V \times f \times M \times P \times E \times 100}{P \times 1000}$$

Onde:

V: volume, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação;

f: fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L;

M: molaridade do NaOH (mol/L);

PE – peso equivalente, ácido cítrico (PE=64,06) e ácido láctico (PE=90);

P – massa da amostra (g).

4.2.3.2. pH

Foi realizado segundo método do Instituto Adolfo Lutz (2008) com auxílio de pHmetro digital (MS TECNOPON® mPA210), previamente calibrado com solução tampão de pH 4,0 e 7,0 (ÊXODO CIENTIFICA®).

4.2.3.3. Densidade

A densidade do leite foi determinada de acordo com os métodos descritos pelo Adolf Lutz (2008). Os valores de densidade foram obtidos por meio da leitura no termolactodensímetro com correção para 15 °C.

4.2.3.4. Sólidos solúveis totais (° Brix)

Foi determinado segundo o método da AOAC (2016) por refratometria, utilizando refratômetro de bancada da Marca Instrutherm, tipo ABBE MOD. RTA-100 com termômetro e conexão para banho termostático. Os resultados foram expressos °Brix.

4.2.3.5. Açúcares totais por ADNS (Ácido Dinitrosalicílico)

Foi utilizada a metodologia descrita por Madonade; Carvalho e Ferreira (2013), onde inicialmente foram preparadas as amostras. Para açúcares não redutores foi preparada uma solução de 1 g/ 100mL para as amostras F1, F3, Controle e para as matérias-primas. Para a amostra F2, foi preparado uma solução de 0,1 g/ 100mL devido maior concentração de açúcares. Após, foi retirado de cada solução 0,5 mL e levado ao tubo de ensaio, adicionando

em seguida, 0,5 mL do reagente ADNS, homogeneizando-os e colocando-os em banho de aquecimento (100 °C) por 5 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados em banho de gelo e a eles foi adicionado 8 mL de Tartarato Duplo de Sódio e Potássio, seguido de homogeneização e leitura em espectrofotômetro (METASH®, modelo UV-5100PC UV/VIS SPECTROPHOTOMETER) em 540 nm.

Foi realizado uma curva padrão de glicose para análise dos resultados. Para açúcares totais, foi realizada antes da etapa descrita acima, uma etapa de hidrólise da amostra que consistiu da adição de 2 mL de ácido clorídrico a 2M à 2 mL de amostra em um tubo de ensaio, levando ao banho de aquecimento por 10 minutos. Após, feito o resfriamento em banho de gelo e então adicionado 2 mL de NaOH a 2M. A partir dessa etapa, deu-se continuidade ao processo anteriormente descrito. Os resultados foram expressos em g/100 gms para as matéria-prima açai, e em g/100 g para as bebidas fermentadas.

4.2.3.6. Proteína

As proteínas foram determinadas utilizando o método proposto por Adolfo Lutz (2008). Foram pesadas 0,250 g de amostra no tubo de kjeldahl e adicionada 1 g de mistura catalítica. Após, foi colocado 5 mL de ácido sulfúrico no tubo e levado para digestor em temperatura de 100 °C. A temperatura foi aumentada 100 °C a cada 1h de digestão, até atingir a temperatura de 400 °C e a amostra se apresentar totalmente transparente e levemente esverdeadas. Após as amostras serem digeridas, seguiram para etapa de destilação onde foi inserido 10 mL de água destilada no tubo, sendo levado para o digestor com aproximadamente 25 mL de hidróxido de sódio no equipamento. Em um Erlenmeyer foi colocado 25 mL de ácido bórico à 2% e 5 gotas de indicador misto e encaixado ao final do destilador. Ao completar a etapa de destilação, foi realizada a titulação com Ácido Clorídrico (HCl) à 0,1 M. O resultado foi expresso em g/100 gms para as matéria-prima açai, e em g/100 g para as bebidas fermentadas e matéria-prima leite.

4.2.3.7. Lipídios totais

A determinação de gordura foi realizada usando o extrator de Soxhlet segundo a metodologia de Adolf Lutz (2008), onde foi utilizado um balão previamente dessecado, pesado 3 g de amostra no papel de filtro, em seguida colocado a amostra no extrator deixando extrair por 6 horas com éter de petróleo. Posteriormente, foi secado o solvente e realizada a pesagem do balão. O resultado foi expresso em g/100 gms para as matéria-prima açai, e em g/100 g para as bebidas fermentadas e matéria-prima leite.

4.2.3.8. Umidade e sólidos totais

A umidade das amostras foi determinada de acordo com os métodos descritos pelo Adolf Lutz (2008). Os valores de umidade foram obtidos por meio do método gravimétrico com secagem a 105 °C em estufa com circulação de ar forçada até peso constante. E os sólidos totais foram obtidos pela diferença do valor encontrado para a umidade. O resultado foi expresso em g/100 gms para as matéria-prima açaí, e em g/100 g para as bebidas fermentadas e matéria-prima leite.

4.2.3.9. Cinzas

Foram obtidas de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2016) n°923.03. A quantidade de resíduo de mineral fixo foi determinada por meio do método gravimétrico com incineração em forno mufla a 550 °C, até completa incineração da amostra identificada por um resíduo final branco ou levemente cinza. O resultado foi expresso em g/100 g.

4.2.4. COMPOSTOS BIOATIVOS

4.2.4.1. Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante determinada pelo método ABTS foi realizada segundo Rufino et al. (2007), onde o ABTS reage estequiometricamente a uma relação 1: 0,5 com o persulfato de potássio. Esse método baseia-se na geração do ABTS⁺, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm.

Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do ABTS⁺ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a perda de cor, a porcentagem de inibição do ABTS⁺ é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante.

Os extratos foram preparados segundo Rufino (2007), com 25 g de cada amostra em um Becker. Em seguida, adicionado 40 mL de solução aquosa de metanol 50% e então deixado em repouso por 60 minutos em ambiente escuro e em temperatura ambiente. Após, foi levado à centrifuga, para centrifugação, durante 15 minutos a 13000 rpm, sendo os sobrenadantes transferidos para um balão de 100 mL.

A partir do resíduo resultante da primeira extração, foi adicionado 40 mL de acetona à 70% e deixado em repouso por 60 minutos. Posteriormente novamente centrifugados e retirados

seus sobrenadantes e transferidos para o balão já contendo o sobrenadante da primeira extração. O mesmo extrato foi utilizado para análise de compostos fenólicos.

A partir desses extratos, foram realizadas diluições de 1%, 5%, 10%, 15%, 20 e 25% em tubos de ensaio. De cada diluição foi retirado 30 μ L e colocado em novos tubos e então adicionado 3 mL do radical ABTS, sendo bem homogeneizado e permanecendo em reação por 6 minutos até leitura no espectrofotômetro (METASH®, modelo UV-5100PC UV/VIS SPECTROPHOTOMETER) à 734 nm. Para a calibração do equipamento foi utilizado o álcool etílico como branco. Os resultados foram expressos como μ M trolox/g.

4.2.4.2. Determinação de antocianinas totais

A determinação dos teores de antocianinas totais foi realizada através da metodologia de pH diferencial descrita por Lee *et al.*, (2005). Foi introduzida, além disso, uma etapa de filtração, para as amostras que apresentavam sobrenadantes, para a eliminação dos mesmos, para deste modo ser possível a determinação da absorvidade da solução.

Para quantificação das antocianinas monoméricas foram consideradas as absorvâncias de 510 e 700 nm das amostras diluídas na solução tampão pH 1.0 e 4.5. Os resultados foram expressos em g/100 gms para a matéria-prima e mg/100 g para as bebidas elaboradas.

4.2.4.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos totais foram determinados pelo método espectrofotométrico proposto por de Singleton e Rossi (1965) e modificado por Georgé *et al.* (2005), utilizando como solução extratora acetona/água (70:30), carbonato de sódio 7,5% e o reagente de Folin-Ciocalteu 10%.

Uma curva padrão de ácido gálico foi elaborada com as seguintes concentrações 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, sendo em seguida lidas as absorvâncias a 760 nm em espectrofotômetro, utilizando-se cubetas de 1 cm de largura, o conteúdo de compostos fenólicos totais, foi calculado utilizando a equação linear, baseada na curva padrão de calibração, o eixo Y equivale a absorvância, e o eixo X a concentração de ácido gálico (mg/L). A concentração de compostos fenólicos foi determinada a partir da curva, sendo expresso em mg de ácido gálico por 100 g de amostra.

4.2.5. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

4.2.5.1. Preparo das amostras

Assepticamente, foram pesadas 20 g de amostra e transferidas para frascos de diluição contendo 180 mL água peptonada salina 0,1% sendo homogeneizadas manualmente por 2 minutos, obtendo-se a diluição 10^{-1} . A partir dessa primeira diluição, obteve-se as demais diluições seriadas até 10^{-3} . Quando a amostra analisada foi a bebida fermentada, as diluições foram realizadas até (10^{-8}).

4.2.5.2. Coliformes Totais

Foi realizada a técnica do Número Mais Provável de Vanderzant e Splittstoesser (1992), utilizando tubos múltiplos contendo caldo lauril sulfato triptose (KASVI®), onde 1 mL de cada diluição foi transferido para cada tubo. Os tubos foram homogeneizados manualmente e incubados em estufa microbiológica (35 °C) por 48 h. Tubos apresentando turbidez e presença de gás tiveram uma alçada ($\approx 10 \mu\text{L}$) transferida para tubos de ensaio contendo caldo verde brilhante 2% (KASVI®) (confirmação de coliformes totais) e incubados em estufa microbiológica a 35 °C por 24 h. O resultado foi expresso em Número Mais Provável por g de amostra (NMP/g).

4.2.5.3. Determinação de *Escherichia coli*

Para confirmação da presença de *E. coli*, uma alçada ($\approx 10 \mu\text{L}$) dos tubos de caldo lauril com resultado positivo foram transferidos para tubos de ensaio contendo caldo ec (KASVI®) e incubados em banho de aquecimento (44,5 °C) por 24 h.

Após, uma alçada de tubos contendo caldo EC que apresentavam turbidez, com ou sem produção de gás no interior do tubo de Durham, foi semeada em placas de Petri contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB). As placas foram incubadas a 35 °C por 24-48 horas. Os resultados foram expressos em ausência ou presença em 25 g.

4.2.5.4. *Staphylococcus aureus*

A determinação foi realizada seguindo a metodologia descrita por Silva; Junqueira e Silveira (2001), utilizando a metodologia de contagem direta em placa, inoculando 0,1 mL de cada diluição na superfície de placa de agar Baird-Parker (KASVI®). Colônias típicas ou suspeitas foram submetidas ao teste de coagulase, no qual foram retiradas uma alçada de massa de células da placa e transferida para tubos de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI, MERCK®)

sendo incubadas por 24h a 35 °C. Após, foi retirado 0,2 mL da cultura, e então adicionado 0,5 mL de Coagulase Plasma – EDTA (Plasma de coelho com EDTA LABORCLIN®) seguido de leve movimento de rotação, sem agitar os tubos, para não inferir na coagulação. Os tubos foram incubados a 35 °C e avaliados durante 6 horas se houve formação de coagulo. Os resultados foram expressos em UFC/ g de amostra.

4.2.5.5. *Salmonella sp*

A determinação foi realizada de acordo com o que propõe Vanderzant e Splittstoesser (1992), através de pré-enriquecimento da amostra em água salina peptonada a 1% tamponada, incubada à 37 °C por 24 h. Após o pré-enriquecimento, a amostra foi transferida para dois diferentes caldos de enriquecimento seletivo, Selenito Cistina (SC) e Tetracionato (TT), incubados a 37 °C por 24 h. Em seguida, foi transferido uma alçada de SC e TT para as placas contendo XLD (Xilose Ágar Lisina Desoxicicolato) e BS (Ágar Bismuto Sulfito), incubadas e invertidas a 35 °C por 24 h. Os resultados foram expressos em presença ou ausência em 25 g.

4.2.5.6. Contagem total de bactérias aeróbias mesófilas

Foi realizado seguindo a metodologia proposta por Compendium of Methods for the Microbiological Examination citado por Faria, Oliveira e Costa (2012) utilizando o método de plaqueamento em superfície onde 0,1 mL de cada diluição foram inoculadas no meio de cultura elaborado. As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C e por fim foi realizada a contagem.

4.2.5.7. Bactérias lácticas

A contagem de bactérias lácticas totais foi realizada segundo Junqueira e Silveira (2001) pelo método de plaqueamento em profundidade a partir de diluições decimais sucessivas das amostras. Inoculou-se 1 mL das diluições em placas de Petri estéreis, sendo acrescidas de meio MRS Agar (Kasvi®) com 0,2% de antifúngico nistatina (Pratti-Donadduzi®). As placas foram incubadas invertidas a 35 °C em estufa durante 48 a 72 horas.

4.2.5.8. Bolores e leveduras

Seguiu-se a metodologia descrita no Compendium of Methods for the Microbiological Examination citado por Faria, Oliveira e Costa (2012). Foi acrescentado nas placas aproximadamente 20 mL de Potato Dextrose Ágar (PDA). Em seguida, foi retirado 0,1 mL de

cada diluição e então inoculadas nas placas contendo o meio. As placas foram incubadas à 25°C por 5 dias e então, realizada a contagem. Os resultados foram expressos em UFC/ g de amostra.

4.2.5.9. Leveduras específicas

0,1 mL de cada diluição foram inoculados em placas de petri contendo YPD Agar (20 g/L glicose, 20 g/L peptona bacteriológica, 10 g/L extrato de levedura, 20 g/L ágar bacteriológico) acrescido de solução de cloranfenicol 100 mg/L para inibição do crescimento bacteriano (Martins *et al.*, 2019). As placas foram incubadas a 25- 28 °C durante 5 dias. Os resultados foram expressos em UFC/ mL.

4.2.5.10. Bactérias acéticas

Seguiu-se a metodologia descrita por Martins et al (2019). Foi inoculado 0,1 mL de cada diluição em placas de petri contendo GYC Agar (10 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de carbonato de cálcio, 50 g/L glicose e 15 g/L de Ágar) acrescido de 0,2 mL de nistatina para inibição do crescimento fúngico. As placas foram incubadas a 30 °C durante 5 dias. Os resultados foram expressos em UFC/ mL.

4.2.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises físico-químicas das bebidas fermentadas e controle foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste t ($p < 0,05$) utilizando o Software Statistica10.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização química e microbiológica das matérias-primas utilizadas na elaboração das bebidas fermentadas com kefir.

A composição físico-química e microbiológica da matéria-prima açaí segue descrita nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Características físico-químicas da matéria-prima açaí.

Parâmetros	Polpa de açaí	Legislação
°Brix	12,00 ± 0,00	Mín. 8 Máx. 14
Sólidos totais (g/100g)	13,47 ± 0,12	Mín. 8%
pH	5,14 ± 0,15	Mín. 4 Máx. 6,2
Acidez em ácido cítrico (g/100g)	0,31 ± 0,30	Máx. 3,2
Umidade (g/100 gms)	6,41 ± 0,06	-
Proteína (g/100 gms)	9,67 ± 0,30	Mín. 7
Lipídios (g/100 gms)	49,37 ± 0,20	Mín. 20 Máx. 60
Cinzas (g/100g)	0,39 ± 0,01	-
Açúcares totais (g/100gms)	4,11 ± 0,04	Máx. 40
Fenólicos totais (g de GAE/100 gms)	3,22 ± 0,04	Mín. 1,80
Antocianinas (g/100 gms)	0,55 ± 0,05	Mín. 0,44

*Resultados expressos em g/100gms de produto. Média de três determinações ± desvio padrão.

Tabela 2 - Características microbiológicas da matéria-prima açaí.

Parâmetros	Polpa de açaí	Legislação
Coliformes (NMP/g)	<3,0	Máx 10 ²
Bolores e leveduras (UFC/g)	5 × 10 ³	Máx 5 × 10 ³
<i>Escherichia coli</i> (ausente em 25 g)	Ausente	Ausente
<i>Salmonella</i> (ausente em 25 g)	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<10	Max ≤102/g

Levando em consideração BRASIL (2018), BRASIL (2001), BRASIL (1999) as quais estabelecem os padrões de identidade e qualidade para polpa de açaí, foi evidenciado que todas as análises realizadas, tanto físico-químicas quanto microbiológica, estão de acordo com o que preconiza ambas legislações, com exceção para umidade e cinzas, que não possui legislação específica.

Quanto a composição físico-química e microbiológica da matéria-prima leite, seguem os resultados encontrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Característica físico-química da matéria-prima leite.

Parâmetros	Leite UHT	Legislação
pH	6,65 ± 0,03	6,6 a 6,8
Sólidos Totais (g/100 g)	11,71 ± 0,05	-
Acidez em ácido láctico (g/100 g)	0,15 ± 0	Mín. 0,14 Máx. 0,18
Umidade (g/100 g)	88,28 ± 0,05	-
Proteína (g/100 g)	3,2 ± 0,03	Mín. 2,9
Lipídios (g/100 g)	3,00 ± 0	Mín. 3,0
Cinzas (g/100 g)	0,74 ± 0,01	-
Densidade	1,030 ± 0	Mín. 1,023 Máx.1,040

* Média de três determinações ± desvio padrão.

Tabela 4 - Características microbiológicas da matéria-prima leite.

Parâmetros	Leite UHT integral	Legislação
Aérobicos mesófilos/ mL	Ausência	Máx. 100

A matéria prima leite foi analisada segundo BRASIL (1996) e BRASIL (2002) que abordam o padrão de identidade e qualidade do mesmo. As análises estão de acordo com o que preconiza ambas as legislações, com exceção as análises de sólidos totais, umidade e cinzas que foram incluídas para servirem como base para a bebida elaborada, desta forma, não estão presentes nas legislações citadas.

5.2. Curva de fermentação, caracterização química e microbiológica das bebidas fermentadas com kefir.

5.2.1. Curva de fermentação

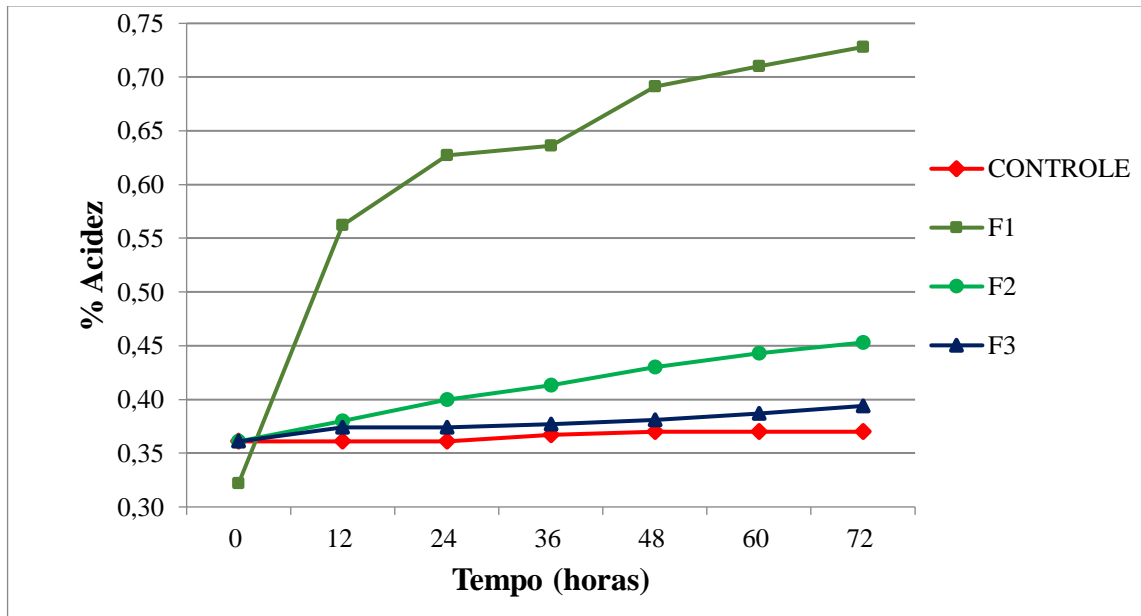
A fermentação revelou uma variabilidade entre as formulações analisadas que pode ser explicada pela composição das elaborações e suas interações com as diferentes culturas de kefir.

Segundo o Regulamento Técnico que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, o teor de acidez para o produto denominado kefir deve estar entre 0,5 a 1,5 g de ácido láctico/100 g (BRASIL, 2007). A formulação F1, por conter leite, foi expressa em peso equivalente a ácido láctico, no entanto, as formulações F2, F3 e a controle, por não possuírem leite em sua constituição, tiveram seus resultados expressos em g de ácido cítrico/100 g, referente a utilização em sua totalidade da matéria-prima açai. Desta forma, para estas formulações, não há uma legislação específica.

Dentre as formulações elaboradas, demonstradas nos gráficos 1 e 2, a que apresentou melhor resposta a fermentação foi a formulação F1 que obteve as maiores variações nos valores de acidez e pH. O valor de acidez variou de 0,322% a 0,728% após as 72 horas de fermentação, desta forma estando de acordo com o que preconiza a legislação.

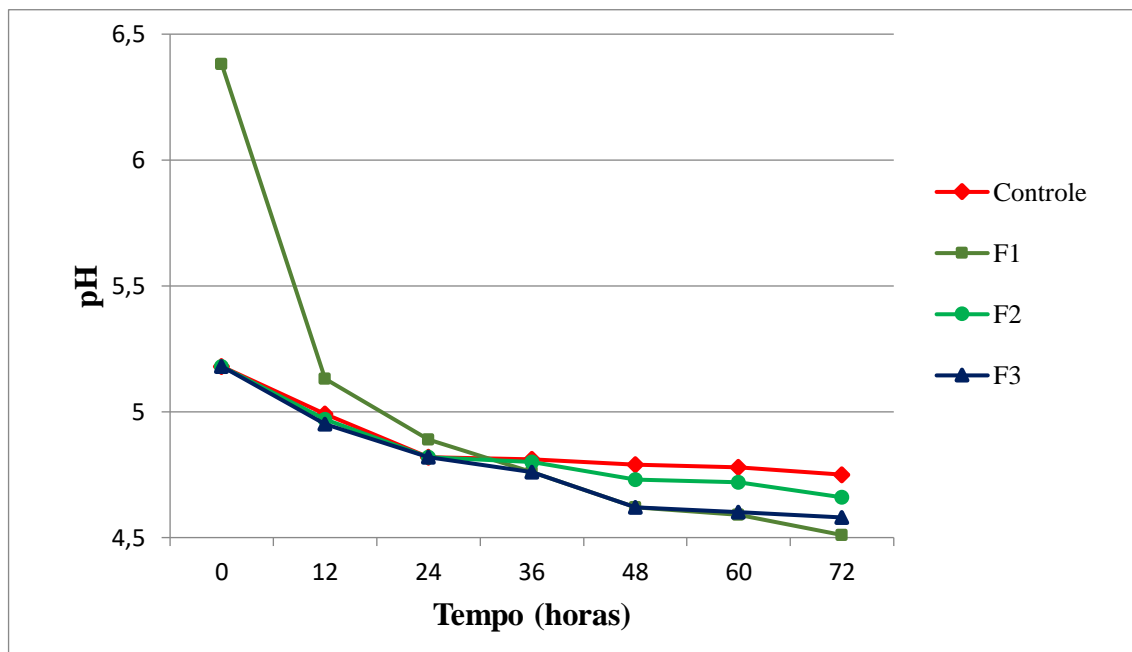
O maior aumento da acidez e o acentuado decréscimo do pH principalmente nas primeiras 12 horas ocorreu devido a formulação F1 possuir maior quantidade de leite em sua composição. Tal fato é reafirmado no estudo de Weschenfelder (2009) que cita que quanto maior a composição de leite na formulação, melhor é o desenvolvimento dos grãos. A relação da quantidade de leite com os resultados encontrados é devido a presença da lactose, que, segundo Tamine (2006), a mesma é degradada na fermentação das bactérias ácido-láticas (BAL), e como consequência, há o acúmulo de ácido láctico.

Gráfico 1 – Curva de fermentação tempo × acidez



*Controle: 200 g de açaí; F1: 85 g de açaí, 85 g de leite e 30 g de kefir de leite; F2: 160 g de açaí, 10 g de açúcar mascavo e 30 g de kefir de água; F3: 170 g de açaí e 30 g de kefir de água.

Gráfico 2 – Curva de fermentação tempo × pH



*Controle: 200 g de açaí; F1: 85 g de açaí, 85 g de leite e 30 g de kefir de leite; F2: 160 g de açaí, 10 g de açúcar mascavo e 30 g de kefir de água; F3: 170 g de açaí e 30 g de kefir de água.

A formulação Controle mostrou pouca variabilidade dos valores de acidez e também de pH tendo como motivo a ausência dos grãos de kefir em sua constituição. Já com relação a

bebida F2, esta teve uma fermentação menos acentuada, quando comparado a bebida F1, devido a fermentação alcoólica realizada por cepas de kefir de água associado a utilização de sacarose como substrato na proporção de apenas 15% (g/g).

Quanto a bebida F3, quando comparado a bebida controle, mostrou um curto aumento do seu parâmetro acidez e diminuição do pH, revelando a possibilidade das cepas de kefir haverem utilizado o açúcar natural presente no açaí como substrato, no entanto, essa quantidade de açúcar presente não se mostra uma boa alternativa para o desenvolvimento de uma bebida fermentada, devido pouca quantidade desse componente, constatado nos resultados das análises físico-químicas.

Um estudo realizado por Santa *et al.* (2008) avaliou a bebida kefir natural (de leite) e saborizado com polpa de frutas ameixa e morango e obteve valores de pH de 4,2 a 4,6 e 0,62 a 0,79% para acidez total. Ao comparar esses estudos com os resultados encontrados, é visto uma semelhança para aos resultados de pH final dos produtos os quais permaneceram entre 4,51 e 4,75. Quanto aos valores de acidez, teve-se para as bebidas controle, F1, F2 e F3 os valores finais de 0,37 %; 0,728 %; 0,453 % e 0,394 % respectivamente. Desta forma, mostrando que apenas a bebida F1 equiparou-se com a do estudo.

Araújo *et al.* (2017), também avaliou acidez titulável e pH de fermentado de kefir natural (de leite) e saborizado com diferentes concentrações de polpa de goiaba e encontrou valores que variaram de 3,5 a 3,7 para pH e acidez de 1,2 a 1,5, estando esses parâmetros inferiores e superiores, respectivamente, ao encontrado neste estudo.

As formulações elaboradas mostraram resultados de fermentação satisfatórios. As formulações F1 e F2, mostraram a possibilidade de substituição do meio tradicional para a fermentação perante permanência de seu substrato específico, o leite e o açúcar. Quanto a formulação F3, mostrou que é possível alterar o substrato, no entanto, devido o açaí possuir pouca quantidade de açúcares necessários para o desenvolvimento dos grãos, a fermentação foi muito inferior as demais.

5.2.2. Caracterização físico-química

Os resultados das análises de sólidos totais, umidade, proteína, lipídeos e cinzas estão dispostos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados das análises físico-químicas sólidos totais, umidade, proteína, lipídeos, cinzas e açúcares totais das bebidas fermentadas e controle.

Parâmetros	Controle	F1	F2	F3
Sólidos totais (%)	18,18 ± 0,73 ^a	14,71 ± 0,54 ^b	20,21 ± 0,79 ^a	18,00 ± 0,84 ^a
Umidade (%)	81,82 ± 0,73 ^b	85,28 ± 0,54 ^a	79,79 ± 0,79 ^b	82,00 ± 0,84 ^b
Proteína (%)	1,59 ± 0,02 ^b	2,49 ± 0,04 ^a	1,66 ± 0,05 ^b	1,62 ± 0,07 ^b
Lipídios (%)	9,01 ± 0,41 ^b	6,00 ± 0,13 ^c	10,09 ± 0,15 ^{ab}	10,49 ± 0,28 ^a
Cinzas (%)	0,55 ± 0,01 ^b	0,69 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,03 ^b	0,50 ± 0,02 ^b
Açúcares Totais (%)	0,55 ± 0,00 ^{bc}	0,67 ± 0,00 ^b	1,40 ± 0,07 ^a	0,50 ± 0,01 ^c

*Os resultados estão expressos na forma de média ± desvio padrão. Média na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os parâmetros físico-químicos encontrados foram de acordo com BRASIL (2018) que define os padrões de identidade e qualidade de suco e polpas de fruta e BRASIL (2007) que define os padrões de identidade e qualidade dos leites fermentados. No entanto, as bebidas elaboradas não puderam ser comparadas com as mesmas, nem com outra legislação, por se caracterizarem como um produto novo, e portanto, não há legislação específica, apenas estudos semelhantes.

Para todos os parâmetros analisados, a formulação F1 teve diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado com as outras formulações, o que pode ser justificado por possuírem em sua composição, componentes diferentes, com a inclusão de leite na formulação F1 e então redução da quantidade de açai. Um estudo realizado por Sales (2017), que elaborou um leite fermentado adicionado de polpa de açai, apresentou a quantidade de sólidos totais entre 12,70 a 14,40 % se mostrando inferiores ao realizado nessa pesquisa. As análises de cinzas e umidade do mesmo autor, equiparam-se as encontradas, variando de 0,43 a 0,74 % e 81,81 a 84,64 %, respectivamente.

O teor de umidade encontrado por Garrote *et al.*, (2001) para o kefir foi de 79,3 a 83,8 % sendo semelhante ao estudo realizado. A formulação F2 obteve o menor valor de umidade e maior quantidade de sólidos devido a adição de açúcar na formulação, aumentando assim o teor de sólidos totais e conseqüentemente, diminuição da umidade.

Em um estudo semelhante, desenvolvido por Semeniuc *et al.*, (2016) foi analisado um kefir adicionado de xarope de pinheiro onde se foi obtido valores de proteína de 3,83 %, sendo

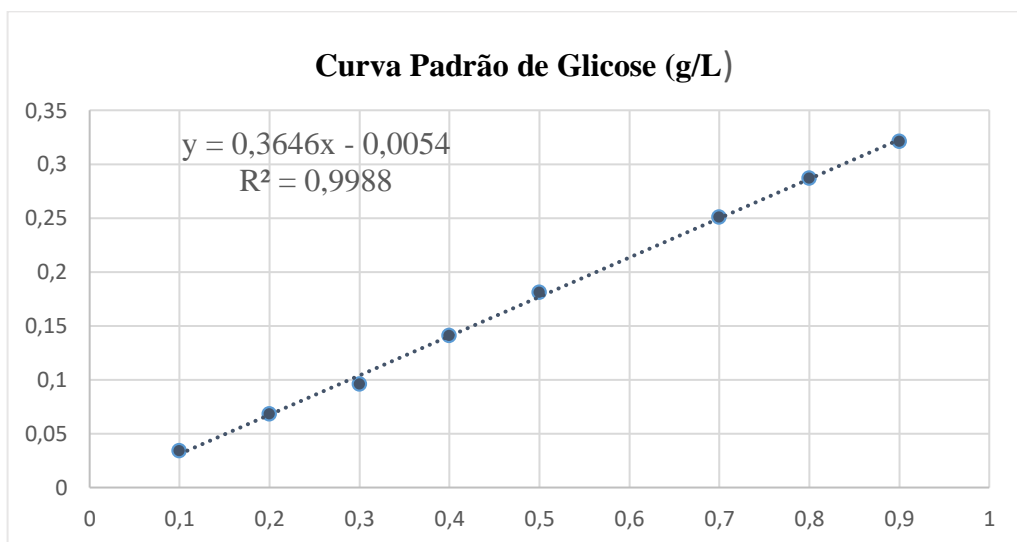
tal valor, superior aos resultados encontrados, no entanto, para valores de lipídeos, o autor obteve 3,45 %, sendo esses resultados inferiores ao da pesquisa desenvolvida.

Contim; Oliveira e Neto (2018), que avaliaram físico-quimicamente o kefir elaborado com polpa de graviola e constataram a redução do valor de proteína na bebida quando comparado com a bebida controle. O inverso aconteceu neste estudo, que quando comparado ao controle, o teor de proteína aumentou, mesmo que em quantidades pequenas, podendo ser explicado pela composição do kefir, que segundo Liut Kevicius e Sarkinas (2004), possui em sua matriz 4,5 % de proteína.

Ainda na pesquisa de Contim; Oliveira e Neto (2018), foi observado a presença de 3 % de gordura na bebida elaborada com graviola. Cabral (2014) encontrou para valores de lipídeo de kefir saborizado com chocolate os valores de 3,4 % a 3,8 %, e Irigoyen *et al.*, (2005) com estudo dos grãos de kefir, o valor de 3,6 %. Todos os estudos apresentaram valores inferiores a pesquisa realizada. Tal fato pode ser explicado devido a polpa de açaí possuir um elevado teor lipídico.

Para a análise de açúcares, foi elaborada a curva padrão de glicose abaixo:

Gráfico 3 – Curva padrão de glicose (g/L).



A formulação F2 diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) para o parâmetro açúcares totais quando comparada com as outras formulações e a bebida controle, mostrando o aumento desse parâmetro que é justificado pela inclusão de açúcar mascavo na formulação o qual não foi totalmente consumido na fermentação. Quanto a formulação F3, houve redução do teor de açúcar, explicado pela pequena fermentação ocorrida que, como citado na curva de

fermentação, pode ter sido ocasionado pelo consumo dos açúcares naturais do açaí na fermentação.

Os resultados encontrados para os parâmetros sólidos totais, umidade, proteína e cinzas não diferiram entre si ($p < 0,05$) quando comparados a bebida controle, com exceção a formulação F1, que teve sua composição acrescentada de leite. A partir desse fato, é comprobatório que o processo de fermentação não foi capaz de alterar esses parâmetros.

Para as análises de atividade antioxidante e compostos fenólicos foram elaboradas curvas padrões as quais encontram-se nos gráficos 4, 5 e 6 abaixo:

Gráfico 4 – Curva padrão de Trolox para as amostras controle, F1 e F3 para análise de atividade antioxidante.

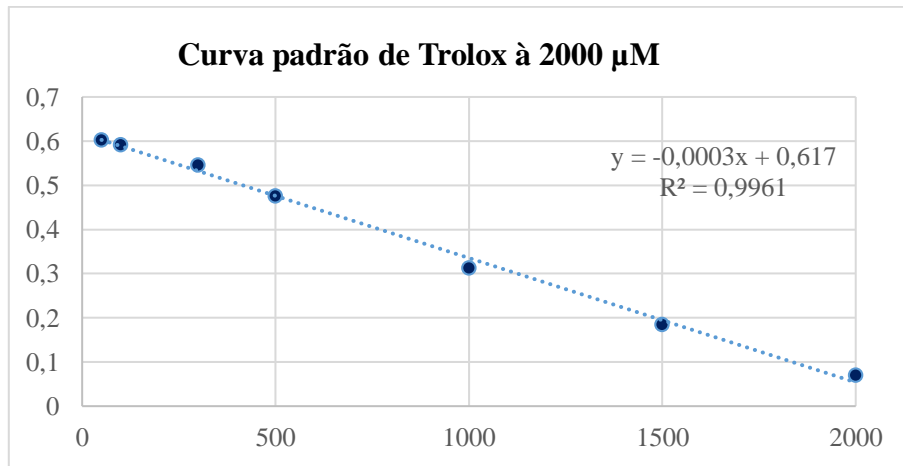


Gráfico 5 – Curva padrão de Trolox para a amostra F2 para análise de atividade antioxidante.

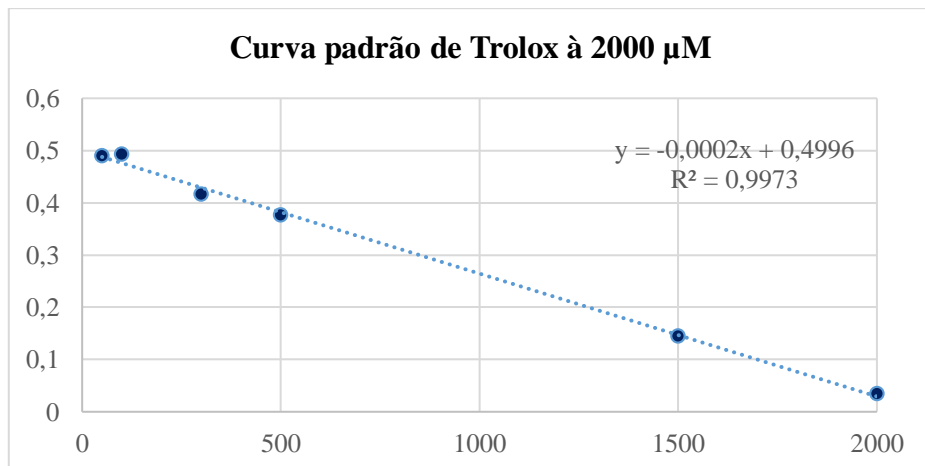
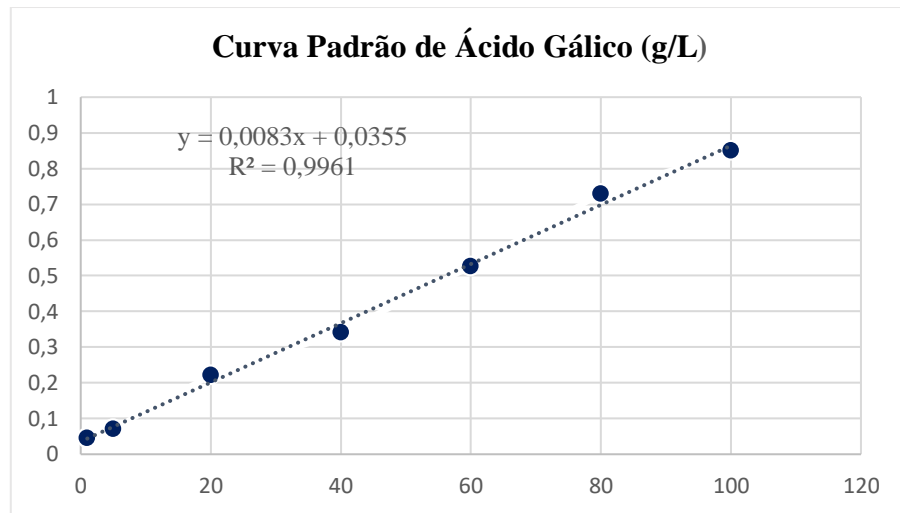


Gráfico 6 – Curva padrão de Ácido Gálico (g/L) para análise de fenólicos totais.



Para os resultados de atividade antioxidante demonstrados na Tabela 6, verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre a formulação Controle comparado com as formulações F1 e F2 as quais tiveram maiores variações de acidez e pH, sugerindo assim que a fermentação foi capaz de diminuir a esse parâmetro.

Tabela 6 – Resultados de atividade antioxidante, compostos fenólicos e antocianinas totais.

Parâmetros	Controle	F1	F2	F3
Atividade Antioxidante (μM de trolox/g)	84,84 \pm 15,23 ^a	31,90 \pm 0,28 ^b	46,97 \pm 2,67 ^b	72,25 \pm 7,26 ^{ab}
Compostos fenólicos (mg de GAE/100 g)	440,94 \pm 8,06 ^a	187,04 \pm 2,55 ^c	354,12 \pm 1,27 ^b	368,37 \pm 5,96 ^b
Antocianinas (mg/100 g)	78,08 \pm 2,99 ^a	30,27 \pm 1,41 ^c	33,27 \pm 1,49 ^c	64,66 \pm 1,47 ^b

*Os resultados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão. Média na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Sales (2017), que caracterizou um leite fermentado kefir adicionado de polpa de açaí, encontrou valores para atividade antioxidante de 0,90 μM de trolox/ g para o kefir adicionado de 10% de polpa e 2,20 μM de trolox/ g para o kefir adicionado de 30 % de polpa. Já os resultados encontrados nesta pesquisa se mostrou superior devido a maior quantidade de polpa

incluída em todas as formulações, implicando dizer que o açaí é o responsável pela maior atividade antioxidante.

Santos *et al.*, (2008), estudando as polpas de açaí comerciais da cidade de Fortaleza - CE, encontrou valores para atividade antioxidante que variaram de 10,21 a 52,47 μM de trolox/g. Tais valores foram inferiores a bebida controle e formulação F3 da pesquisa, que obteve 84,84 e 72,25 μM de trolox/g, respectivamente. Para as formulações F1 e F2, os resultados se equipararam.

O mesmo autor encontrou para quantidade de antocianinas valores semelhantes ao do estudo, estando em um intervalo de 13,93 a 54,18 mg/100 g de açaí. As antocianinas da pesquisa apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) entre a formulação controle comparado as formulações F1, F2 e F3, mostrando que o processo de fermentação teve uma correlação com os resultados encontrados associado também a composição de cada formulação.

No açaí, as antocianinas figuram como os principais compostos fenólicos presentes na sua composição e são responsáveis por grande parte da capacidade antioxidante (DEL POZOINSFRAN *et al.*, 2004).

Quantificando as antocianinas da polpa de açaí, Silva (2017) encontrou o valor médio de 73,54 mg/100 g, sendo este um valor semelhante ao encontrado nesse estudo para a bebida controle e F3. A autora também quantificou os compostos fenólicos encontrando 346,14 mg de GAE/100 g, e atividade de antioxidante de 17,15 μM de trolox/g. Os valores encontrados para compostos fenólicos se equiparam com as bebidas F2 e F3, e se mostram inferiores a bebida controle. Para os valores de atividade antioxidante, este foi muito inferior ao encontrado no estudo.

No desenvolvimento de uma bebida láctea fermentada com kefir e enriquecida com amora preta, Costa *et al.*, (2018) encontrou de valor de 19,85 mg de GAE/100 g para compostos fenólicos e afirmou que a amora preta foi responsável pelo por esse valor, uma vez que, a bebida tradicional de kefir apresentou 6,93 mg de GAE/100 g.

A diferença entre os valores encontrados para a atividade antioxidante, antocianinas e compostos fenólicos pode estar relacionado ao clima, solo da região, período de safra ou não safra, os componentes utilizados em cada formulação, a fermentação realizada, bem como condições de temperatura e processamento. Além disso, segundo Rosário *et al.*, (2016), os compostos bioativos são muito variáveis e sensíveis às condições externas.

A presença de compostos bioativos nos alimentos, segundo Soares *et al.*, (2015), podem atuar indiretamente no estresse oxidativo com a inibição de radicais livres. Desta forma, as

bebidas elaboradas, apesar de possuírem valores inferiores a bebida controle, podem ser consideradas fonte desses compostos.

5.2.3. Caracterização microbiológica

Os resultados das análises microbiológicas das bebidas fermentadas estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Resultado das análises microbiológicas das bebidas fermentadas e controle.

Parâmetros	Controle	F1	F2	F3
Coliformes (NMP/g)	38	<3	93	43
Bolores e leveduras (UFC/g)	$5,0 \times 10^3$	$3,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^6$	$6,9 \times 10^5$
<i>Salmonella spp</i> (em 25 g de amostra)	Ausência	Ausência	Ausência	Ausência
<i>Staphylococcus aureus</i> (UFC/g)	<10	<10	<10	<10
Bactérias acéticas (UFC/mL)	$1,0 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$
Leveduras Específicas (UFC/mL)	$2,3 \times 10^2$	$4,6 \times 10^5$	$2,9 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$
Bactérias lácticas (UFC/mL)	$5,2 \times 10^4$	$8,0 \times 10^5$	$1,7 \times 10^6$	$9,9 \times 10^5$

Para todas as formulações elaboradas houve ausência de *Salmonella spp* em 25 g de amostra, além de <10 UFC/g para contagem de *Staphylococcus aureus*. No entanto, para todos os outros parâmetros avaliados, todas as bebidas apresentaram valores superiores para quantidade de microrganismos. A bebida controle foi a que apresentou os menores valores, indicando que a inoculação das cepas é responsável pelo aumento da quantidade de microrganismos.

Levando em consideração a RDC nº12 de Janeiro de 2001 que dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos, as formulações de kefir com polpa de açaí elaboradas possuíram qualidade sanitária desejada já que apresentaram ausência de *Salmonella spp*. e contagem satisfatória de coliformes, que segundo a legislação, deve estar ausente em 25 g, respectivamente e inferior a $5,0 \times 10^2$ UFC/g.

Segundo Brasil (2007), que rege sobre os padrões de identidade e qualidade dos leites fermentados, impõe que o leite fermentado por kefir deve possuir contagem de bactérias lácticas totais de no mínimo 10^7 e leveduras de no mínimo 10^4 . A bebida F1, a qual possui em sua constituição leite, apresentou valores de bactérias lácticas de 10^5 e leveduras específicas de 10^5 , estando inferior e de acordo com a legislação, respectivamente. A não adequação do parâmetro bactéria láctica pode estar relacionada ao fato de que a formulação não constituiu em sua totalidade da matéria-prima leite, estando a polpa de açaí em grande proporção.

Além disso, um estudo realizado por Irigoyen *et al.* (2005) concluiu que quanto maior a concentração de grãos de kefir no meio favorece o crescimento de microrganismos que inibem a proliferação das BAL, o que ocorreu no estudo, com a inclusão superior de cepas de kefir, na proporção de 30 % de grãos para 200 g de bebida. Tal fato pode ser observado quando comparado com o estudo de Santa *et al.*, (2008), que elaborou um kefir sabor ameixa e morango e obteve valores de 10^8 de bactérias lácticas inoculando 60 g de kefir à 1000 mL de leite. Desta forma, não só a formulação F1 como as demais apresentaram valores inferiores de bactérias lácticas que variaram de 10^5 a 10^6 devido à quantidade de cepas inoculadas que foi superior.

Nos grãos de kefir, geralmente, as bactérias lácticas são mais numerosas (10^8 UFC/mL) que as leveduras (10^5 - 10^6 UFC/mL) e bactérias ácido acéticas (10^5 - 10^6 UFC/mL), embora as condições de fermentações possam afetar esse padrão (FARNWORTH, 2005).

Garrote *et al.* (1998); Irigoyen *et al.* (2005) em seus estudos quantificaram as leveduras e bactérias acéticas de 10^5 e 10^6 UFC/ mL, respectivamente, estando as leveduras semelhante as encontradas nas bebidas F1, F2 e F3 elaboradas, com 10^5 UFC/ mL. Quanto as bactérias acéticas, se apresentaram inferiores ao estudo, no entanto semelhante ao que cita Farnworth (2005), que diz que estas são quantificadas de 10^5 a 10^6 . Além disso, a presença das mesmas é consequência da inclusão das cepas de kefir que as possui em sua composição.

Em um estudo de Sales, (2017) que formulou um leite fermentado kefir adicionado de polpa de açaí, encontrou valores de $1,5 \times 10^6$ até $6,3 \times 10^6$ UFC/g para bolores e leveduras. Já nesse estudo, os valores encontrados variaram de $3,7 \times 10^5$ a $1,2 \times 10^6$ UFC/ g para as bebidas que continham kefir. Comparando a bebida controle e as F1, F2, e F3, é evidente o aumento das UFC, possivelmente pela inclusão dos grãos à formulação.

As características microbiológicas do kefir podem variar perante diversos fatores como a origem dos grãos (GUZEL-SEYDİM *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2009; LUANG-IN; DEESEENTHUM, 2016), tempo, temperatura, manipulação, processamento (GUZELSEYDİM *et al.*, 2005; POWELL *et al.*, 2007; LONDERO *et al.*, 2012) e quantidade

de grãos inoculados (GARROTE *et al.*, 1998). Além disso, a mudança no substrato também pode alterar as características microbiológicas do produto, devido cada substrato possuir uma carga microbiológica diversificada, explicando assim, a variabilidade nos resultados, uma vez que a matéria-prima tradicional do kefir foi alternada para a polpa de açai.

6 CONCLUSÃO

Os parâmetros físico-químicos sólidos totais, proteína, umidade e cinzas das formulações f2 e f3 permaneceram semelhantes a bebida controle, sendo comprobatório que o processo de fermentação não foi capaz de alterar esses parâmetros, com exceção a bebida F1 que possuía em sua formulação a matéria-prima leite, portanto, resultados físico-químicos diferentes. Além disso, as formulações F1, F2 e F3 apresentaram valores de antocianinas e flavonoides superiores às literaturas de bebidas fermentadas com Kefir e apresentaram atividade antioxidante, se mostrando, portanto, bebidas de grande interesse

A inclusão dos grãos de kefir aumentou a carga microbiana presente inicialmente na bebida podendo ser comprovado por comparação com a bebida controle. Para análises de coliformes, *Salmonella spp* e *Staphylococcus aureus*, todas as bebidas se mostraram dentro dos padrões de qualidade.

As bebidas elaboradas se mostraram dentro dos padrões de qualidade higiênico-sanitária e ainda se caracterizam como produtos benéficos a saúde, devido ao valor nutricional e funcional do kefir e açaí que é explanado pelas literaturas e reafirmado no estudo, principalmente quanto sua atividade antioxidante. Em detrimento disso, é de grande interesse e intenção a continuidade desse estudo de forma a abordar a aceitabilidade das bebidas pela população. Por fim, o desenvolvimento das bebidas fermentadas com kefir contribuíram para inovação na área de alimentos agregando valor ao fruto regional com a inclusão do mesmo em novas tecnologias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, D.; CUNHA, R.; HUBINGER, M. Conservação do Açaí pela Tecnologia de Obstáculos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 24(1): 114-119, jan.-mar. 2004.

ANSELMO, R.; VIORA, S.; OJEDA, A.; LAUSADA, I., Efecto Antagónico del Kefir sobre Endosporas y Células Vegetativas de *Bacillus Cereus* y *Clostridium Perfringe.*, **Inf. tecnol.**, v. 21 n. 4, p. 131-138, 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 20th ed. Gaithersburg, M.D, USA, 2016.

ARAÚJO, N.; BARBOSA, I.; SILVA, J.; MACÊDO, C. Influência da concentração de polpa de goiaba na aceitação de fermentado de kefir. **Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 72, n. 4, p. 184-191, out/dez, 2017.

ARAÚJO, R. **Avaliação da qualidade microbiológica de polpas de frutas comercializadas no município de currais novos/rn**. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte, 2015.

ARNAO, M. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.11, p. 419- 421, 2000.

BESHKOVA, M.; SIMOVA, D.; SIMOV, I. Pure cultures for making kefir. **Food Microbiol.**, v.19, p.537-544, 2002.

BOSCH, A.; GOLOWCZYC, A.; ABRAHAM, G.; GARROTE, L.; DE ANTONI, L.; YANTORNO, O. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 280-287, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução. Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, 24 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução. Normativa nº 37 de 08 de outubro de 2018. Regulamento Técnico de Identidade para sucos e polpas de frutas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 08 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, p. 1-54.02 jan. 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 51, de 18 de setembro de 2002. Departamento de Inspeção de Produto de Origem Animal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Nº 146 de 07 de Março de 1996. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF 11 de março de 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 12, de 10 de setembro de 1999. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade para polpas de frutas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília 1999.

BRASIL. Resolução Rdc nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 9 fev. 2002.

BRITO, E.; ARAÚJO, M.; ALVES, R.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B.; NOVOTNY, J. Anthocyanins Present in Selected Tropical Fruits: Acerola, Jambolão, Jussara, and Guajiru. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 55, n. 23, 2007.

CABRAL, N. **Kefir sabor chocolate: Caracterização microbiológica e físico-química**. Trabalho de conclusão de curso, Rio de Janeiro, 2014.

CASSANEGO, D.; RICHARDS, N.; MAZUTTI, M.; CASTRILLÓN, M. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**, v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, 2015, p. 175– 186.

CAVARARO, C.; JUNIOR, J.; DOMINGUES, J.; CHIAPPINI, C. Desenvolvimento e aceitação sensorial de kefir com geleia de goiaba e avaliação de compostos bioativos. **Demetra: Alimentação, Nutrição e Saúde**, 2018.

CHEN, C.; WANG, Y.; CHEN, J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 492-501, 2008.

CHEN, P.; HSIAO, P.; HONG, P.; HONG, W.; DAI, T.; CHEN, M. *Lactobacillus kefirifaciens* M1 isolated from milk kefir grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 63-74, 2012.

COSTA, E.; SANTOS, J.; PEREIRA, M.; MELLO, F. **Aspectos físico-químicos e funcionais de bebida láctea fermentada com kefir enriquecida com amora-preta (*Rubus sp.*)**. Anais do 10º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão – SIEP. Santana do Livramento, 2018.

COSTA, N.; ROSA, C. **Alimentos funcionais: compostos bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro, 2 ed, 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Proposta de preços mínimos safras 2015/2016: **Produtos da sociobiodiversidade**. Brasília, DF: CONAB, 2015.

CONTIM, L.; OLIVEIRA, I.; CARDOSO, N. Microbiological, physicochemical evaluation and sensory acceptance of kefir with graviola pulp. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 73, n. 1, p. 1-9, jan/mar, 2018.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia: manual de microbiologia industrial**. Zaragoza. Acribia, 1993, 392 p.

DARNET, S.; SERRA, J. L.; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. A high-performance liquid chromatography method to measure tocopherols in assai pulp (*Euterpe oleracea*). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2107-2111, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.039>.

DEL POZOINSFRAN, D.; BRENES, C.; TALCOTT, S. Phytochemical composition and pigment stability of Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, 2004, p. 1539-1545.

DIAS, A.; SILVA, T.; TEJADA, S.; LEAL, M.G.; CONCEIÇÃO, R.; TIMM, C. Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 177- 181, 2012.

ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Effect of fat replacer on kefir quality. **Journal of Science of Food and Agriculture**. V. 90, p. 543-548, 2009.

FARIA, M.; OLIVEIRA, L.; COSTA F. Determinação da qualidade microbiológica de polpas de açaí congeladas comercializadas na cidade de Pouso Alegre – MG. **Alimentos e nutrição**. v. 23, n. 2, p. 243-249, abr./jun. 2012.

FARNWORTH, E. **Kefir: a complex probiotic.** Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods, v. 2, p. 1-17, 2005.

FERNANDO F. **Avaliação do efeito das bebidas de açaí no perfil lipídico e glicêmico em ratos wistar.** Dissertação (mestrado), São Carlos, 2013.

FAHMY, H.; ISMAIL, A. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 85-93, 2015.

FERREIRA, C. **Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos.** Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa, 2001, 94p.

FERREIRA, I.; PINHO, O.; MONTEIRO.; FARIA, S.; CRUZ, S.; PERREIA, A.; ROQUE, A.; TAVARES, P. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. **Journal of Dairy Science.** V. 93, p. 27-31, 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; World Health Organization. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for 39 evaluation.** Roma: FAO, 2006. 56 p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba: FAO; WHO; 2001. 34 p. 4.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005.

GAMBA, R.; CARO, C. MARTINEZ, O.; MORETTI, O.; GIANNUZZI, L.; ANTONI, G.; LEON, A. Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. **International Journal of Food Microbiology**, v.235, p. 85-92, 2016.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G. L. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. **Journal of Dairy Research**, v. 65, p. 149-154, 1998.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; ANTONI, G. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v.68, p. 639-652, 2001.

GEORGÉ, S.; BRAT, P.; ALTER, P.; ARNIOT, M. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1370, 2005.

GORSKI, D. kefir, 21st century yogurt? **Dairy Foods**, v. 95, p. 49, 1994.

- SEYDIM, A.; WYFFELS, K.; GREENE, A. Kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 275-277, 2005.
- HAMET, M.; LONDERO, A.; MEDRANO, M.; VERCAMMEN, E.; VAN HOORDE, K.; GARROTE, G. L. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 36, p. 327–334, 2013.
- HENRIQUE, V.; NUNES, C.; AZEVEDO, F.; PEREIRA, S.; BARBOSA, J.; TALMA, S. **Alimentos funcionais: aspectos nutricionais na qualidade de vida**. Aracaju, EdIFS, 2018.
- INSTITUTO ADOLF LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolf Lutz. v.1: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IMESP, 5.ed., 2008.
- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F. C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 613-620, 2005.
- KANG, J.; LI, Z.; WU, T.; JENSEN, G.; SCHAUSS, A.; WU, X. Anti-oxidant capacities of flavonoid compounds isolated from acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 610-617, 2010.
- KUSKOSKI, E.; ASUERO, A.; TRONCOSO, A.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LEE, J.; DURST, R.; WROLSTAD, R. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. **Journal AOAC International**, v. 88, n. 5, p. 1269-1278, 2005.
- LEITE, A.; MAYO, B.; RACHID, C.; PEIXOTO, R.; SILVA, J.; PASCHOALIN, V.; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v. 31, p. 215-221, 2012.
- LIN, C.; CHEN, H.; LIU, J. Identification and Characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian journal of dairy technology**, v. 54, n. 1, p. 14-18, 1999.

LIUT KEVICIUS, A.; SARKINAS, A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. **Dairy Science Abstracts**, v. 66, p. 903, 2004.

LONDERO, A.; HAMET, M.; ANTONI, G.; GARROTE, G. ABRAHAM, A. Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterisation. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 262-271, 2012.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.

LUANG-IN, V.; DEESEENTHUM, S. Exopolysaccharide-producing isolates from Thai milk kefir and their antioxidant activities. **LWT – Food Science and Technology**, v. 73, p. 592-601, 2016.

MALDONADE, I.; CARVALHO, P.; FERREIRA, N. **Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS**. Comunicado Técnico. 2013.

MARCHIORI, C. Caracterização do kefir e propriedades probióticas: uma revisão. **Inst. Lat. Cândido Tostes**, v.62, p.21-31, 2007.

MARTINS, P.; RIBEIRO, L.; MIGUEL, M.; EVANGLISTA, S.; SCHWAN, R. Production of coffee (*Coffea arabica*) inoculated with yeasts: impact on quality. **J Sci Food Agric**, Minas Gerais, 2019.

MAGALHÃES, K.; PEREIRA, G.; DIAS, D.; SCHWAN, R. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 1241-1250, 2010.

MESQUIARI, M. **Desenvolvimento tecnológico de um sucedâneo de quefir - Iofir®**. Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos, Belo Horizonte, 1999

MIAO, J.; LIU, G.; KE, G.; FAN, W.; LI, C.; CHEN, Y.; DIXON, W.; SONG, M.; CAO, Y.; XIAO, H. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 65, p. 63-72, 2016.

MIGUEL, M.; CARDOSO, P.; LAGO, L.; SCHWAN, R. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 42, p. 1523-1528, 2010.

- MOURÃO, L. História e natureza: do açaí ao palmito. **Territórios e Fronteiras**, v.3 n.2 – Jul/Dez, Mato Grosso, 2010.
- NOGUEIRA, A.; SANTANA, A.; GARCIA, W. A dinâmica do mercado de açaí fruto no estado do Pará: de 1994 a 2009. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 60, n. 3, p. 324-331, maio/jun. 2013.
- OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Food Engineering Department**, v.2, p.54-59, 2003.
- OLIVEIRA, M.; NETO, J.; PENA, R. Açaí: técnicas de cultivo e processamento. Fortaleza: **InstitutoFrutal**, 2007.
- POGAČIĆ, T.; ŠINKO, S.; ZAMBERLIN, S.; SAMARŽIJA, D. **Microbiota of kefir grains**, *Mljekarstvo*, v. 63, n. 1, p. 3-14, 2013.
- POWELL, J.; WITTHUHN, C.; TODOROV, T.; DICKS, T. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 190-198, 2007.
- PRADO, M.; BOLLER, C.; ZIBETTI, R.; SOUZA, D.; PEDROSO, L.; SOCCOL, C. Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan kefir. **Microvascular Research**, v. 108, p. 29-33, 2016.
- PRADO, F.; PARADA, J.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. Trends in non-dairy probiotic beverage. **Food Research International**, v. 41, p. 111-123, 2008.
- ROCHA, S.; OLIVEIRA, A.; COSTA, M. Benefícios funcionais do açaí na prevenção de doenças cardiovasculares. **Journal of Amazon Health Science**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2015.
- ROSÁRIO, V.; MATTIETTO, R.; LANES, J.; OLIVEIRA, M. **Determinação de antocianinas e compostos fenólicos totais em diferentes genótipos de açaí**. Seminário de Pós-graduação da Embrapa Amazônia Oriental. Pará, 2016.
- RUFINO, M.; ALVES, R.; BRITO, E.; MORAES, S.; SAMPAIO, C.; JIMÉNEZ, J.; SAURACALIXTO, F. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante em Frutas pela Captura do radical livre ABST+**. Embrapa Agroindustrial Tropical: Comunicado Técnico 128. Fortaleza-CE. 4p, 2007.
- SALES, L. **Caracterização e estabilidade de leite fermentado kefir elaborado com adição de popa de açaí**. Dissertação, Fortaleza, 2017.

- SAMPAIO, P. **Avaliação das Propriedades Funcionais do açaí (*Euterpe oleracea*) em plasma humano**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará. Belém, 2006.
- SANTA, O.; CARDOSO, F.; MOTA, G.; BASTOS, R.; RIGO, M.; SANNTA, H. **AVALIAÇÃO SENSORIAL DE KEFIR SABOR AMEIXA E MORANGO**. **R. Bras. Agrociência**, Pelotas, v.14, n 4-4,p.77-85,out-dez, 2008.
- SANTOS, J. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.
- SANTOS, V. Mundo educação: Fermentação. 2019. Disponível em <https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/fermentacao.htm>. Acesso em 01/10/2019.
- SANTANA, A.; SANTANA, A.; SANTANA, A.; SANTOS, M.; OLIVEIRA, C. Análise discriminante múltipla do mercado varejista de açaí em Belém do Pará. **Rev. Bras.Frútic.**, Jaboticabal - SP, v. 36, n. 3, p. 532- 541, Setembro 2014.
- SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, v. 110, p. 283-295, 2008.
- SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SATIR, G.; SEYDIM, B. Influence of kefir fermentation on the bioactive substances of diferente reed goat milks. **Food Science na Technology**, v. 63, p. 852-858, 2015.
- SCHAUSS, A.; CLEWEL, A.; BALOGH, L.; SZAKONYI, I.; FINANKSEK, I.; HORVATH, J.; THUROCZY, J.; BERES, E.; VERTESI, A.; HIRKA, G. Safety evaluation of an açaí-fortified fruit and Berry functional juice beverage (MonaVie Active®). **Toxicology**, n. 1, v. 278, p. 46-54, 2010.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.; SILVEIRA, N. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2ª.ed. São Paulo: Varela, 2001.
- SILVA, A.; BECKMAN, J.; RODRIGUES, A.; SILVA, L. **Rev. bras. Tecnol. Agroindustr**, Ponta Grossa, v. 11, n. 1: p. 2205-2216, jan./jun. 2017.

SILVA, F.; SILVA, I. **Perfil do consumidor domiciliar de Açaí na região metropolitana de Belém-PA**. XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, Fortaleza-CE, julho, 2006.

SILVA, A.; SILVA, N.; PREIRA, M.; VASSIMON, H. Alimentos Contendo Ingredientes Funcionais em sua Formulação: Revisão de Artigos Publicados em Revistas Brasileiras. **Revista Conexão Ciência**. Vol. 11, Nº 2. São Paulo, 2016.

SCHREZENMEIR, J.; VERSE, M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaching a definition. **Am J Clin Nutr**. 2001; 73(2):361-364. 5.

SEMENIUC, C.; ROTAR, A.; STAN, L.; POP, C.; SOCACI, S. MIREȘAN, V. MUSTE, S. Characterization of pine bud syrup and its effect on physicochemical and sensory properties of Kefir. **CyTA - Journal of Food**, v. 14, n. 2, p. 213–218, 2016.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-168, 1965.

SOARES, E.; MONTEIRO, E.; SILVA, R.; BATISTA, A.; SOBREIRA, F.; MATTOS, T.; COSTA, C.; DALEPRANE J. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista HUPE**. Rio de Janeiro, 2015.

SURIASIH, K. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. **Food Science and Quality Management**. v. 6, 2012.

S. Y.; CHEN, K. N.; LO, Y. M.; CHIANG, M. L.; CHEN, H. C.; LIU, J. R. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, v. 32, p. 274–285, 2012.

TAMIME, A. Production of Kefir, Koumiss and Other Related Products. In: TAMIME, A. Y. (Ed.). *Fermented Milk*. Oxford, UK: **Blackwell Science Ltd**, 2006. cap. 8, p.174-216.

TAMIME, A. *Fermented Milks*. 1ª ed. Inglaterra: **Blackwell Publishing**. 2006

TAKIZAWA, S.; KOJIMA, S.; TAMURA, S.; FUJINAGASA, S.; BENNO, Y.; NAKASE, T. The composition of the Lactobacillus flora in kefir grains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 121-127, 1998.

- TAS, T. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 126-131, 2012.
- TIVERON, A. **Atividade Antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Dissertação, Piracicaba, 2010.
- VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3th ed. Washington: **American Public Health Association**, 1992.
- VEDOVETO, M. **Caracterização do Mercado de Açaí** (*Euterpe oleracea* Mart.) em Belém entre 2006 e 2008. Belém. 2018.
- WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G.; CARVALHO, H.; WIEST, J. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.2, p.473-480, 2011.
- Weschenfelder, S. **Caracterização do kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-Escherichia coli**. Dissertação, Porto Alegre, 2009.
- WITTHUHN, R.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A.; BRITZ, J. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, v. 22, p. 337-344, 2004.
- WITTHUHN, R.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383-389, 2005.
- YANG, Y.; SHEVCHENKO, A.; KNAUST, A.; ABUDURESULE, I.; LI, W.; HU, X.; WANG, C.; SHEVCHENKO, A. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. **Journal of Archaeological Science**. v. 45, p. 178-186, 2014.
- YUYAMA, L.; AGUIAR, J.; FILHO, D.; YUYAMA, K.; VAREJAO, M.; FAVARO, D.; VASCONCELLOS, M.; PIMENTEL, S.; CARUSO, M. Caracterização físico-química do suco de açaí de *Euterpe precatoria* Mart. Oriundo de diferentes ecossistemas amazônicos. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 4, p. 545-552, 2011.
- ZHOU, J.; LIU, X.; JIANG, H.; Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770-775, 2009.



Universidade do Estado do Pará
Centro de Ciências Naturais e Tecnologia
Curso de Tecnologia de Alimentos
Travessa Enéas Pinheiro, 2626 – Marco
66095-490. Belém – PA
www.uepa.br

