



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PAULA TAIS MAIA SANTOS

**BEBIDA FERMENTADA DE UMBU (*Spondias tuberosa* Arruda
Câmara) COM POTENCIAL PROBIÓTICO UTILIZANDO
CULTURA DE Kefir**

São Cristóvão SE

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DEALIMENTOS

PAULA TAIS MAIA SANTOS

**BEBIDA FERMENTADA DE UMBU (*Spondias tuberosa* Arruda
Câmara) COM POTENCIAL PROBIÓTICO UTILIZANDO
CULTURA DE Kefir**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Sérgio Tonetto de Freitas

Coorientador: Dr. Marcelo Augusto Gutierrez Carnelossi

Colaboradores: Dr^a Ana Cecilia Poloni Rybka e Dr^a Tatiana Pacheco Nunes

Agência Financiadora: CNPq

São Cristóvão- SE

2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237b Santos, Paula Tais Maia.
Bebida fermentada de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) com potencial probiótico utilizando cultura de Kefir / Paula Tais Maia Santos; orientador Sérgio Tonetto de Freitas. – São Cristóvão, SE, 2022.
98 f.; il.

Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Umbu-cajá. 2. Antioxidantes. 3. Flavonóides. 4. Bebidas fermentadas. 5. Kefir. 6. Alimentos funcionais. 7. Probióticos. I. Freitas, Sérgio Tonetto de, orient. II. Título.

CDU 634.442

PAULA TAIS MAIA SANTOS

**BEBIDA FERMENTADA DE UMBU (*Spondias tuberosa* Arruda
Câmara) COM POTENCIAL PROBIÓTICO UTILIZANDO
CULTURA DE Kefir**

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Sérgio Tonetto de Freitas
Orientador/ PROCTA -UFS



Prof. Dr^a Patrícia Beltrão Lessa Constant
Examinador Interno/ PROCTA - UFS



Prof. Dr^a Tatiana Pacheco Nunes
Examinador Externo/DTA - UFS

São Cristóvão- SE

2022

Dedico esse trabalho ao meu avô, em memória. Não teria conquistado essa etapa da vida se não fosse pela confiança e incentivo que me prestou em vida.

Ter realizado a finalização deste projeto é uma vitória não só para mim, mas para a minha família, Carlos Alexandre Carvalho Santos, Lucilia Maia Santos, Helenira Carvalho Santos, Juliane Maia Santos e Ana Caroline Maia Santos . E estendo a palavra família à Judite de Souza Santos e José Lino dos Santos, os quais sempre se dispuseram a me apoiar. Ainda, agradeço à aqueles que estiveram comigo em todo o processo, em especial Lucas de Souza Santos, que esteve ao meu lado ao longo desta conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

SANTOS, P. T. M. Bebida fermentada de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) com potencial probiótico utilizando cultura de kefir. [Dissertação]. São Cristóvão: Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Sergipe; 2022.

RESUMO

O mercado de bebidas fermentadas vem crescendo aproximadamente 10% ao ano. Isto se dá pela procura de alimentos rápidos para consumo e que garantam nutrição ao indivíduo, principalmente os de caráter funcional. O umbu é um fruto saboroso e nutritivo, possuindo altos teores de compostos antioxidantes, alcaloides, taninos e flavonoides. Em se tratando de componentes benéficos para a saúde, também se encontram os microrganismos que proporcionam vantagens metabólicas e fisiológicas aos consumidores, classificados como probióticos. A cultura proveniente dos grãos de kefir vem se destacando nos últimos anos, devido a sua capacidade de retenção de diversos microrganismos considerados probióticos envolvidos de uma matriz polissacarídea. As espécies de microrganismos produzidos na cultura kefir variam de acordo com o meio o qual é cultivado. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de uma bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir como inoculante. Para isto, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a definição de meio de fermentação dos microrganismos, sendo obtido no final uma formulação otimizada com base nos teores de compostos bioativos. Foram avaliadas 11 formulações onde a concentrações de polpa de umbu variou de 0% a 100% e a concentrações de açúcar de 4,0%, a 12,0%. A formulação otimizada passou por análise sensorial, juntamente com outras duas formulações que obtiveram significativamente ($p < 0,05$) maiores teores de compostos bioativos, sendo avaliados teor de fenólicos totais, flavonoides e carotenoides. A formulação escolhida após a análise sensorial foi a composta por 50% e polpa e 12% de açúcar. Esta seguiu para a realização da viabilidade dos microrganismos probióticos, compostos bioativos e análises físico-químicas por 28 dias, na ausência de luz e em refrigeração ($8 \pm 1^\circ\text{C}$). O ciclo populacional de bactérias ácido lácticas presentes permaneceu inalterada ($p < 0,05$) pelos 28 dias de armazenamento a $8^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, estando seus valores compreendidos em 6,58 a 6,93 log. UFC/ml. Entretanto, as bactérias acéticas tiveram um aumento significativo ($p < 0,05$) nos últimos três dias de armazenamento, com população na faixa de 7,04 a 7,74 log UFC/ml e leveduras com variação significativa ($p < 0,05$) nos dois últimos dias, com população entre 7,04 a 7,49 logUFC/ml. Os compostos fenólicos tiveram maiores teores da 1ª semana para a segunda e permanecendo constantes até 21 dias a $8^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Os flavonoides apresentaram um aumento

de concentração até 21 dias a $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Houve a degradação dos carotenoides ao longo do tempo de armazenamento. A bebida de umbu fermentada com grãos de kefir apresentou resultados satisfatórios no decorrer do tempo de armazenamento, indicando ser um alimento com potencial probiótico com a presença de compostos bioativos.

Palavras-chave: Fruto, Caatinga, Semiárido, consumidor, alimento.

SANTOS, P. T. M. Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) fermented drink with probiotic potential using kefir culture. [Dissertation]. São Cristóvão: Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Sergipe; 2022.

ABSTRACT

The fermented beverage market has been growing approximately 10% per year. This is due to the search for ready-to-eat foods that guarantee nutrition to consumers, especially those with functional properties. Umbu is a tasty and nutritious fruit, with high levels of antioxidant compounds, alkaloids, tannins and flavonoids. When it comes to beneficial components for health, there are also probiotics from fermentation processes that result in substances and microorganisms that provide metabolic and physiological advantages to consumers. Kefir culture has gained prominence in recent years due to its ability to produce various lactic acid microorganisms surrounded by a polysaccharide matrix. The species of microorganisms produced in the kefir culture vary according to the matrix used as the culture medium. Thus, this work aimed to develop an umbu-based kefir drink with probiotic potential. In order to accomplish this, the study defined the matrix to be used for the growth of microorganisms, based on the bioactive compounds, evaluating the combination of 5 umbu pulp concentrations (0%, 35%, 50%, 85% and 100%) and 5 sugar concentrations (4.0%, 5.16%, 8.0%, 10.84% and 12.0%), following the central rotational composite design (CRCD). The optimized formulation underwent sensory analysis, along with other formulations that obtained the highest levels of bioactive compounds. The formulation chosen after the sensory analysis was composed of 50% pulp and 12% sugar. This formulation was then subjected to the analyses of the viability of probiotic microorganisms, as well as bioactive compounds and physicochemical quality. The population of probiotic microorganisms of lactic acid bacteria present remained unchanged ($p < 0.05$) for 28 days of storage at $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, with values ranging from 6.58 to 6.93 log CFU/ml. However, acetic bacteria had a significant increase ($p < 0.05$) in the last three days of storage, with population ranging from 7.04 to 7.74 log CFU/ml and yeasts with significant variation ($p < 0.05$) in the last two days, with a population between 7.04 and 7.49 log CFU/ml. The phenolic compounds had higher levels from the first to the second week and remained constant up to 21 days at $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Flavonoids showed an increase in concentration up to 21 days at $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. There was a degradation of carotenoids during storage. The umbu drink fermented with kefir grains showed satisfactory results during storage, indicating that it is a food with probiotic potential and bioactive compounds.

Keywords: Fruit, Caatinga, Semi-arid, consumer, food

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matriz Produto – Mercado, baseado no modelo de Vasco (2001).	30
Tabela 2. Cálculos das variáveis dos ensaios do DCCR.	44
Tabela 3. Variáveis codificadas e decodificadas do DCCR.	45
Tabela 4. Resultados das análises físico-químicas da caracterização da polpa de umbu.	51
Tabela 5. Ficha controle para a aplicação do teste de preferência para 20 provadores. ...	67
Tabela 6. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo COR.	69
Tabela 7. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo AROMA.....	70
Tabela 8. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo SABOR.	71
Tabela 9. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo DOÇURA.....	72
Tabela 10. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo ACEITAÇÃO GLOBAL.....	72
Tabela 11. Meios utilizadas e as respectivas condições de incubação.	84
Tabela 12 Resultado dos parâmetros físico-químicos analisados durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	85
Tabela 13. Contagem dos microrganismos probióticos presentes na bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C ± 1°C.	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Dados de pesquisa realizado pela Brand Essence Research referente ao mercado de probióticos	20
Figura 2. Processo de Inovação de Produto.....	30
Figura 3. Realização da pasteurização lenta da polpa de umbu a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/30 \text{ min.}$..	45
Figura 4. Preparo dos fermentados de umbu com grãos de kefir para a fermentação.....	46
Figura 5. Fermentados de umbu com grãos de kefir para a maturação.	46
Figura 6. Curva padrão de ácido gálico.....	49
Figura 7. Curva padrão de quercetina.....	50
Figura 8. Teores de compostos fenólicos (mg/100ml de amostra) das formulações dos fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.....	53
Figura 9. Resultado da análise estatística de compostos fenólicos, utilizando o programa SAS University Edition	54
Figura 10. Teores de flavonoides (mg/100ml de amostra) das formulações dos fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.	55
Figura 11. Teores de flavonoides(mg/100ml de amostra) de diferentes formulações de fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.....	56
12. Teores de carotenoides ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de β -caroteno)de formulações de fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.	56
Figura 13. Teores de carotenoides ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de β -caroteno) de diferentes formulações de fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.....	57
Figura 14. Otimização da bebida fermentada levando em consideração as variáveis independentes dos compostos bioativos.....	58

Figura 15. Fermentação das formulações selecionadas para a realização dos testes afetivos e de intenção de compra.	67
Figura 16. Ficha de aplicação de teste de preferência de bebida de umbu fermentada por grãos de kefir.	68
Figura 17. Ficha de intenção de compra de bebida de umbu fermentada por grãos de kefir.	69
Figura 18. Curva padrão de ácido gálico.....	81
Figura 19. Curva padrão de quercetina.....	82
Figura 20. Acidez titulável (g de ácido láctico/100ml de amostra) da bebida fermentada de umbu com grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	86
Figura 21. Teor de sólidos solúveis da bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	87
Figura 22. pH da bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	88
Figura 23. Compostos fenólicos totais em bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	89
Figura 24. Flavonoides em bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	90
Figura 25. Carotenoides em bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.	90
Figura 26. Contagem bactérias lácticas (A), acéticas (B) e leveduras (C) presentes na bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C \pm 1°C.....	91

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	17
OBJETIVO GERAL	18
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1. INTRODUÇÃO.....	19
1.2. UMBU	21
1.3. ALIMENTO FUNCIONAL	22
1.4. COMPOSTOS BIOATIVOS.....	23
1.5. PROBIÓTICOS	24
1.6. KEFIR.....	26
1.7. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS	28
1.8. MERCADO DE BEBIDAS PRONTAS PARA CONSUMO.....	30
1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE UMBU COM GRÃOS DE KEFIR.....	42
2.1. INTRODUÇÃO.....	42
2.2. OBJETIVO	43
2.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
2.3.6. Análises físico-químicas.....	46
2.3.6.1. Análise de cinzas	46
2.3.6.2. Análise de lipídios	47
2.3.6.3. Umidade.....	47

2.3.6.4. Acidez titulável	47
2.3.6.5. Análise de sólidos solúveis	48
2.3.6.6. Potencial hidrogeniônico (pH).....	48
2.3.6.7. Ácido Ascórbico (vitamina C).....	48
2.3.7. Análise de compostos bioativos	49
2.3.7.1. Compostos fenólicos totais	49
2.3.7.2. Flavonoides totais	49
2.3.7.3. Carotenoides totais.....	50
2.3.8. Análise estatística	50
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
2.4.1. Análises físico-químicas.....	51
2.4.1. Análise de compostos bioativos	52
2.4.2. Variáveis respostas do DCCR e Otimização da formulação	57
2.5. CONCLUSÕES	59
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO 3 – SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA TESTE DA VIABILIDADE DAS CULTURAS PROBIÓTICAS	64
3.1. INTRODUÇÃO.....	64
3.2. OBJETIVO	66
3.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	69

3.5.	CONCLUSÕES	73
3.6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
CAPÍTULO 4 - VIABILIDADE DAS CULTURAS PROBIÓTICAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO		78
4.1.	INTRODUÇÃO.....	78
4.2.	OBJETIVO	79
4.3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	79
4.3.1.	Análises físico-químicas.....	80
4.3.1.1.	Acidez titulável	80
4.3.1.2.	Análise de sólidos solúveis	80
4.3.1.3.	Potencial hidrogeniônico (pH).....	81
4.3.2.	Análise de compostos bioativos	81
4.3.2.1.	Compostos fenólicos totais	81
4.3.2.2.	Flavonoides totais	82
4.3.2.3.	Carotenoides totais.....	82
4.3.3.	Análises de microrganismos probióticos	83
4.3.3.1.	Contagem de Leveduras.....	83
4.3.3.2.	Contagem de Bactérias Láticas.....	83
4.3.3.3.	Contagem de Bactérias Ácido Acéticas.....	83
4.3.4.	Análises microrganismos patogênicos	84
4.3.4.1.	Análise de coliformes totais e termotolerantes	84

4.3.4.2. Contagem de bolores e leveduras	84
4.3.5. Análise estatística	84
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
4.4.1. Análises físico-químicas.....	85
4.4.2. Análise de compostos bioativos	88
4.4.3. Análise de microrganismos probióticos	91
4.4.4. Análise de microrganismos patogênicos	93
4.5. CONCLUSÕES	93
4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

INTRODUÇÃO GERAL

As frutas são importantes fontes de nutrientes, fornecendo ao organismo humano sais minerais, vitaminas, fibras e água (SILVA et al., 2017). Além disso, são comumente ingeridas pela população mundial, em sua forma *in natura* ou processada, como minimamente processados, sucos, congeladas, etc. Fato este que contribui para o foco de produtores e indústrias de processamento alimentício para a otimização de processos, transporte e conservação das mesmas, uma vez que, após retiradas da planta mãe sofrem transformações bioquímicas acarretando no encurtamento da vida útil com perdas qualitativas e quantitativas (CORTEZ-VEJA et al., 2013; FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2014).

Entre os processamentos utilizados em frutas está a elaboração de bebidas prontas para o consumo, tendo em vista a necessidade do mercado em adquirir produtos que possam fornecer nutrição em um curto espaço de tempo em preparo e consumo. Dentro deste meio, a incorporação de substâncias, e até microrganismos benéficos, são empregados a fim de auxiliar na manutenção do metabolismo e fisiologia do organismo humano. Microrganismos probióticos têm sido utilizado sem muitos produtos alimentícios (DE ASSIS SILVA, 2017; PANDA, 2017; RANADHEERA, 2017; DE ALMEIDA, 2018; DE ARAÚJO, 2018; MARTINS, 2018).

Nos últimos anos, as culturas de kefir tem sido um importante tópico de estudo, uma vez que estas culturas apresentam uma rica variedade de cepas de bactérias ácido lácticas e de leveduras, as quais possuem potencial probiótico (WESCHENFELDER, 2009). Na produção de kefir, a variedade das cepas é influenciada pela matriz utilizada como meio de cultura, sendo os substratos mais utilizados para a proliferação do kefir o leite, água e sucos (CASSANEGO et al, 2015; WSZOLES et al., 2001; WITTHUHN et al., 2004).

Em termos de desenvolvimento de novos produtos para o mercado, o presente trabalho tem como proposta a elaboração de uma bebida fermentada com potencialidade probiótica utilizando como matriz de fermentação dos microrganismos a polpa do umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) e a cultura dos grãos de kefir como inoculante, buscando obter um alimento com propriedades funcionais.

OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma bebida fermentada de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) com potencial probiótico utilizando cultura de kefir e realizar análise da viabilidade de tais microrganismos e dos compostos bioativos presentes na bebida, ao longo do tempo de armazenamento.

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a população mundial vem se preocupando mais com a qualidade e expectativa de vida, buscando sempre melhorar sua rotina com a inclusão de hábitos saudáveis como o consumo crescente de alimentos que tenham propriedades funcionais (OLIVEIRA, 2020). Além disso, há quem busque alimentos de fácil preparo e consumo que sejam adequados a rotina atual de atividades pessoais e de trabalho, implementando hábitos saudáveis (OLIVEIRA, 2020).

Segundo a Kerry Global Consumer Research para Wellmune® e GanedenBC30 (2019), em uma pesquisa realizada em 2019 com 800 consumidores do Brasil mostrou que 49% usa, já utilizou ou pretende utilizar produtos contendo bactérias benéficas para o organismo humano, incluindo alimentos com potencialidade probiótica, nos últimos seis meses. Nesta mesma pesquisa aborda o fato que grande parte desses consumidores entendem os benefícios que os probióticos proporcionam à saúde.

Em 2021 mercado mundial de probióticos atingiu a marca de US\$ 61,50 bilhões, e tende a crescer a uma CAGR(Compound Annual Growth Rate) de 8,4%, atingindo o valor de US\$ 108,16 bilhões até 2028, realizado pelo relatório de pesquisa publicado por Pesquisa de Mercado de Brandessence (BRANDESSENCERESEARCH, 2022). Ainda, devido à pandemia da COVID-19, iniciada no ano de 2020, muitas pessoas buscaram melhorias no sistema imunológico, impactando em um crescimento positivo na demanda de produtos de proporcionem tal benefício, em especial produtos alimentícios (BRANDESSENCERESEARCH, 2022). A Figura 1 apresenta os resultados da pesquisa realizada pela Brand Essence Research, referente ao mercado mundial de probióticos.

Figura 1 Dados de pesquisa realizado pela Brand Essence Research referente ao mercado de probióticos



Fonte: BRANDESSENCERESEARCH, 2022

Um dos produtos que tem o potencial de satisfazer a necessidade do mercado de alimentos prontos para o consumo é o mercado de bebidas, onde há a possibilidade de oferecer um alimento com benefícios nutricionais e de fácil consumo e digestão (WENDLING, 2013). Neste quesito, existe uma gama de possibilidades de desenvolvimento de produtos, como por exemplo sucos e iogurte com variadas consistências, sabores e benefícios.

As bebidas com potencialidade probiótica vem sendo visadas pelas suas propriedades microbiológicas, proporcionando ao ser humano uma colaboração ao seu sistema digestivo e auxiliando na prevenção de muitas doenças (DE MORAES et al., 2019). Isto se dá pelo fato da simbiose entre microrganismos presentes nestas bebidas com a microbiota intestinal (MAGALHÃES et al., 2010ab; MARSH et al., 2013). Além disso, muitos microrganismos são capazes de sintetizar compostos que também colaboram de forma funcional com o corpo humano.

Neste contexto, este trabalho buscou desenvolver uma bebida fermentada utilizando grãos de kefir com uma matriz de polpa de umbu, visando obter uma bebida com microrganismos probióticos e propriedades bioativas benéficas para a saúde dos consumidores.

1.2. UMBU

O umbu (*Spondias tuberosa* L.) se caracteriza como um fruto carnoso, possuindo cerca de 8 a 23g, sendo constituído por cerca de 22% de casca, 68% de polpa e 10% de caroço. Ele possui formato arredondado, tendo de 2 a 4cm de diâmetro, e coloração entre verde, quando no início da maturação, e amarelo-esverdeada a amarela, quando maduro (SANTOS et al., 2017).

A principal forma de consumo de umbu é *in natura*, sendo, também, comercializado/consumido processado, em forma de doces, polpa, suco, néctar, sorvete, licor, pasta, cristalizado e desidratado (BASTOS; MARTINEZ; SOUZA, 2016; SANTOS et al., 2017; SOUZA et al., 2018). Os frutos possuem elevadas quantidades de compostos antioxidantes, alcaloides, taninos e flavonoides, além de ter caráter antimicrobiano, antiparasitário, entre outras propriedades benéficas a saúde (SOUZA et al., 2018).

A planta é adaptada a climas secos e regiões menos chuvosas, tendo sua origem na região semiárida do nordeste brasileiro. Em 2018, sua maior produção se concentrou na Bahia, com uma produção aproximada de 5.757 toneladas de fruto, equivalente a 74% do total produzido no país (SOUZA et al., 2018; IBGE, 2019).

As plantas do umbuzeiro possuem safra anual, dependendo das condições climáticas ao qual se encontram, podendo ser capazes de produzir até 300kg de fruto por planta (LIMA FILHO, 2011). O umbuzeiro é resistente a seca e seus frutos são fontes de renda para maioria dos agricultores familiares da região semiárida (DE SOUZA et al., 2021). Porém, por possuírem safra limitada e alta perecibilidade, com tempo de vida útil de dois a três dias após a colheita, há a necessidade de implementação da tecnologias pós-colheita ou de processamento para manter a qualidade dos frutos ou obter produtos processados que permitam a oferta no mercado por mais tempo, assim como em mercados distantes das regiões produtoras.

O umbu tem ganhado interesse comercial por ser um fruto saboroso e com altos teores de compostos bioativos (ALMEIDA et al., 2011; SILVA et al., 2012) como compostos fenólicos, flavonoides, antocianinas e taninos (DUTRA et al., 2017; RIBEIRO et al., 2019, THASSYA LUCAS DOS SANTOS et al., 2019). Estudos mostram que umbus possuem teores de compostos fenólicos de 158,54 mg/kg, flavonoides de 69,30mg

/kg e carotenoides como o β -caroteno de 4,16 mg/100g e o licopeno de 5,67mg/100g (ZIELINSKI et al., 2014).

Segundo Dias et al. (2019) e Sameh et al. (2018), membros do gênero *Spondias* são comumente utilizados na medicina tradicional para tratamento de muitas doenças, por apresentarem substâncias antioxidantes, protetoras de úlceras, fotoprotetoras, anti-inflamatórias, antiartrítico, trombolíticas, hipoglicêmicas, anti-hipertensivas, antimicrobianas, antipirético, hepatoprotetoras, antivirais e anti-helmínticas, relacionadas à elevada gama de fito constituintes presentes neste gênero, podendo assim destacar a presença de óleos essenciais, taninos, flavonoides, esteróis, polissacarídeos e aminoácidos.

1.3. ALIMENTO FUNCIONAL

Alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, além de suas funções nutricionais básicas (CARDOSO; OLIVEIRA, 2008). Este efeito ocorre em sua maioria quando estes são consumidos como parte de uma dieta usual, sendo seguro seu consumo com estes objetivos geralmente sem necessidade de supervisão médica como no caso de um medicamento.

O termo “Alimento Funcional” passou a ser adotado no Japão, que iniciou a produção e comercialização de alimentos funcionais conhecidos como FOSHU (*Foods for Specified Health Use*). Os alimentos funcionais japoneses sustentam um selo de aprovação do Ministério da Saúde e Bem-Estar. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (ANVISA, 2019). Por meio dela, o Brasil define alimentos e/ou novos ingredientes como alimentos ou substâncias sem histórico de consumo no país, ou alimentos com substâncias já consumidas que, entretanto, venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular.

Segundo a ANVISA (2019), os chamados “Alimentos Funcionais” estão relacionados ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente (ex. fibras) ou não nutriente (ex. licopeno) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo. Ou seja, estes alimentos contêm ingredientes que podem auxiliar

na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, na proteção das células contra os radicais livres, no funcionamento do intestino, na redução da absorção do colesterol, no equilíbrio da flora intestinal, entre outros, desde que seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 2/2002, da ANVISA, estabeleceu critérios para avaliação de segurança, registro e comercialização de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedade funcional e/ou de saúde. De acordo com esse regulamento, consideram-se substâncias bioativas, além dos nutrientes, os não nutrientes que possuam ação metabólica ou fisiológica específica. A substância bioativa deve estar presente em fontes alimentares, de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o consumo humano. São classificadas em carotenoides; fitoesteróis; flavonoides; fosfolípídeos; organossulfurados; polifenóis; e probióticos (ANVISA, 2002).

A Food and Drug Administration (FDA) regula os alimentos funcionais com base no uso que se pretende dar ao produto, adicionando esta informação na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes do produto. A partir destes critérios, a FDA classificou os alimentos funcionais em cinco categorias: alimento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento e droga.

A nutrição funcional é uma tendência adotada a fim de abordar a ciência da nutrição e tem como propósito avaliar a influência do alimento com o organismo. Nesse aspecto é estudado a importância de nutrir o organismo adequadamente, não apenas em quantidade, mas em qualidade, para que este adquira todos os nutrientes essenciais ao seu bom funcionamento, levando a consideração a boa digestão para uma efetiva absorção e utilização do corpo humano (DOS SANTOS MORAES, 2018).

1.4. COMPOSTOS BIOATIVOS

Os estudos dos compostos bioativos são importantes para ampliar o conhecimento das propriedades dos alimentos e incentivar sua introdução na alimentação da população. Dentre as propriedades de tais compostos, destaca-se a atividade antioxidante, sendo um dos parâmetros utilizados para se avaliar o valor nutricional de frutas, associado à redução do risco de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ABOUL-ENEIN et al., 2013).

Os compostos fenólicos, constituídos por anéis aromáticos e grupos hidroxilas, bem como os carotenoides, compostos associados a cor dos alimentos e precursores da vitamina A, podem ser detectados em quantidades elevadas em frutos nativos, ganhando destaque, por possuírem propriedades importantes como a atividade antioxidante (HAMINIUK et al., 2011; VIDIGAL et al., 2011; DAMODARAN, 2019)

Os compostos fenólicos, constituídos por um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila como grupos funcionais (TEVERON, 2010), possuem a maior atividade antioxidante em frutas, sendo representados em grande parte pelos polifenóis e flavonoides (EBERHARDT et al., 2000). São produtos aromáticos que englobam um dos grupos de substâncias mais importantes e variadas pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais, com estruturas que podem ser divididas em várias classes de acordo com o esqueleto carbônico (BALASUNDRAM et al, 2006; HAMINIUK et al., 2012; MELO et al., 2008).

Quando ingeridos por meio dos alimentos, o organismo humano transforma-os em ácidos fenólicos ou estruturas de lactona pela microbiota intestinal, produzindo metabólitos com propriedades biológicas e atividade antioxidante (JORDÃO, 2018). Além disso, também em ação no organismo, relaciona-se com a modulação de enzimas de detoxificação, redução da agregação plaquetária e da prevalência de aterosclerose, alteração do metabolismo das frações do colesterol e na redução da pressão sanguínea (VIDAL et al., 2012).

A presença destes compostos em produtos alimentícios influencia diretamente sua estabilidade, características sensoriais e nutricionais, possibilitando a prevenção de sua deterioração por meio de reações radicais de extinção responsáveis pela oxidação de lipídios (COS et al., 1998; LAUGHTON et al., 1991; MIKOŁAJCZAK; TAŃSKA; OGRODOWSKA, 2021).

1.5. PROBIÓTICOS

Probióticos são microrganismos vivos são administrados em quantidades adequadas e de maneira contínua, visto que não colonizam o intestino e desaparecem do trato gastrointestinal quando tem seu consumo interrompido, atuam com efeito benéfico à saúde humana (FAO, 2001; CABRAL, 2014; DIAS et al., 2016). Conforme descrito

por Cassanego et al. (2015), os probióticos provocam o estímulo do sistema imunológico, diminuindo a incidência de infecções.

Além disso, há estudos que comprovam que a administração de probióticos ajuda no tratamento de alguns transtornos (DE MORAES et al., 2019). Os estudos de Kazemi et al (2019). e Akkasheh et al. (2016). relataram o impacto da administração de probióticos em indivíduos diagnosticados com Transtorno Depressivo Maior. Os autores utilizaram para a pesquisa a ferramenta de Avaliação do Grau Depressivo (BDI), indicando diminuição significativa na pontuação do grupo que utilizou os probióticos.

Conforme ANVISA (2018), para que um microrganismo seja considerado probiótico para utilização humana, requer demonstração da sobrevivência às condições do trato digestório humano e evidência de efeito em humanos obtida por meio de estudos que sejam conduzidos com a linhagem do micro-organismo, envolvam um grupo representativo da população de interesse ou cujos resultados possam ser extrapolados para aquela de interesse, considerem a quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício e avaliem desfechos relevantes para o benefício alegado.

Os principais tipos de cepas utilizadas como probióticos são *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* e *Saccharomyces* (PEREIRA, 2017; VALERO-CASES, 2017).

As bebidas fermentadas de bactérias ácido lácticas (BALs) podem afetar agentes patogênicos de origem alimentar. Segundo publicação da FAO (2013), as culturas de BALs isoladas a partir de leite fermentado naturalmente (Amasi) inibiram a sobrevivência e crescimento de agentes patogênicos humanos como a *Escherichia colie* e *Salmonella enteritidis*, em estudos realizados no Zimbábue. Ainda neste trabalho da FAO (2013), são relatadas outros tipos de fermentados e seus benefícios para o ser humano, o que inclui tratamento de úlceras no estômago, distúrbios hepáticos, agente terapêutico no tratamento de tuberculose entre outros.

A sua gama de benefícios para o corpo humano vem diretamente da influência que os probióticos têm para com o sistema gastrointestinal. Qualquer alteração na composição da microbiota, caracterizada como disbiose, pode levar a um aumento da permeabilidade intestinal, resultando numa passagem de lipopolissacarídeo (LPS) para a circulação sistêmica, o que gera uma endotoxemia metabólica e desenvolvimento de um

estado inflamatório crônico (DOS SANTOS MORAES, 2018). Quando isso acontece, provoca sintomas como gases, diarreia ou constipação, sendo também relacionado com doenças cardiovasculares, síndromes metabólicas e desordens do sistema nervoso central (MILLION et al., 2012; PALAU-RODRIGUES et al, 2015).

Os mecanismos de ação pelos quais os probióticos estão relacionados à modulação da microbiota intestinal, através de diferentes atividades antimicrobianas através de mecanismos não específicos, por exemplo, produção de ácidos graxos de cadeia curta e modulação do pH e peróxido de hidrogênio, ou a produção de toxinas específicas, com faixas de morte muito estreitas, como bacteriocinas, bacteriófagos ou substâncias inibidoras do tipo bacteriocina (O'TOOLE; COONEY, 2008; CHUGH; KAMAL-ELDIN, 2020).

Bactérias probióticas, particularmente bactérias lácticas e bifidobactérias, têm diferentes atividades metabólicas catalisadas por proteases, lipases, esterases e amilases, as quais podem estar faltando no hospedeiro (MARKOWIAK; ŚLIŻEWSKA, 2017). A modulação direta do sistema imunológico pode ser secundária à indução de citocinas anti-inflamatórias ou pelo aumento da produção de IgA secretora (SOUZA et al., 2010).

Para garantir um efeito contínuo, devem ser ingeridos diariamente a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g, conforme indicação do fabricante. Porém, a concentração de probióticos pode variar bastante de acordo com a cepa e o produto a ser ingerido (OMG, 2011; ANVISA, 2001). Este ponto leva a possibilidades para campos de pesquisas relacionados à saúde do corpo humano, utilizando microrganismos probióticos na elaboração de produtos para consumo.

1.6. KEFIR

A resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos (MAPA) define kefir como o produto derivado lácteo cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, encontrando microrganismos probióticos como *Lactobacillus*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2000). Historicamente, os produtos provenientes dos grãos de kefir, é utilizado para promover e manter a boa saúde, fazendo jus ao seu significado literal, provindo da palavra

“keif”, “boa sensação” (LEITE et al., 2015; SATIR; GUZEL-SEYDIM, 2016). Alguns estudos comprovaram cerca de 30 espécies de microrganismos incorporados em uma matriz de polissacarídeos e proteínas, o que faz com que estes grãos de kefir sejam considerados potentes probióticos (NIELSEN et al, 2014).

Fatores como região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação interferem na composição microbiana dos grãos de kefir (WITTHUHN et al., 2004). Durante o processo fermentativo do kefir, a multiplicação das bactérias ácido lácticas (BALs) e leveduras ocorre na matriz polissacarídea, gerando novos grãos de kefir que mantêm o mesmo equilíbrio microbiológico presentes nos grãos originais (WITTHUHN et al., 2005; WOUTERS et al., 2002).

Zubillaga et al. (2001) descreveram os grãos de kefir como uma associação simbiótica entre bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras entre outros microrganismos. Autores isolaram e identificaram microrganismos presentes em kefir de Bali, em um total de 115 isolados, 68,7% representavam as bactérias ácido lácticas e 31,3% eram as leveduras, sendo a *Candida famata* a maior representante das mesmas (SURIASIH et al., 2012).

Bergmann et al., (2010) identificam o perfil microbiológico distinto, alguns microrganismos similares ao comumente encontrado em culturas de kefir e outros ainda não reportados na literatura. Em um de suas amostras contendo grãos de Kefir cultivados em solução aquosa de açúcar mascavo e encontraram, além de bactérias como *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, foram encontradas espécies de leveduras, sendo elas: *S. cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspola delbruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloeckera sp.*, *Candida famata*, *Kluyveromices lactis*, *K. marxianus* e *Candida kefir*(BERGMANN et al., 2010).

O produto da fermentação do Kefir é de caráter ácido e de leve teor alcoólico. Sua elaboração se dá a partir de grãos, que são utilizados como cultura starter, contendo uma população estável de microrganismos, obtendo, durante seu processo fermentativo, aroma e sabor característicos (CASSANEGO et al., 2015; DIAS et al., 2016). A bebida é produzida com diferentes matrizes alimentícias como o leite de vaca, cabra, búfala, ovelha, entre outros leites, assim como água e suco de frutas (CASSANEGO et al., 2015).

A velocidade de multiplicação microbiana na matriz utilizada é influenciada por fatores como a concentração e tipo de açúcar, temperatura, ausência de contaminantes e agitação do recipiente de fermentação (SANTOS, 2012). Nesse processo, os microrganismos sintetizam substâncias que proporcionam textura e sabor característicos ao fermentado (SCHWAN et al, 2015).

Apesar do alto potencial funcional, ainda existem poucos estudos envolvendo a produção de bioativos em fermentados de kefir, ainda assim, pesquisas científicas evidenciam que as enzimas proteolíticas dos microrganismos, envolvidos na fermentação, podem contribuir para a liberação de peptídeos bioativos, conferindo ao kefir efeitos antioxidantes benéficos à saúde (DOS SANTOS CAVARARO et al, 2018).

Como resultado da fermentação microbiana, há a produção de ácidos láctico, acético e glicônico, álcool, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que favorecem características organolépticas únicas do kefir, além de contribuir para uma melhor digestibilidade, devido a presença de β -galactosidase microbiana no kefir, enzima que auxilia na digestão da lactose no intestino (GARROTE et al., 2001; PUERARI et al., 2012; FIORDA et al., 2017).

O consumo contínuo de kefir pode trazer uma série de benefícios a saúde. DIAS et al. (2016) relatam em seu estudo o equilíbrio da microbiota intestinal, a estimulação de sistema imune e ações antitumoral e antimicrobiana. Sonestedt et al. (2011) avaliaram durante 12 anos 2.520 pessoas com problemas cardiovasculares, as quais perceberam uma relação inversa entre o consumo de leite fermentado e doenças cardiovasculares (DCV). No processo de fermentação, ocorre também a produção do *kefiran* pelo microrganismo *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 (BOURRIE et al, 2016; PRADO et al, 2015).

1.7. DESENVOLVIMENTO DE NOVOS PRODUTOS

Nos últimos anos, a busca pelo aumento da vantagem competitiva tem levado muitas organizações a inovar (DE BARCELLOS & LIONELLO, 2011). Na indústria alimentícia, a inovação é uma importante fonte de diferenciação e uma oportunidade de

agregação de valor para os gestores desenvolverem novos produtos, constituindo uma vantagem competitiva no cenário globalizado (DE BARCELLOS et al., 2009).

À acirrada concorrência e o perfil cada vez mais exigente dos consumidores, que tem se tornado menos fiéis as marcas, tem tornado o desenvolvimento de novos produtos, com alto padrão de excelência nos níveis de qualidade, cada vez mais importante para atender à crescente demanda do mercado (GOUVEIA, 2006; SENHORAS, 2014).

A inovação é caracterizada pelo desenvolvimento de novas fontes, novos métodos, novos processos, novas formas de organização e novos produtos (SENHORAS, 2014). Conforme Schumpeter (2017), inovação é o impulso que mantém o capitalismo em movimento definindo a atividade empresarial, uma vez que ela rompe a rotina econômica e, dessa maneira, o equilíbrio estacionário existente, impedindo qualquer espécie de reação de adaptação do sistema, na procura do antigo equilíbrio.

A gestão de inovação tem ganhado grande destaque, visto que são responsáveis pelo desenvolvimento empresarial e a diversificação mercadológica. Uma gestão bem estruturada, no processo de desenvolvimento de novos produtos, pode significar, dentre diversos fatores, uma maior eficácia e capacidade de diversificação, menores custos e tempo e um melhor potencial para transformação de novas tecnologias em novos produtos (JUGEND, 2006).

O processo de inovação de um produto pode ser descrito em quatro diferentes etapas (POLIGNANO & DUMOND, 2001):

- 1ª etapa – é caracterizada pela BUSCA, nesta as ideias são convertidas em oportunidades para criação de novos clientes, produtos e mercados.
- 2ª etapa – é a etapa da AVALIAÇÃO, onde ocorre a análise das oportunidades em termos de seu potencial total. Nesta, as ideias mais promissoras são transformadas em conceitos de produtos e traça-se uma linha de raciocínio para o trabalho de desenvolvimento.
- 3ª etapa – é a etapa do DESENVOLVIMENTO, onde acontece a antecipação dos fatores críticos que podem promover o fracasso ou o sucesso de cada oportunidade, é realizado o detalhamento do projeto, a construção e testes com protótipos, a prototipagem-piloto e a preparação para a produção em larga escala.
- 4ª etapa – é a etapa da PERSEGUIÇÃO, onde acontece o desenvolvimento de um plano de ação para que, um suposto fracasso do seja evitado e, ocorra a promoção do novo produto.

Figura 2. Processo de Inovação de Produto



Além disso, uma macrogestão da inovação deve ser levada em conta, sendo inserido em suas estratégias a dinâmica concorrencial. Para tal, pode-se ser utilizado uma ferramenta conhecida como “Matriz Produto-Mercado”, que é um modelo que avalia a dinâmica de desenvolvimento e interação entre produtos e mercados (Tabela 1)

Tabela 1. Matriz Produto – Mercado, baseado no modelo de Vasco (2001).

	Produtos atuais	Novos produtos
Mercados atuais	Estratégia de Penetração de Mercado ¹	Estratégia de Desenvolvimento de Produto ³
Novos Mercados	Estratégia de Desenvolvimento de Mercado ²	Estratégia de Diversificação ⁴

¹ Ocorre mediante a venda de maiores quantidades de produtos a novos ou atuais clientes nos mercados existentes;

² Ocorre mediante a transferência da linha de produtos para novos mercados;

³ Ocorre com o objetivo de aumentar o grau em que o produto satisfaz as necessidades dos mercados existentes;

⁴ Ocorre pela soma de novos produtos com novas missões em novos mercados.

1.8. MERCADO DE BEBIDAS PRONTAS PARA CONSUMO

Entre os anos de 2014 e 2018 a indústria nacional de alimentos e bebidas sofreu retração em crescimento, porém vem se recuperando desde então, mesmo frente ao cenário da pandemia do coronavírus (ABIA, 2020). As indústrias de alimentos, no ano de 2020, investiram R\$ 21,2 bilhões em fusões e aquisições, expansão de plantas fabris, investimento em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) e aquisição de máquinas e equipamentos, o que corresponde a 2,7% do faturamento total do setor, valor 4,8% menor que no ano anterior (ABIA, 2020).

O mercado de alimentos funcionais pode ser caracterizado como “technology-push”, predominantemente orientado pela busca de novas oportunidades de produtos inovadores pelas empresas e, pela demanda dos consumidores (DE BARCELLOS & LIONELLO, 2011). Segundo Urala e Lahteenmaki, (2007), os principais fatores que influenciam a intenção de consumir alimentos funcionais são sabor, qualidade, preço/valor, conveniência e os benefícios que trará à saúde.

A busca pelos produtos funcionais vem crescendo com afinco desde então, o que inclui a busca por probióticos. Dentro desse mercado, estão incluídos os alimentos e bebidas, devido à pela grande preocupação com a saúde de forma preventiva e terapêutica (BRANDESSENCERESEARCH, 2022).

Os alimentos funcionais são uma excelente oportunidade para ingresso no mercado, pois possuem uma taxa de crescimento anual de aproximadamente 10% (DE ASSIS SILVA, 2017). Com as tendências do mercado, os alimentos associados a uma forte imagem de “saúde” representam uma fonte de diferenciação e de rentabilidade em certos ramos do setor alimentar. Para as indústrias de alimentos, a chave do sucesso no mercado de produtos funcionais reside na inovação, o que constitui uma poderosa barreira à entrada de novas empresas. Para atender às demandas específicas em termo de saúde, as indústrias devem cada vez mais especializar-se e segmentar seus produtos, o que lhes obriga a realizar investimentos pesados na área da pesquisa e desenvolvimento e na área da comunicação.

Em se tratando de bebidas, o Brasil é rico em variedades de frutos contendo uma gama de componentes nutritivos e benéficos para a saúde, dentre eles estão os compostos fenólicos (FALLER & FIALHO, 2009). Isto dá à indústria alimentícia a oportunidade para explorar uma diversidade de produtos elaborados a partir deles, com características inovadoras.

Segundo Tireki (2021), as tendências globais para o consumo de bebidas não alcoólicas passaram para a preferência daquelas que contenham alguma característica funcional. A produção de bebidas fermentadas provenientes do kefir, em sua grande maioria é realizada por meio artesanal (WESCHENFELDER, 2009). Em meio industrial, a produção de bebidas que contenham microrganismos probióticos é realizada utilizando culturas isoladas, deixando de explorar as propriedades nutricionais oriundas da

fermentação dos grãos de kefir, que apresenta uma complexa microbiota em sua matriz polissacarídea (WESCHENFELDER, 2009).

1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIA. Associação Brasileira da Indústria de Alimentos. **Relatório Anual 2020**. Disponível em: < <https://www.abia.org.br/> >. Acesso em: 03 março 2022.

AKKASHEH G., Kashani-Poor Z., Tajabadi-Ebrahimi M., Jafari P., Akbari H., Taghizadeh M., et al. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Nutrition**. 2016

ALBARICI, T. R.; Freitas, D. M. D.; Pessoa, J. D. C. Protocolos de análises para polpa de açaí: um guia prático de consulta. Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.

ABOUL-ENEIN, H.Y.; Berczynski, D. X.; Kruk, I. Phenolic compounds: The role of redox regulation in neurodegenerative disease and cancer. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, p. 385 - 398, 2013.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução RDC n.12, de 02 de janeiro de 2001. Aprovado regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999. Alimentos com Alegações de propriedades funcionais aprovadas. Lista das Alegações Aprovadas. 2019. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acessado em: 28 de jan 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada n. 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. 2002 Disponível em: < http://antigo.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_02_2002.pdf/02a04e07-b647-4b3d-97f4-6f7c19dd4c8c?version=1.0 >. Acesso em: 22 de jan. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução da diretoria colegiada rdc nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em

alimentos. 2018. Disponível em: < https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/34379910/do1-2018-07-27-resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-241-de-26-de-julho-de-2018-34379900>. Acesso em: 22 de abr. 2022.

ALVARENGA, M. V., Vieira, L. J., Santos, J. A. R., Fernandes, F. M. Análise microbiológica de polpas de frutas congeladas e industrializadas. **Revista Científica da Faminas (RCFaminas)**, Muriaé, v. 12, n. 3, set./dez. 2017, p. 60-65

BARCELLOS, Marcia Dutra de et al. Willingness to try innovative food products: a comparison between British and Brazilian consumers. **BAR-Brazilian Administration Review**, v. 6, n. 1, p. 50-61, 2009.

BERGMANN, R. S. O. et al., Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.

BOURRIE BCT, Willing BP, Cotter PD. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Front Microbiol**. 2016; 7:1-17.

BRANDESSENCERESEARCH (Brand Essence Research). Probiotics Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Food & Beverages, Dietary Supplements, Animal Feed) By Function (Regular, Preventative Healthcare, Therapeutic) By Ingredient (Bacteria, Yeast) By End-Use(Human Probiotics, Animal Probiotics) Based On Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2028. **BMRC 1893**. 2022

CANUTO, G. A. B.; Xavier, A. A. O.; Neves, L. C.; Benassi, M. T. Caracterização físico-química de polpas de frutos da Amazônia e sua correlação com a atividade anti-radical livre. **Revista Brasileira de Fruticultura**. 2010, v.32, n.4, pp.1196-1205. Nov 26, 2010.

CARABIN, I.G.; Flamm, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, New York, v.30, p.268-282, 1999.

CARDOSO, A. L.; Oliveira, G. G. Alimentos funcionais. **Jornal Eletrônico - Empresa Júnior de Consultoria em Nutrição**, n. 5, 2008.

CHUGH, Bhawna; KAMAL-ELDIN, Afaf. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **CurrentOpinion in Food Science**, v. 32, p. 76-82, 2020.

CORTEZ-VEGA W. R.; Piotrowicz, I. B. B.; Prentice, C.; Borges, C. D. Conversão de Mamão Minimamente Processado Com Uso de Revestimento Comestível à Base de Goma Xantana, **Semina: Ciencia Agrárias**, Londrina, v. 34, n° 4, pag. 1753 a 1764, 2013.

CKB FERRARI, E. T. Alimentos funcionais: quando a boa nutrição melhora a nossa saúde. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, 2002.

DE ALMEIDA, J.M. et al. Microrganismos Probióticos e o seu Uso na Indústria de Alimentos. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab539, 2018.

DE ARAÚJO, J.M. Dantas et al. Uso de Probióticos no Tratamento de Pacientes com Intolerância à Lactose. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab791, 2018.

DE ASSIS SILVA, C.R. et al. BIOTECNOLOGIA APLICADA A PRODUÇÃO DE ALIMENTOS FERMENTADOS. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2017.

DE BARCELLOS, Marcia Dutra; LIONELLO, Rafael Laitano. Consumer market for functional foods in south Brazil. **International Journal on Food System Dynamics**, v. 2, n. 2, p. 126-144, 2011.

DE FREITAS, R.M. et al. Desenvolvimento e aceitação sensorial de bebida fermentada de kefir setorizada com umbu-cajá.

DE MORAES, A. L. F. et al. Suplementação com probióticos e depressão: estratégia terapêutica? **Revista De Ciências Médicas**, v. 28, n. 1, p. 31-47, 2019.

DE SOUZA, H.R.S. et al. Compostos bioativos e estabilidade de geleia mista de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. C.) e mangaba (*Hancornia speciosa* G.). **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 2, p. 236-248, 2018.

DE SOUZA, L.M.R. et al. Secagem da polpa do umbu (*Spondias tuberosa*) em camada de espuma. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 11, p. e488101119955-e488101119955, 2021.

DIAS, J. L., Mazzutti, S., DE Souza, J. A., Ferreira, S. R., Soares, L. A., Stragevitch, L., & Danielski, L. (2019). Extraction of umbu (*Spondias tuberosa*) seed oil using CO₂, ultrasound and conventional methods: Evaluations of composition profiles and antioxidant activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, 145, 10-18.

DAMODARAN, S.; Parkin, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed Editora, 2019.

DOS SANTOS CAVARARO, C. et al. Desenvolvimento e aceitação sensorial de kefir com geleia de goiaba e avaliação de compostos bioativos. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 13, n. 2, p. 503-515, 2018.

DOS SANTOS MORAES, M. et al. Efeitos funcionais dos probióticos com ênfase na atuação do kefir no tratamento da disbiose intestinal. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 14, n. 37, p. 144-156, 2018.

DUTRA, R.L.T., Dantas, A.M., Araújo Marques, D., Batista, J.D.F., de Albuquerque Meireles, B.R.L., de Magalhães Cordeiro, Â.M.T. Borges, G.D.S.C. Bioaccessibility and antioxidant activity of phenolic compounds in frozen pulps of Brazilian exotic fruits exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.100, p.650-657, 2017.

EBERHARDT, M.V., Lee, C.Y., Liu, R.H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v. 405, n. 6789, p. 903-904, 2000.

FALLER, Ana Luísa Kremer; FIALHO, Eliane. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, p. 211-218, 2009.

FENG, P., Weagant, S. D., Grant, M. A.; Burkhardt, W. BAM: enumeration of *Escherichiacoli* and the coliform bacteria. In: U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Bacteriological analytical manual**. Silver Spring: FDA, 2002. cap. 4. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm#conventional>>. Acesso em: 04/11/2019.

FAO. **Milk and dairy products in human nutrition**. 1aed. Rome, Italy: FAO, 2013.

FIORDA, F.A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S.K., Pagnoncelli, M.G.B., Vandenberghe, L.P.S., Soccol, C.R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Pectinas: Propriedades e Aplicações Revista eletrônica**, nº29, 2014. Disponível em < <http://revista-fi.com.br> > Acessado dia 19/05/2019 as 23:15h.

GARROTE, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 4, p. 639–652, 2001.

HAMINIUK C.W.I., Plata-Oviedo M. S.V., Guedes A.R., Stafussa A.P., Bona E., Carpes S.T. Chemical, antioxidant and antibacterial study of Brazilian fruits. **Journal of Food Science and Technology**, v. 46, p. 1529-1537, 2011.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª edição, 1ª versão eletrônica. São Paulo, 2008.

IBGE. Disponível em < <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pevs/quadros/brasil/2018> >. Acesso em: setembro de 2019.

JORDÃO, T. R.. Efeito vasodilatador do extrato aquoso de Commiphora leptophloeos (Mart.) JB Gillet em ratos.. Trabalho de Conclusão de Curso. 2018

KAZEMI A, Noorbala AA, Azam K, Eskandari MH, Djafarian K. Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: A randomized clinical trial. **Clin Nutr**. 2019

LAIRON, D. et al. Dietary fiber intake and risk factors for cardiovascular disease in French adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 82, n. 6, p. 1185-1194, 2005.

LEITE, A. M. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V. M. F., Mayo, B., Delgado, S. Probiotic Potential of Selected Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Brazilian Kefir Grains. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 6, p. 3622–32, 2015.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 362-385, 1987.

LIMA MSF, Silva RA, Silva MF, Porto ALF, Cavalcanti MTH. Características microbiológicas e antioxidantes de um novo alimento funcional probiótico: leite de ovelha fermentado por kefir. XX Congresso de Engenharia Química; 2014; Florianópolis.

LIMA FILHO, J. M. P. (2011). Ecofisiologia do umbuzeiro (*Spondias tuberosa*, Arr. Cam.). **Embrapa Semiárido-Documentos** (INFOTECA-E).

KIM, D., Jeong, S., Lee, C. Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, v.81, p.321-326, 2003.

MAGALHÃES, K.T.; Dias, D.; Pereira, G.V.M.; Oliveira, J.M.; Domingues, L.; Teixeira, J.Á.; Silva, J.B.A.; Schwan, R.F. Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. *International Journal of Food Science Technology*, v. 46, n. 4, p. 871-878, 2011a.

MAGALHÃES, K.T.; Dragone, G.; Pereira, G.V.M.; Oliveira, J.M.; Domingues, L.; Teixeira, J.Á.; Silva, J.B.A.; Schwan, R.F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compounds during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*, v. 126, n. 1, p. 249-253, 2011b.

MAKKI, K. et al. The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. **Celg host & microbe**, v. 23, n. 6, p. 705-715, 2018.

MARKOWIAK, Paulina; ŚLIŻEWSKA, Katarzyna. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. **Nutrients**, v. 9, n. 9, p. 1021, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Oficializa os padrões de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados (Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000). **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, 2000.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Decreto n.6871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a lei n.8918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a padronização e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, p.20, 5 de jun. 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Portaria n.64 de 23 de abril de 2008. Aprovam os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas fermentadas: fermentado de fruta, sidra, hidromel, fermentado de cana, fermentado de fruta licoroso, fermentado de fruta composto e saquê. **Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2008.

MARTINS, A.C.S. et al. Probióticos: Bactérias Empregadas na Elaboração de Alimentos Funcionais. **International Journal of Nutrology**, v.11, n.01, p.653, 2018.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 37, DE 1º DE OUTUBRO DE 2018. Disponível em: <http://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/44304943/do1-2018-10-08-instrucao-normativa-n-37-de-1-de-outubro-de-2018-44304612>.

Acessado em: 29/09/2019

MILLION, M. et al. Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. **Int J Obes (Lond)**, v. 36, n. 6, p. 817-825, 2012.

NIELSEN, B., Gürakan, GC, Ünlü, G. **Kefir: a multifaceted fermented dairy product. Probiotics and Antimicro. Prot.** v. 6 p.123-135, 2014.

OLIVEIRA, Fernanda Gomes de. Benefícios de probióticos caseiros Kefir e Kombuchá: uma revisão de literatura. Universidade de Santa Cruz do Sul. 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. Probióticos y prebióticos. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia**. Fev. 2017. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-portuguese-2017.pdf>>. Acesso em: julho 2021.

O'TOOLE, Paul W., COONEY, Jakki C. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2008

PALAU-RODRIGUEZ, M. et al. Metabolomic insights into the intricate gut microbial–host interaction in the development of obesity and type 2 diabetes. **Front Microbiol**, v. 6, p. 1151, 2015.

PANDA, S. K. et al. Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum*-ATCC 9338. **LWT**, v. 75, p. 453-459, 2017.

PEREIRA, A.L.F. et al. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food research international**, v. 100, p. 603-611, 2017.

PRADO M. R., Blandón L. M, Vandenberghe L. P. S., Rodrigues, C., Castro G. R., Thomaz-Soccol, V., et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Front Microbiol**, v.6, p.1-10, 2015.

PUERARI, C., Magalhães, K.T., Schwan, R.F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v. 48, n.2, p. 634-640, 2012.

RANADHEERA, C. S. et al. Probiotic delivery through fermentation: dairy vs. non-dairy beverages. **Fermentation**, v. 3, n. 4, p. 67, 2017.

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, 2002.

RE, R.,Pellegrini, N.,Proteggemnte, A.,Pannala, A.,Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying and improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. **Journal Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1234-1237, 1999.

RIBEIRO, L. D.O., Viana, E. D. S., Godoy, R. L. D. O., Freitas, S. C. D., Freitas, S. P., & Matta, V. M. D. Nutrients and bioactive compounds of pulp, peel and seed from umbu fruit. **Ciência Rural**, v.49, 2019

SAMAAN, R. A. Dietary Fiber for the Prevention of Cardiovascular Disease: Fiber's Interaction between Gut Microflora, Sugar Metabolism, Weight Control and Cardiovascular Health. **Academic Press**, 2017.

SAMEH, S., Al-Sayed, E., Labib, R. M., & Singab, A. N. Genus Spondias, A phytochemical and pharmacological review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018.

SANTOS, P. C. J. L. et al. Alterações moleculares associadas à hemocromatose hereditária. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 3, p. 192-202, 2009.

SATIR, G.,Guzel-Seydim, Z. B. How Kefir Fermentation Can Affect Product Composition? **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 1–7, 2016.

SCHAWN, R. F., Magalhães-Guedes, K. T., Dias, D. R. Kefir-grains and beverages: a review. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2015.

SCHUMPETER, J. A. **Capitalismo, socialismo e democracia**. SciELO-Editora UNESP, 2017.

SGARBIERI, V.C., Pacheco, M.T.B. Alimentos funcionais fisiológicos. **Braz. J. Food Technol.** Preprint Serie, n.2, 1999

SILVA, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4 ed. São Paulo: Varela, 2010

SIMÕES, A do N. Alterações químicas e atividades de enzimas em folhas de couve inteiras e minimamente processadas, 2004, 75 F. **Tese (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa-UFV, 2004.

SINGLETON, V., Rossi, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdicphosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144–158, 1965.

SONESTEDT, Emily et al. Dairy products and its association with incidence of cardiovascular disease: the Malmö diet and cancer cohort. **European journal of epidemiology**, v. 26, n. 8, p. 609-618, 2011.

THASSYA LUCAS DOS SANTOS, A. et al. UPLC-MS-ESI-QTOF analysis and antifungal activity of the *Spondias tuberosa* Arruda leaf and root hydroalcoholic extracts. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, p. 240, 2019.

TIVERON, A.P. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. 2010, 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz" - ESALQ, USP, Piracicaba, 2010.

URALA, Nina; LÄHTEENMÄKI, Liisa. Consumers' changing attitudes towards functional foods. **Food Quality and Preference**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2007.

VALERO-CASES, E., FRUTOS, M.J. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for *Lactobacillus acidophilus*: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 136-143, 2017.

VIDIGAL, M.C.T.R., Minim, V.P.R., Carvalho, N.B., Milagres, M.P., Gonçalves, A.C.A. Effect a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1988 – 1996, 2011.

ZIELINSKI, A.A.F., Ávila, S., Ito, V., Nogueira, A., Wosiacki, G., AND Hamini-Uk, C.W. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and in vitro antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: an application of chemometrics. **Journal of Food Science**.v.79, 2014.

ZUBILLAGA, M. et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, 2001

WENDLING, L. K.; Weschenfelder, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados – uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**. v. 68, n. 395, p. 49- 57, 2013.

WESCHENFELDER, Simone. **Caracterização de kefir tradicional quanto á composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-Escherichia coli**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 2009

WITTHUHN, R. C., Schoeman, T., Britz, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International dairy journal**, v. 15, n. 4, p. 383-389, 2005.

WOUTERS, J. T.M et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 2-3, p. 91-109, 2002.

CAPÍTULO 2 – OTIMIZAÇÃO DE FORMULAÇÃO PARA A PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DE UMBU COM GRÃOS DE KEFIR

2.1. INTRODUÇÃO

A otimização de processos é uma etapa fundamental para tornar o processo produtivo mais eficiente, eliminando potenciais falhas e melhorando o desempenho. Além disso, tem como objetivo impactar positivamente na redução dos custos de investimentos e produção, realizando mais com menos e eliminando partes redundantes no processo produtivo (ELLNER, 2020). Isto se aplica, dentre outras áreas, à otimização de processos biotecnológicos, onde as variáveis do processo são analisadas para encontrar a rota mais eficiente.

A aplicação do planejamento experimental na indústria é fundamental para a inovação no desenvolvimento de novos produtos e para o controle de processos (MONTGOMERY, 2001). O método estatístico de delineamento composto central rotacional (DCCR) vem sendo muito utilizado para esta finalidade (ROSA, 2021). Esta ferramenta estatística consiste na obtenção de um modelo matemático representativo em termos das principais variáveis de interesse estudadas, dentro de certo nível de confiança, utilizando o mínimo possível de amostras experimentais, e consequentemente reduzindo o volume de amostras, tempo e custos com análises. Dentro dos passos para a realização do planejamento estratégico do DCCR está a análise estatística e a interpretação dos resultados obtidos, ajuste dos modelos, verificação da validade dos modelos utilizando análise de variância e por fim, definição das faixas ótimas de operação por meio da análise da superfície de resposta (DE ASSIS MOURA, 2017).

A Metodologia de Superfície de Respostas (MSR) é uma ferramenta muito utilizada para otimizar o processo de produção de alimentos processados (BARROS NETO et al, 2002; BOX et al, 1978). Esta metodologia baseia-se na variação simultânea de variáveis independentes, selecionadas por sua influência nas propriedades do processo, o que é nomeado como variáveis dependentes ou respostas (GRIZOTTO et al, 2005). Os resultados experimentais permitem então identificar a melhor combinação entre os processos produtivos para obter um produto final com a qualidade desejada.

Uma grande parte da população sofre com intolerância à determinados produtos como derivados lácteos, sendo desta forma necessário o desenvolvimento de novos produtos a base de frutas como o umbu para atender a demanda de alimentos saudáveis e sem restrições de consumo (DE OLIVEIRA GOMES, 2020). Neste contexto, a elaboração de uma bebida fermentada a base de umbu com grãos de kefir pode trazer benefícios adicionais ao consumo de frutas, melhorando também o processo de digestão de indivíduos que apresentam intolerância a outros alimentos (DE OLIVEIRA GOMES, 2020). Desta forma, considerando a falta de informações sobre formulações de kefir utilizando umbu, torna-se necessário avaliar diferentes combinações do processo produtivo para obter uma formulação otimizada de bebida fermentada a base de umbu com grãos de kefir.

2.2. OBJETIVO

Obter uma formulação otimizada de bebida fermentada a base de umbu com grãos de kefir.

2.3. MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1. Local do desenvolvimento da pesquisa

Esse experimento foi realizado no Laboratório de análises de alimentos (LAA), do Departamento de Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju, SE, em parceria com o laboratório de Fisiologia e Tecnologia Pós-colheita da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE.

2.3.2. Matéria-prima

A polpa de umbu foi obtida em uma área experimental de umbuzeiro da Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Os frutos foram colhidos no período de fevereiro a março, quando atingiram o estágio de maturação 3FTV-In (inchado) (CAMPOS, 2007). Após a colheita, os frutos foram higienizados, lavados e despulpados com uma despulpadeira mecânica com malha de 0,8 mm modelo DMJ1-05 (Santa Catarina, Brasil), sendo a polpa congelada a -18 °C. Após esta etapa, a polpa foi transportada em caixas térmicas com gelo para o DTA da UFS, onde foi armazenada a -18 °C. A polpa foi caracterizada em triplicata para os teores de cinzas, lipídios, umidade, acidez titulável, sólidos solúveis, potencial hidrogeniônico e vitamina C.

2.3.3. Cultura de Kefir

A cultura de kefir utilizada neste experimento foi obtida através de doação de uma empresa produtora de bebida fermentada, localizada em Aracaju/SE. A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Biotecnologia do DTA da UFS. A cultura foi inoculada diretamente nas formulações determinadas no experimento. Foi utilizada uma quantidade de cultura kefir de 10g/100ml.

2.3.4. Determinação das variáveis do DCCR

A escolha das variáveis se baseou na hipótese de que o meio influencia no desenvolvimento dos microrganismos, tendo como sua principal fonte de nutrientes os açúcares e outras substâncias contidas na polpa de fruta (WSZOLES et al., 2001; WITTHUHN et al., 2004; CASSANEGO et al., 2015; BERGMANN et al., 2010; GONÇALVES et al., 2018; LOPUSIEWICZ et al., 2019).

Os pontos codificados das variáveis teor de açúcar e concentração de polpa foram obtidos de acordo com a Tabela 2, tendo como resultado quatro ensaios com pontos fatoriais (+1 e -1), quatro ensaios com os pontos axiais (+1,41 e -1,41) e três ensaios com os pontos centrais (0), totalizando 11.

Tabela 2. Cálculos das variáveis dos ensaios do DCCR.

% Açúcar		Concentração de polpa	
$\alpha = (2k)^{1/4} =$	$12 - 8 = 4$	$\alpha = (2k)^{1/4} =$	$100 - 50 = 50$
$(22)^{1/4} = 1,4142$	$4/1,41 = 2,84$	$(22)^{1/4} = 1,4142$	$50/1,41 = 35$
mínimo: 4 %	$-1 = 8 - 2,84 =$ 5,16%	mínimo: 0 %	$-1 = 50 - 35 = 15\%$
máximo: 12 %	$1 = 8 + 2,84 =$ 10,84%	máximo: 100 %	$1 = 50 + 35 = 85\%$
central: 8 %	$0 = 8\%$	central: 50 %	$0 = 50\%$
$1,41 = 12\%$	$-1,41 = 4\%$	$1,41 = 100\%$	$-1,41 = 0\%$

Assim sendo, os ensaios foram organizados segundo a tabela 3.

Tabela 3. Variáveis codificadas e decodificadas do DCCR.

ENSAIO	VARIÁVEIS CODIFICADAS		VARIÁVEIS DECODIFICADAS	
	Adição de açúcar (%)	Concentração da polpa (%)	Adição de açúcar (%)	Concentração da polpa (%)
1	-1	-1	5,16	15
2	1	-1	10,84	15
3	-1	1	5,16	85
4	1	1	10,84	85
5	-1,41	0	4	50
6	1,41	0	12	50
7	0	-1,41	8	0
8	0	1,41	8	100
9	0	0	8	50
10	0	0	8	50
11	0	0	8	50

2.3.5. Obtenção do fermentado

Inicialmente, a polpa foi pasteurizada para então ser utilizada nas formulações definidas pelo planejamento experimental de DCCR. A temperatura de pasteurização da polpa (Figura 3) foi de $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos. Após o resfriamento, até uma temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, as formulações descritas determinadas pelo DCCR foram preparadas, adicionando o açúcar e o inóculo de kefir para a fermentação.

Figura 3. Realização da pasteurização lenta da polpa de umbu a $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}/30$ min.



As formulações foram incubadas em BOD a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h, para a realização da fermentação (Figura 4). Após este tempo, os fermentados foram coados para a retirada dos grãos. O sobrenadante foi reservado e refrigerado a $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h (Figura 5). Esta temperatura foi utilizada por representar a média de refrigeração de expositores de redes de supermercado.

Figura 4. Preparo dos fermentados de umbu com grãos de kefir para a fermentação.



Figura 5. Fermentados de umbu com grãos de kefir para a maturação.



2.3.6. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas na caracterização da polpa constituindo nas análises de cinzas, lipídios, umidade, acidez titulável, análise de sólidos solúveis, potencial hidrogeniônico e ácido ascórbico.

2.3.6.1. Análise de cinzas

A análise de cinzas foi realizada pelo método de determinação de cinzas, de acordo com as normas analíticas do IAL, utilizando a metodologia 018/IV, resíduo por incineração, com adaptações. Foram utilizados cadinhos de porcelana previamente tarados a 550°C em mufla, nos quais foram medidos 5mL da amostra. As amostras foram evaporadas em placa aquecedora, incineradas em mufla, resfriadas em dessecador até a

temperatura ambiente e pesadas. A pesagem foi feita até a obtenção do peso constante (IAL,2008).

2.3.6.2. Análise de lipídios

Para a determinação de lipídios, foram medidos 2ml da amostra, posta em papel filtro e algodão, sobreposta em cartuchos para Soxhlet que foram deixados em refluxo por um período de 6 horas em balões de fundo chato previamente tarados em estufa a 105°C. O hexano foi solvente utilizado. O balão com o extrato foi transferido para estufa a 105°C até peso constante (IAL,2008).

2.3.6.3. Umidade

A umidade foi determinada pelo método gravimétrico, onde foram pesadas cerca de 2,5g de amostra em cadinhos de porcelana, previamente tarados, e levados a estufa a 105°C. As amostras foram pesadas até obter peso constante.

2.3.6.4. Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia 312/IV descrita por Adolfo Lutz (2008), onde foram medidos 2,5ml da amostra em um balão de 25ml, sendo este aferido com água destilada. Para titulação, foi adicionado 3 gotas de fenolftaleína 1% e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1M, sob agitação constante, até que a coloração rósea persistisse por, pelo menos, 30 segundos.

O cálculo da acidez foi realizado utilizando-se a equação abaixo, tendo os resultados expressos em g de ácido cítrico/100g de matéria fresca.

$$\frac{V \times f \times M \times PM}{10 \times P \times n} = \text{g de [ácido orgânico]\%}$$

Onde:

V = volume da solução de NaOH gasto na titulação (ml)

f = fator de correção da solução de NaOH

M = molaridade da solução de NaOH

PM = peso molecular de ácido cítrico (PM=192)

P = massa da amostra (g)

n = número de hidrogênios ionizáveis (N=3).

2.3.6.5. Análise de sólidos solúveis

A análise de sólidos solúveis foi realizada pela medição de seu índice de refração por comparação com tabelas de referência, de acordo com as normas analíticas do IAL, utilizando a metodologia 315/IV frutas e produtos de frutas, determinação de sólidos solúveis por refratometria. A amostra homogeneizada foi transferida para o prisma do refratômetro digital (HI 96801), previamente calibrado e feita a leitura diretamente na escala dos graus brix (IAL, 2008).

2.3.6.6. Potencial hidrogeniônico (pH)

A análise de pH foi realizada pelo método de determinação direta, através de medição pelo potenciômetro diretamente na amostra, de acordo com as normas analíticas do IAL, utilizando a metodologia 017/IV, determinação do pH. Foram medidos 2,5mL da amostra, diluídas com auxílio de 25 ml de água, homogeneizadas e o pH foi determinado utilizando pHmetro (Marca: Hanna), previamente calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0 (IAL, 2008).

2.3.6.7. Ácido Ascórbico (vitamina C)

A análise de vitamina C Total foi realizada utilizando o método descrito pela AOAC 39.051, com adaptações. Para esta, foram medidos 2,5mL da amostra, onde esta foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 25mL, sendo este aferido por uma solução de extração, feita com ácido oxálico 2%. Em seguida, foi transferida uma alíquota de 7 ml do conteúdo do balão para um Erlenmeyer, rapidamente titulado com a solução corante de DCPIP (2,6-dicloroindofenol), solução feita com 50mg de sal sódio 2,6-dicloroindofenol diluídas em 200 ml de água destilada contendo 42mg de bicarbonato de sódio (NaHCO_3), até obtenção de uma coloração rósea, que deve persistir por, pelo menos 30s. A cada dia de análise realizada foi executada a padronização da solução de DCPIP (2,6-dicloroindofenol) com uma solução padrão de ácido ascórbico 1mg/ml em solução de extração. Uma alíquota de 2ml da solução de padrão de ácido ascórbico foi diluída em 5mL de solução de extração e então titulada com a solução de DCPIP até que persistisse durante 5s a coloração rósea. Para a minimização de erros, foi feito também a titulação da solução de dois brancos contendo, 7 ml da solução de extração. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico/100g de amostra.

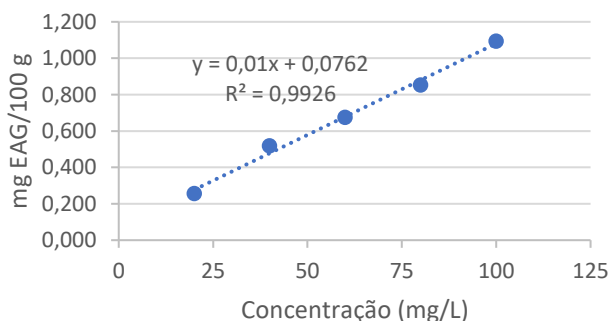
2.3.7. Análise de compostos bioativos

As análises de compostos bioativos foram aplicadas às 11 formulações obtidas no estudo, sendo realizadas as quantificações de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides, de acordo com cada metodologia proposta.

2.3.7.1. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin Ciocateau utilizando ácido gálico como padrão de referência, de acordo com Singleton e Rossi, (1965), onde primeiramente foram preparadas as soluções de ácido gálico (5mg de ácido/100ml) e carbonato de sódio (7,5mg de carbonato/100ml) e realizada a curva de calibração. Em seguida, as amostras foram analisadas utilizando 50 µL de extrato na diluição 1:8, 3,95ml de água, 0,25m da solução de Folin Ciocateau (10%) e 0,75ml de carbonato de sódio. Foi homogeneizado e incubado no escuro por 2 horas. Após o período de incubação foi lido no espectro com comprimento de onda de 750 nm. Onde os resultados foram expressos em mg EAG/100g.

Figura 6. Curva padrão de ácido gálico.

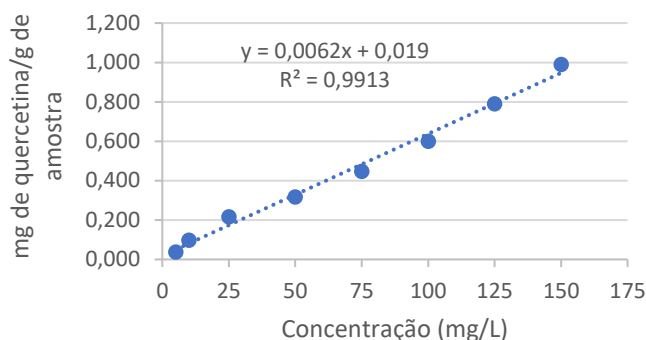


2.3.7.2. Flavonoides totais

Os teores de flavonoides foram analisados seguindo a metodologia proposta por Boroski et al. (2015), com modificações. O procedimento consistiu na adição de 500µL de extrato, o qual foi preparado com metanol P.A., em 250µL de cloreto de alumínio 5% em metanol (v/v) e 4,25ml de metanol P.A. O preparado foi homogeneizado em vórtex e mantido a temperatura ambiente por 30 min. Após o tempo de descanso da solução, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Rayleigh modelo UV-2601) no comprimento de onda de 425 nm. O branco foi analisado substituindo a quantidade de adição de extrato por metanol P.A. Os resultados foram expressos em mg/L. Utilizou-se como padrão a

quercetina nas concentrações de 5,10,25,50,75, 100, 125,e 150 mg/L para a construção da curva de calibração. A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides, expresso em mg de quercetina/g de amostra.

Figura 7. Curva padrão de quercetina



2.3.7.3. Carotenoides totais

O teor de carotenoides foi determinado conforme o método descrito por Lichtenthaler et al. (1987), pesando 2g da amostra e 0,2g de carbonato de cálcio. Então, em cada amostra foi adicionado 7ml de acetona a 80%. Em seguida, cada amostra foi filtrada diretamente em balão volumétrico âmbar de 25ml. O resíduo do papel de filtro foi lavado 2 vezes com acetona a 80% e o volume completado com acetona a 80%. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm. Os resultados foram calculados de acordo com as normas recomendadas pela metodologia utilizada e expressos em µg/100ml de β-caroteno.

2.3.8. Análise estatística

Os fermentados obtidos foram avaliados para os parâmetros de qualidade físico-químicas e microbiológicas descritos acima, sendo os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey (5%), utilizando o Software SISVAR versão 5.6 (Copyright © 2015 by Daniel Furtado Ferreira).

A construção das superfícies de resposta e otimização do meio de cultivo foram realizadas com o estudo dos efeitos dos fatores de acordo com os resultados da aplicação do delineamento composto central rotacional (DCCR), com os parâmetros de quantidade de polpa e de açúcar, e tendo como variável resposta os compostos bioativos em questão. A análise estatística e a obtenção de superfícies de resposta foram realizados utilizando o

Software STATISTICA versão 14.0.0 (Stat Soft Inc®, USA) com nível de significância de 5%, com as referidas validações.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Análises físico-químicas

Os parâmetros de caracterização obtidos nas análises físico-químicas da polpa estão registrados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados das análises físico-químicas da caracterização da polpa de umbu.

Composição	Valores
Cinzas(%)	0,36
Lipídios (%)	0,29
Umidade (%)	87,7
Acidez titulável(% de ácido cítrico)	3,57
Sólidos solúveis (%)	11,2
pH	2,85
Ácido Ascórbico (mg de ácido ascórbico/100g)	12,9

De acordo com o levantamento de genótipos de umbu, pesquisa realizada por Costa et al (2004), a polpa utilizada apresentou perfil mais ácido e com maior teor de sólidos solúveis que os genótipos analisados pelo autor e também em comparação ao padrão de identidade e qualidade apresentados pelo MAPA (2018). Alguns fatores influenciam as características físico-químicas de umbus, como as práticas de manejo culturais, condições ambientais de cultivo e o genótipo. Pesquisas realizadas pela Embrapa Semiárido vêm selecionando genótipos de umbu com características superiores de produtividade e qualidade. Entre as cultivares de umbu recentemente lançadas no mercado estão BRS 48, BRS 52, BRS 55 e BRS 68 (EMBRAPA, 2019). O uso de cultivares comerciais permite o estabelecimento de um padrão de qualidade da fruta e seus produtos processados disponibilizados no mercado. Entretanto, para isso, torna-se necessário também estabelecer práticas de manejo e definir a maturação ideal de colheita, pois ambos fatores influenciam a qualidade de umbus e seus produtos processados (PALIOTO et al., 2015; LIMA & SILVA, 2016; SILVA, 2016). Análise de compostos bioativos.

2.4.1. Análise de compostos bioativos

Os resultados das análises dos compostos bioativos, fenólicos totais, flavonoides totais e carotenoides estão apresentados, na tabela 5, sendo discutidas separadamente por composto bioativo nas Figuras 8 a 13. Os resultados obtidos foram provenientes de uma mistura de polpas de diferentes genótipos colhidos no mesmo estágio de maturação no período de fevereiro/março de 2020.

Tabela 5. Resultado da análise de variância, com teste Tukey, utilizando o programa SISVAR 5.6, para as concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides e carotenoides.

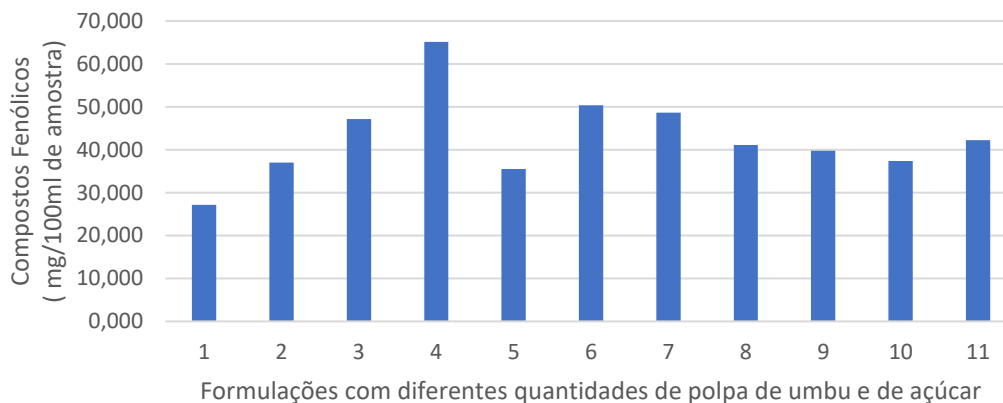
Ensaio	Adição de açúcar (%)	Concentração de polpa (%)	Fenólicos	Flavonoides	Carotenoides
			Totais (mg/100ml de amostra)	(mg/100ml de amostra)	(µg/100 ml de β-caroteno)
1	5,16	15	27,443 ^a	16,331 ^a	1,813 ^c
2	10,84	15	35,898 ^b	29,099 ^{cd}	1,258 ^b
3	5,16	85	46,861 ^e	27,823 ^{bc}	3,940 ⁱ
4	10,84	85	64,498 ^g	38,508 ^f	3,031 ^e
5	4	50	34,684 ^b	23,790 ^b	2,745 ^d
6	12	50	50,461 ^f	33,468 ^{de}	2,859 ^d
7	8	0	48,884 ^{ef}	28,629 ^c	0,508 ^a
8	8	100	41,117 ^{cd}	36,357 ^{ef}	3,216 ^f
9	8	50	39,822 ^c	26,058 ^{bc}	3,513 ^h
10	8	50	36,747 ^b	26,613 ^{bc}	3,395 ^{fh}
11	8	50	42,897 ^d	25,504 ^{bc}	3,316 ^{fg}

*Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A figura 8 apresenta os teores de compostos fenólicos das formulações que foram elaboradas seguindo as especificações de concentração de açúcar e polpa da tabela 5. Os compostos fenólicos tiveram seus maiores picos nas formulações 4, 6, e 7, com concentrações de 64,498, 50,461 e 48,884 mg/100ml de amostra, respectivamente. Este fato pode ter se dado devido a quantidade de açúcar utilizado, melhorando a potencialidade da fermentação e, conseqüentemente a produção de compostos bioativos sintetizados pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir, e influenciado pela

quantidade de polpa de umbu, que também possui teores de compostos bioativos (LIMA, 2016; RIBEIRO et al., 2017).

Figura 8. Teores de compostos fenólicos (mg/100ml de amostra) das formulações dos fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.



A formulação 7 não continha adição de polpa para a fermentação teve uma concentração de 48,884 mg/100ml de amostra de compostos fenólicos totais, não variando significativamente das amostras 3 e 6, com 46,861 e 50,461 mg/100ml de amostra, respectivamente. Este fato comprova que os compostos fenólicos presentes não são provenientes apenas pela utilização da polpa de umbu, mas que tais compostos são sintetizados pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir que foram utilizados para a fermentação. Tais características podem ser atribuídas a cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e outros gêneros de leveduras como *Rhodotorula*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Pichia*, *Hansenula*, *Dekkera* e *Brettanomyces*, que contribuem também sensorialmente nos produtos fermentados (COGHE et al. 2004; EDLIN et al. 1995; SHINOHARA et al. 2000). Outros autores realizaram o levantamento de microrganismos encontrados em kefir que são capazes de sintetizar compostos fenólicos, os quais são *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri*, *Brettanomyces intermedius*, *Brettanomyces claussenii*, *Candida guilliermondii*, *Candida valida*, *Cryptococcus albidus*, *Rhodotorula rubra* (ESTRADA-CUELLAR, 1985; RUBIO et al, 1993).

Para os compostos fenólicos não foi obtida uma resposta conclusiva para o modelo matemático e obtenção da superfície de resposta, devido às análises do lackoffit e a falta de significância nas interações realizadas, com o r^2 compreendido em 0,5491, como mostra a figura 9.

Figura 9. Resultado da análise estatística de compostos fenólicos, utilizando o programa SAS University Edition

Residual	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Lack of Fit	3	609.602885	203.200962	3.46	0.2321
Pure Error	2	117.383467	58.691733		
Total Error	5	726.986352	145.397270		

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	t Value	Pr > t	Parameter Estimate from Coded Data
Intercept	1	31.200154	6.961653	4.48	0.0065	31.200154
acucar	1	4.806621	4.269530	1.13	0.3114	6.777336
polpa	1	5.900039	4.269530	1.38	0.2256	8.319055
acucar*acucar	1	6.326840	5.094661	1.24	0.2694	12.578390
polpa*acucar	1	-0.204250	6.029040	-0.03	0.9743	-0.406069
polpa*polpa	1	7.546597	5.094661	1.48	0.1986	15.003390

Segundo Pukelsheim (2007), embora o teste de falta de ajuste forneça uma confirmação útil, em muitos experimentos de superfície de resposta, o exame gráfico de resíduos é realmente melhor para julgar a falta de ajuste do que o F baseado em replicação padrão teste. Qualquer modelo linear é realisticamente apenas uma aproximação do verdadeiro mecanismo que gera os dados, devendo chamar a atenção sobre a obtenção de dados para servir aos propósitos do experimentador, seja para identificar fatores importantes ou para encontrar a região de resposta. Por um lado, com dados suficientes, um teste F sinalizará falta de ajuste para a aproximação, independentemente de sua adequação prática. O teste F muitas vezes falhará em detectar uma falta de ajuste considerável apenas por falta de dados, sendo melhor criar examinar exibições gráficas das características de um ajuste em vez de sempre confiar em resumos simples para detectar problemas.

Figura 10. Teores de flavonoides (mg/100ml de amostra) das formulações dos fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.



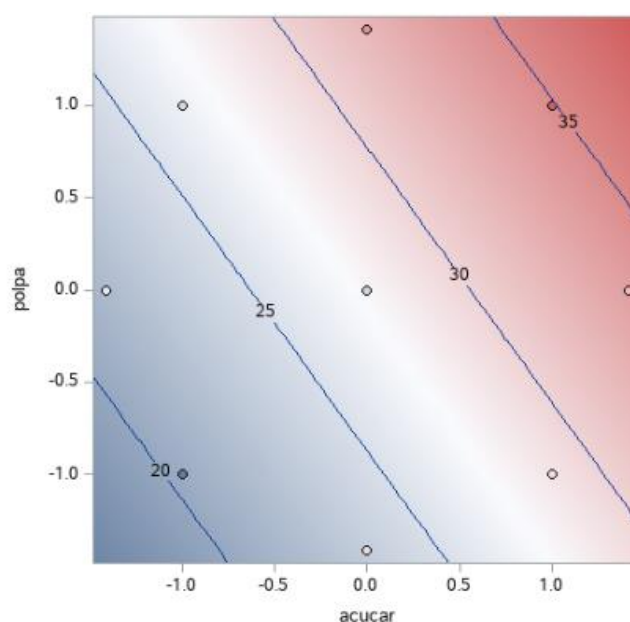
Os maiores teores de flavonoides estão presentes nos ensaios 4, 8, e 6, com concentrações de 38,508, 36,357 e 33,468 mg/100ml de amostra respectivamente. Isto se dá também pela potencialidade dos grãos de kefir sintetizarem compostos bioativos, incluindo flavonoides (LÓPEZ-ROJO, J. P. et al., 2017). A quantidade de polpa também influenciou os teores de flavonoides, uma vez que a polpa contém tal grupo de compostos bioativos (DOS SANTOS, 2018).

Zielinski et al. (2014) avaliaram os teores de compostos bioativos em 19 espécies frutíferas nativas do Brasil, e verificaram concentrações de flavonoides totais de 69,30mg1000g⁻¹. Silva et al. (2012) relataram valores de 1,37 mg100g⁻¹ a 5,25mg100g⁻¹ em de genótipos de *Spondiasmombin* L.. Nota-se que a concentração de flavonoides encontradas neste estudo foram superiores, indicando que além da polpa de umbu, os microrganismos presentes nos grãos de kefir contribuíram para o teor final de flavonoides na bebida.

O modelo matemático obtido para a concentração de flavonoides, usando o programa Statistica 14.0.0, foi:

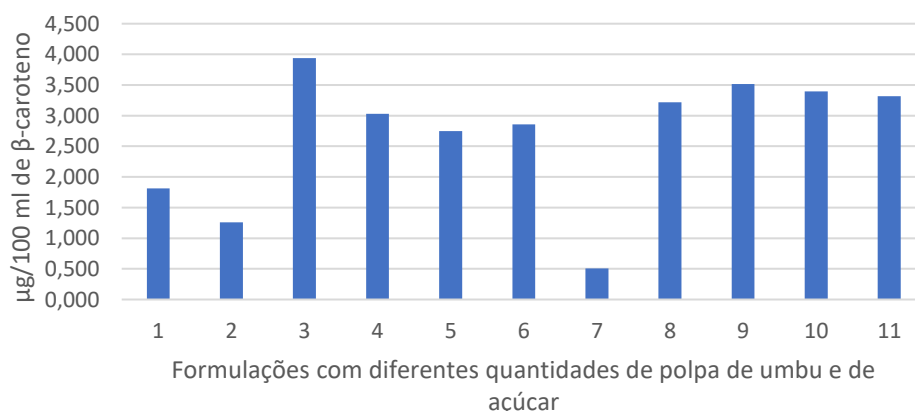
$$\text{Flavonoides}^2 = 793.48 + 230.55 \cdot \text{açúcar} + 172.60 \cdot \text{polpa}$$

Figura 11. Teores de flavonoides(mg/100ml de amostra) de diferentes formulações de fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.



Na Figura 11, nota-se que quanto maior a quantidade de polpa e de açúcar, maior seriam as concentrações de flavonoides. Em concordância, os resultados apresentados nas Figuras 10 e 11 mostram que a cultura kefir também realiza a síntese de flavonoides como resultado da fermentação, quando comparamos as leituras de flavonoides com as bebidas contendo polpa de umbu, sendo estes teores também influenciados pela quantidade de açúcar presente em cada formulação. Desta forma, a concentração final de flavonoides presente na bebida foi o resultado a soma dos teores de flavonoides presentes na polpa adicionada a formulação e dos teores de flavonoides sintetizados pelos microorganismos em resposta a quantidade de açúcar de cada formulação.

12. Teores de carotenoides ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de β -caroteno) de formulações de fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.

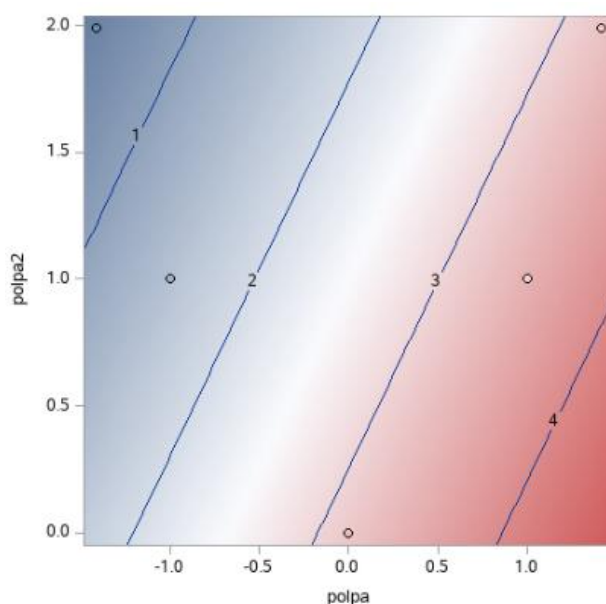


Os teores de carotenoides foram definidos pela quantidade de polpa utilizada e concentração destes compostos na polpa que é determinada pelo genótipo e maturação no momento do processamento (MELO, 2010; MACEDO & DA COSTA FERNANDES, 2021; MESCHEDE et al, 2011; VALDUGA et al, 2007).

O modelo matemático para os teores de carotenoides, com o r^2 compreendido em 0,9071, teve como significativo ($p \geq 0,05$) as interações de polpa e polpa^2 , como segue abaixo:

$$\text{Carotenoides} = 0.967664.\text{polpa} - 0.730748.\text{polpa}^2$$

Figura 13. Teores de carotenoides ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ de β -caroteno) de diferentes formulações de fermentados de umbu utilizando grãos de kefir.



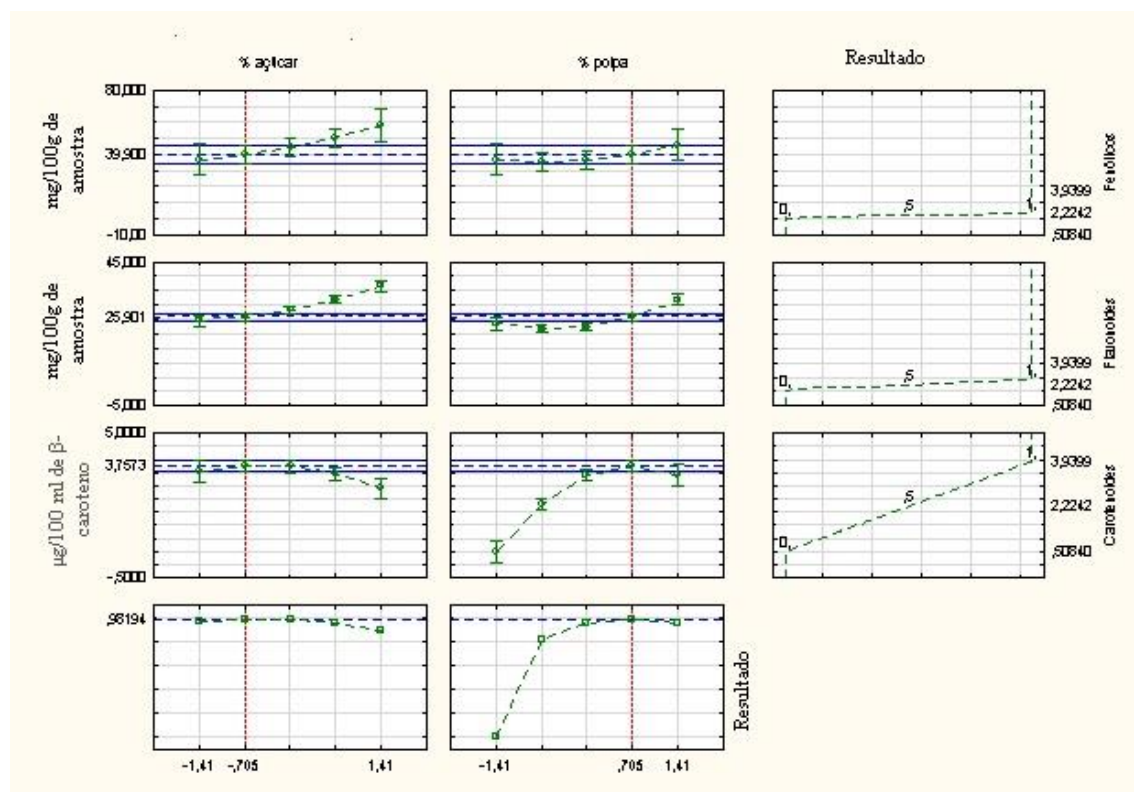
Os resultados apresentados na Figura 13, em concordância com a tabela 5, confirmam que quanto maior a quantidade de polpa, maior a quantidade de carotenoides totais, uma vez que estes pigmentos são fornecidos principalmente pela polpa para compor o total presente na bebida (MELO et al., 2010; RIBEITO et al., 2017). Este resultado mostra que os microrganismos presentes nos grãos de kefir não realizaram a síntese de carotenoides.

2.4.2. Variáveis respostas do DCCR e Otimização da formulação

A partir dos resultados das análises de compostos bioativos, foram realizadas as correlações das variáveis respostas de cada grupo de compostos bioativos, utilizando o

software Statistica 14.0.0. Os gráficos de correlação e a representação da quantidade de polpa e de açúcar ideal estão representados na Figura 14.

Figura 14. Otimização da bebida fermentada levando em consideração as variáveis independentes dos compostos bioativos.



De acordo com a figura 14, as correlações indicam que os pontos onde podemos obter teores de compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides são concentrações de açúcar e polpa compreendidos em 6% e 75%, respectivamente, elaborando uma bebida com valores de compostos bioativos significativos.

A INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 12, DE 4 DE SETEMBRO DE 2003 (BRASIL, 2003) determina um mínimo para ser caracterizado como suco tropical de frutas cítricas, a utilização de pelo menos 35% de polpa. Apesar de não ser caracterizado como suco tropical por ter a ocorrência de fermentação, utilizou-se tal instrução para estipular a concentração mais adequada, tendo como objetivo a produção industrial, e que contenha boas características bioativas. Com isso, levando em consideração as respostas bioativas e o bom senso de cunho industrial, foram escolhidos as amostras 4 e 6 para incluir nos testes afetivos e de intenção de compra, além da amostra otimizada.

2.5. CONCLUSÕES

A polpa de umbu utilizada para realizar o experimento tem características peculiares, tendo valores de brix e acidez diferentes do padrão de identidade e qualidade estipulados pelo MAPA, resultando em um produto final com um possível diferencial sensorial.

As concentrações de compostos fenólicos e flavonoides na bebida fermentada foram provenientes da polpa e do processo fermentativo dos microrganismos presentes nos grãos de kefir.

A concentração de carotenoides presentes nas formulações da bebida fermentada foi apresentada em maior quantidade da polpa de umbu.

A formulação otimizada foi identificada como sendo a composta por 6% de açúcar e 75% de polpa, com base nos teores de compostos bioativos.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS NETO, B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: UNICAMP, 401p. 2002.

BERGMANN, R. S. O. et al., Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.

BOX, G.E.P., Hunter, H.G., Hunter, J.S. **Statistics for experiments**. New York: John Wiley Co. p. 306-351, 501-539. 1978..

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 12, de 4 de setembro de 2003. Regulamento técnico geral para fixação de identificação e qualidade gerais para suco tropical. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-12-de-4-de-setembro-de-2003.pdf>>. Acesso: 11 de dezembro 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução normativa nº 49, de 26 de setembro de 2018. Complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Suco e Polpa de Fruta. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/guest/materia/->

/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/42586576/doi-10.11809-2018-09-27-instrucao-normativa-n-49-de-26->. Acesso: 11 de dezembro 2021.

BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados. **São Paulo**, p. 4, 2005.

CALADO, V., Montgomery, D. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Editora E-papers, 2003.

CAMPOS, C. O. **Frutos de umbuzeiro** (*Spondias tuberosa* Arruda): Características físico-químicas durante seu desenvolvimento e na pós-colheita. 2007. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônomicas Campus de Botucatu. Botucatu, SP, 2007.

CARNEIRO, R. P. Estudo de quefir produzido por diferentes métodos. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2010. 142p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).

CASSANEGO, D. B. et al. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 175-186, 2015.

CHITARRA, M. I. F., Chitarra, A.B. **Pós-colheita de Frutos e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. 2ª ed Lavras: ESAL/FAEPE, 2005.

COSTA, N. P., Luz, T. L. B., Gonçalves, E. P., Bruno, R. de L. A. Caracterização físico-química de frutos de umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.), colhidos em quatro estádios de maturação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 20, n. 2, p. 65-71, 2004.

DE ASSIS MOURA, H. N., Da Silva, D. C. Avaliação do planejamento experimental no processo de secagem do inhame (*Discorea* spp.). **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, v. 4, n. 6, 2017.

DE OLIVEIRA GOMES, Fernanda et al. Avaliação físico-química de uma bebida à base de kefir setorizada com pequi. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 10755-10762, 2020.

DOS SANTOS, E. F. et al. Quantificação de compostos bioativos em frutos de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.) e cajá (*Spondias mombin* L.) nativos de Alagoas. **Revista Ciência Agrícola**, v. 16, n. 1, p. 21-29, 2018.

ELLNER, Lorenzo. Simulação e otimização de um processo. 2020.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cientistas desenvolvem as primeiras cultivares de umbuzeiro. Notícias. **Portal Embrapa** (Versão 3.117.0) p01. 2019. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/47436939/cientistas-desenvolvem-as-primeiras-cultivares-de-umbuzeiro>>.

ESTRADA-CUELLAR, J. Estudio de las levaduras de los tibicos y de la madre del vinagre. (Tese de Doutorado). UNAM.1985

GONÇALVES, I. F. et al. Efeito de yacon na aceitação sensorial de kefir e viabilidade de bactérias lácticas na bebida. **Vértices (Campos dos Goitacazes)**, v. 20, n. 2, p. 194-201, 2018.

GRIZOTTO, R.K.et al. Otimização via metodologia de superfície de respostas dos parâmetros tecnológicos para produção de fruta estruturada e desidratada a partir de polpa concentrada de mamão. **Food Science and Technology**, v. 25, n. 1, p. 158-164, 2005.

IAL. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4ª edição, 1ª versão eletrônica. São Paulo, 2008.

LIMA, T. M. C. Qualidade e compostos bioativos de frutos de umbuzeiro cultivados sob o sistema orgânico e convencional. 2016.

LIMA, M. A. C.; Silva, S. M. Qualidade e conservação pós-colheita. In: DRUMOND, M. A.; AIDAR, S. T.; NASCIMENTO, C. E. S.; OLIVEIRA, V. R. (Eds.). **Umbuzeiro: avanços e perspectivas**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016. p. 176-215.

LÓPEZ-ROJO, J. P. et al. Estudio de la fermentación de kefir de agua de pina con tibicos. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, Vol. 16, No. 2 (2017) 405-414

MACEDO, P. M. S., DA COSTA FERNANDES, E. Análise de pigmentos e carotenoides como biomarcadores em cana-de-açúcar. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 30633-30641, 2021.

MAGALHÃES, K.T., Pereira, G.V.M., Dias, D.R., Schwan, R.F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241–1250, 2010.

MESCHEDE, D. K. et al. Alteração fisiológica da cana-de-açúcar pela aplicação de glyphosate e sulfometuron-methyl. **Planta Daninha**, v. 29, p. 413-419, 2011.

MELO, E. A., Andrade, R. S. Compostos bioativos e potencial antioxidante de frutos do umbuzeiro Bioactive compounds and antioxidant potential from the “umbuzeiro” fruits. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 21, n. 3, p. 453-458, 2010.

MENEZES, P. H. S.; SOUZA, A. A.; SILVA, E. S.; MEDEIROS, R. D.; BARBOSA, N. C.; SORIA, D. G. Influência do estágio de maturação na qualidade físico-química de frutos de umbu (*Spondias tuberosa*). **Scientia Agropecuaria**, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2017.

MONTGOMERY, D.C., "Design and Analysis of Experiments", 3ª edição, John Wiley and Sons, 2001.

PIETTA, P-G. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PUKELSHEIM, Friedrich. Optimum Experimental Designs, with SAS by Anthony Atkinson, Alexander Donev, Randall Tobias. 2007.

RIBEIRO, L.O. et al. Avaliação do armazenamento a frio sobre os compostos bioativos e as características físico-químicas e microbiológicas do suco de umbu pasteurizado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

RODRIGUES, F.A. et al. Caracterização do ponto de colheita de *Physalis peruviana* L. na região de Lavras, MG. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 6, p. 862-867, 2012.

RUBIO, M. T. et al. Microbial and biochemical studies of the fermentation of sugary solutions inoculated with tibi grains. **Revista Latino americana de Microbiología**, v. 35, n. 1, p. 19-31, 1993.

SILVA, F.V.G.; Silva, S.M.; Silva, G.C.; Mendonça, R.M.N.; Alves, R.E.; Dantas, A.L. Bioactive compounds and antioxidant activity in fruits of clone and ungrafted genotypes of yellow mombin tree. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2012, 32, 685-691.

SILVA, L.R.; Alves, R.E.; Silva, S.M.; Nogueira, D.H. Caracterização físico-química de frutos dos genótipos de umbu-cajazeiras oriundos da microrregião de Iguatu-CE. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, 2015, 9, 1, 1647-1659.

SILVA, V.P. et al. Caracterização físico-química de frutos de umbuzeiro para consumo in natura em dois estádios de maturação. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: ENCONTRO NACIONAL DA AGROINDÚSTRIA, 3. A agroindústria e os desafios da segurança alimentar: anais. Bananeiras: UFPB/Centro de Ciências Humanas, Sociais e Agrárias, 2017.

VALDUGA, E. et al. Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bio produção de carotenoides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007.

ZIELINSKI, A.A.F., Ávila, S., Ito, V., Nogueira, A., Wosiacki, G., Haminiuk, C.W.I. The Association between Chromaticity, Phenolics, Carotenoids, and In Vitro Antioxidant Activity of Frozen Fruit Pulp in Brazil: An Application of Chemometrics. **Journal of Food Science**, 79, 4, 510-516. 2014.

WITTHUHN, R. C. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of Kefir grains. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 337-344, 2005.

WSZOLEK, M. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **LWT-Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

CAPÍTULO 3 – SELEÇÃO DA AMOSTRA PARA TESTE DA VIABILIDADE DAS CULTURAS PROBIÓTICAS

3.1. INTRODUÇÃO

O mercado de produtos alimentícios, incluindo o mercado de bebidas, tem-se apresentado competitivo, exigindo novos produtos com propriedades superiores de qualidade e benefícios para a saúde (ALVES, 2021). Entretanto, apesar de muitos produtos apresentarem qualidade e benefícios para a saúde, estes também devem apresentar sabor e aroma desejados pelos consumidores. Dessa forma, ferramentas de análise sensorial são utilizadas para determinar a aceitabilidade sensorial do produto, evitando assim problemas de aceitação pelos consumidores (LAWLESS & HEYMANN, 2013).

A análise sensorial visa garantir ao consumidor o sabor e aroma desejado no produto comercializado (GUTIERREZ et al 2012). Com isso, a avaliação sensorial se torna um suporte técnico tanto para a pesquisa, quanto para a indústria e o marketing (LONGO, 2006). Além disso, a utilização da análise sensorial tem a capacidade de estabelecer uma preferência entre as amostras apresentadas, o que otimiza os esforços em estudos de viabilidade, objetivando manter ou melhorar sua qualidade sensorial, a qual está diretamente relacionada à satisfação do consumidor (HOUGH, 2010; O'SULLIVAN, 2017).

Os motivos para a realização de testes de consumidor geralmente se enquadram nas categorias: manutenção do produto, otimização do produto, desenvolvimento de novos produtos, avaliação do potencial do mercado e suporte para alegações de propaganda (MEILGAARD, 1999). Além disso, outros pontos se tornam importantes salientar, como o tipo de amostragem, fonte de voluntários e local de realização do teste (CHAVES, 1980; MONTEIRO, 1984; TEIXEIRA et al, 1987; MORAES, 1988).

Os testes de preferência podem ser considerados como uma das mais importantes etapas da análise sensorial, representando o somatório de todas as percepções sensoriais e expressando o julgamento sobre a qualidade do produto, onde são aplicados avaliando a preferência do consumidor em relação a duas ou mais amostras comparadas entre si, sem levar em conta o gosto pessoal de cada avaliador (ALVES, 2021). Estes testes são

utilizados quando se deseja comparar diretamente um produto em relação a outro, impondo uma escolha, não indicando se o indivíduo gostou ou desgostou (NORA, 2021).

A necessidade de amostragem adequada da população consumidora exclui, a princípio, o uso de funcionários e residentes locais para escritórios, centro técnico ou fábricas da empresa. No entanto, devido ao alto custo e ao longo tempo de resposta dos testes de consumidor, as empresas veem uma vantagem real em usar os funcionários ou a população local para pelo menos parte de seus testes afetivos (STONE&SIDEL, 2004; MEILGARD, 2007; KEMP et al., 2009; DUTCOSKY, 2011; MONTOUTO-GRAÑA et. al.; 2011; MINIM& SILVA, 2013).

A ordenação de preferência consiste em um teste direcional, onde os provadores são instruídos a organizar ou classificar um conjunto de amostras de forma crescente conforme sua preferência, sendo apresentadas ao provador pelo menos 3 amostras simultaneamente, devidamente codificadas (STONE & SIDEL, 2004; DUTCOSKY, 2011). A análise de resultados se baseia na atribuição de ordem, calculados pela soma das ordens para cada amostra e avaliados estatisticamente pelo teste de Friedman, usando a tabela de Newell e Mac Farlene. A análise estatística indica a diferença crítica entre os totais de ordenação, de acordo com o número de tratamento testado e o número de julgamentos obtidos e, a partir dela, é possível afirmar se há significância entre a preferência pelas amostras (ABNT, 1998).

A intenção de compra do consumidor é proveniente de um processo decisório complexo, influenciado por vários fatores como preço, conveniência e marketing, sendo as características sensoriais determinantes na sua decisão (AMARAL, 2017; GUERRERO et al., 2000). Alguns autores excluem a ideia de utilizar funcionários para a realização de testes de aceitação, contudo estes podem ser um recurso valioso quando usados corretamente e quando limitados a situações de manutenção (MEILGARD, 1999).

Devido à sua familiaridade com o produto e com os testes, os funcionários podem lidar com mais amostras por vez e podem oferecer melhor discriminação, respostas mais rápidas e serviço mais barato, podendo ser realizados no trabalho em um laboratório, no estilo de um teste de localização central, ou os funcionários podem levar o produto para casa (MEILGARD, 1999; STONE & SIDEL, 2004).

3.2. OBJETIVO

Avaliar e selecionar a formulação de bebida fermentada a base de umbu com grãos de kefir com melhor qualidade de consumo e aceitação dos consumidores.

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

As 2 formulações que obtiveram valores significativos de compostos bioativos, analisadas no Capítulo 2, foram selecionadas para compor o conjunto de amostras que serão apresentadas aos julgadores, conjuntamente com a formulação otimizada. As formulações elaboradas para a aplicação dos testes foram:

A = Formulação Otimizada (75% de polpa e 6% de açúcar)

B = formulação 4 (85% de polpa e 10,84% de açúcar)

C = 6 (50% de polpa e 12% de açúcar)

As 3 formulações de bebida fermentada foram avaliadas por 20 provadores não treinados com idades entre 18 e 50 anos (SALMERÓN, THOMAS & PANDIELLA, 2015), sendo estes apreciadores de suco de umbu. A etapa consistiu na avaliação do produto após as 24h de maturação, onde foi avaliada a preferência dos provadores para os atributos: cor, aroma, sabor e aceitação global. Também foi aplicado o teste de intenção de compra de consumidores.

Levando em consideração a restrição imposta pelos órgãos da saúde para lidar com a atual pandemia da COVID-19, para a realização do presente trabalho foram escolhidos provadores presentes no departamento de realização do projeto, selecionando aqueles que tivessem afinidade pelo consumo de suco de umbu.

Para a avaliação sensorial, 30 ml de cada formulação selecionada foram apresentadas aos avaliadores em copos plásticos descartáveis, codificadas com marcações de três dígitos, onde a amostra A se referia a amostra otimizada (75% de polpa e 6% de açúcar), B a formulação 4 (85% de polpa e 10,84% de açúcar) e C a formulação 6 (50% de polpa e 12% de açúcar).

Figura 15. Fermentação das formulações selecionadas para a realização dos testes afetivos e de intenção de compra.



Foi utilizada a ficha controle para a decodificação das amostras seguindo o padrão registrado na Tabela 5.

Tabela 5. Ficha controle para a aplicação do teste de preferência para 20 provadores.

PROVADOR	DELINEAMENTO		
	A	B	C
1	678	828	544
2	A	C	B
	156	905	317
3	B	A	C
	772	516	344
4	B	C	A
	838	907	451
5	C	A	B
	649	379	850
6	C	B	A
	355	692	723
7	A	B	C
	731	309	417
8	A	C	B
	190	642	398
9	B	A	C
	985	868	877
10	B	C	A
	235	218	334
11	C	A	B
	440	493	409
12	C	B	A
	436	930	633
13	A	B	C

	881	437	760
	A	C	B
14	402	567	716
	B	A	C
15	433	230	566
	B	C	A
16	505	865	765
	C	A	B
17	441	393	747
	C	B	A
18	485	784	668
	A	B	C
19	937	808	311
	A	C	B
20	434	292	635

Para os testes de preferência dos diferentes atributos (cor, aroma, sabor e doçura) foi apresentado a ficha representada na Figura 16.

Figura 16.Ficha de aplicação de teste de preferência de bebida de umbu fermentada por grãos de kefir.

Nome: _____		Data: ____/____/____	
<p>Você está recebendo 3 amostras codificadas. Prove da esquerda para a direita e ordene de forma decrescente a sua preferência nos atributos abaixo.</p>			
Cor	_____	_____	_____
	+ preferida		- preferida
Aroma	_____	_____	_____
	+ preferida		- preferida
Sabor	_____	_____	_____
	+ preferida		- preferida
Doçura	_____	_____	_____
	+ preferida		- preferida
Aceitação global	_____	_____	_____
	+ preferida		- preferida
Comentários:			

Conjuntamente com a ficha de aplicação do teste de preferência, foi apresentada a ficha de intenção de compra (Figura 17).

Figura 17. Ficha de intenção de compra de bebida de umbu fermentada por grãos de kefir.

Nome: _____ Data: ____/____/____

Da amostra que foi a sua preferência, analise com a escala abaixo a intenção de compra do produto. Ou seja, se este produto estivesse disponível no mercado, qual o grau de certeza de que compraria ou não o produto.

9. Certamente compraria	Amostra Preferida
8	
7. Provavelmente compraria	_____
6.	
5. talvez comprasse/talvez não comprasse	
4.	Intenção de compra
3. Provavelmente não compraria	_____
2.	
1. Certamente não compraria	

Comentários:

As análises estatísticas, das respostas dos provadores, foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o Software Statistical Analysis System (SAS) University Edition.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da aplicação do teste de aceitação estão expressos na Tabela 6, sendo reunidos de 18 provadores apreciadores de suco de umbu. Utilizando a Tabela de Newell e Mac Farlene (NEWELL & MAC FARLANE, 1987), com os parâmetros de 18 provadores e 3 amostras, foram comparados os somatórios das respostas dos provadores, devendo ter a diferença entre as amostras de pelo menos 15 para que seja considerado como havendo diferença significativa entre as amostras ($p \leq 0,05$).

Tabela 6. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo COR.

Cor		Amostras		
		A	B	C
Somatório ¹		52	36	32
A	52	-	16*	20*
B	36	-	-	4
C	32	-	-	-

*Diferença significativa a $p \leq 0,05$.

¹Somatório realizado pela ordenação das respostas de preferência dos avaliadores, sendo considerado nota 3 para a primeira ordenação, 2 para a segunda opção de preferência e 1 para a amostra menos preferida.

Em se tratando do atributo cor, os provadores tiveram a preferência pela amostra A, com somatório de 52, e com diferença significativa em relação a amostra B e C (Tabela 6). Vale ressaltar que além da diferença da quantidade de polpa utilizada, o fato de ter a utilização do açúcar mascavo, influencia na cor da bebida apresentada. A amostra A, amostra otimizada, teve uma baixa concentração de açúcar sendo mais clara e com realçada cor da polpa, o que se tornou mais apreciável pelos provadores, como pode-se observar na Tabela 6.

O primeiro contato do consumidor com um produto, geralmente, é através do impacto visual, onde se destacam a coloração e a aparência, que, de uma certa forma, se tratam de atribuições que resultam em uma resposta já esperada, sendo associadas às reações pessoais de aceitação, indiferença ou rejeição (TEIXEIRA, 2009). Alguns dos provadores mencionaram sobre o impacto da coloração, relatando que a amostra A continha a coloração que mais se assemelhava ao suco de umbu.

Tabela 7. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo AROMA.

Aroma		Amostras		
		A	B	C
Somatório¹		42	37	41
A	42	-	5	1
B	37	-	-	4
C	41	-	-	-

¹Somatório realizado pela ordenação das respostas de preferência dos avaliadores, sendo considerado nota 3 para a primeira ordenação, 2 para a segunda opção de preferência e 1 para a amostra menos preferida .

De acordo com a análise dos consumidores, o aroma (Tabela 7) não apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre as formulações avaliadas, mesmo com a variação de polpa e açúcar.

O acetaldeído é um dos principais compostos aromáticos encontrados no kefir com concentrações variando de 0,5 a 10 mgL⁻¹ (GUZEL-SEYDIM et al., 2000). Além disso, também é encontrado diacetil, responsável pelo aroma amanteigado, considerado um importante composto aromático do kefir, sendo sua expressão diretamente influenciada pela temperatura de armazenamento (BESHKOVA et al., 2003; GUZELSEYDIM et al., 2000; SCHWAN et al., 2015). Tal composto aromático foi encontrado em diferentes concentrações (0,30 mg.L⁻¹ a 1,85 mg.L⁻¹) em bebidas de kefir (BESHKOVA et al., 2003; AGHLARA et al., 2009).

Ainda, podemos encontrar odor proveniente do etanol formado pela conversão do acetaldeído em etanol pela enzima álcool-desidrogenase, presente tanto em leveduras quanto em bactérias ácido lácticas (GUZEL-SEYDIM et al., 2000). A concentração de etanol do kefir tende a variar de 0,01 a 2,5% (m/v), dependendo do iniciador e método de preparo do kefir (BESHKOVA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2011c; PUERARI et al., 2012). O acetaldeído é considerado o composto responsável pelo aroma característico do iogurte, pois é responsável pela nota de “fruta fresca” (GARROTE et al., 2001; OTT et al., 2002).

A Tabela 8 representa as respostas da aplicação do teste de aceitação considerando o atributo ‘Sabor’. Estatisticamente, houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras A e C. É notório a apreciação da amostra C, devido ao maior valor do somatório. A amostra C se refere ao ensaio 6, com 50% de polpa e 12% de açúcar. Na verificação das anotações, alguns dos provadores comentaram que se a amostra B (ensaio 4) tivesse com maior intensidade de doçura, teria sido a preferida.

Tabela 8. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo SABOR.

Sabor		Amostras		
		A	B	C
Somatório ¹		31	41	48
A	31	-	10	17*
B	41	-	-	7
C	48	-	-	-

*Diferença significativa a $p \leq 0,05$.

¹Somatório realizado pela ordenação das respostas de preferência dos avaliadores, sendo considerado nota 3 para a primeira ordenação, 2 para a segunda opção de preferência e 1 para a amostra menos preferida.

Almeida et al (2011) estudaram a resposta sensorial de kefir de leite e kefir de leite de cabra com 50 provadores não treinados e observou que a acidez e a viscosidade influenciava nas respostas dos avaliadores, onde 40% dos provadores se identificou com a escala hedônica “gostou muito” da bebida fermentada de leite, 36% “gostou muito” e 16% “desgostou muito” do leite de cabra, sendo este o leite com maior acidez e menor quantidade de caseína da fração α_{S1} , influenciando na viscosidade. Como a polpa de umbu possui caráter ácido, a quantidade de polpa pode ter interferido nas respostas obtidas pelos provadores dando a preferência pela formulação C (50% de polpa e 12% de açúcar), além do fato das formulações A e B terem menos quantidade de açúcar e maiores quantidades de polpa interferindo na viscosidade do produto final (75% e 85% de polpa e 6% e 10,84% de açúcar, respectivamente).

A Tabela 9 representa as respostas da aplicação do teste de preferência considerando o atributo ‘Doçura’. Estatisticamente, tal parâmetro teve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as amostras A e C e também entre as amostras B e C.

Tabela 9. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo DOÇURA.

		Amostras		
		A	B	C
	Doçura			
	Somatório¹	27	38	55
A	27	-	11	28*
B	38	-	-	17*
C	55	-	-	-

*Diferença significativa a $p \leq 0,05$.

¹Somatório realizado pela ordenação das respostas de preferência dos avaliadores, sendo considerado nota 3 para a primeira ordenação, 2 para a segunda opção de preferência e 1 para a amostra menos preferida.

A doçura é um dos atributos sensoriais ligados ao valor da relação entre os sólidos solúveis e a acidez titulável, representando a concentração de açúcares e ácidos orgânicos presentes nas frutas e seus produtos processado (CECHI, 2007; OLIVEIRA et al., 2014). Os somatórios indicam que os provadores puderam identificar a variação da quantidade de polpa presente entre as amostras, dando preferência à formulação C, que continha 12% de adição de açúcares no momento da fermentação.

Os resultados da avaliação sensorial estudando o parâmetro ‘Aceitação Global’ está exposto na Tabela 10, onde mostra que houve diferença significativa entre as amostras A e C, tendo a maior preferência pela formulação C.

Tabela 10. Resultados da aplicação teste de aceitação para o atributo ACEITAÇÃO GLOBAL.

		Amostras		
		A	B	C
	Aceitação Global			
	Somatório¹	29	38	53
A	29	-	9	21*
B	38	-	-	12
C	53	-	-	-

*Diferença significativa a $p \leq 0,05$.

¹Somatório realizado pela ordenação das respostas de preferência dos avaliadores, sendo considerado nota 3 para a primeira ordenação, 2 para a segunda opção de preferência e 1 para a amostra menos preferida.

A aplicação do teste de intenção de compra com os 18 provadores resultou nas seguintes respostas: 11,11% preferiram a amostra A (média de 6 na escala hedônica de 9

pontos), 22,22% preferiram a amostra B (média de 8 na escala hedônica de 9 pontos) e 66,67% preferiram a amostra C (média de 7 na escala hedônica de 9 pontos).

Guimarães Tavares (2018) avaliou com 50 provadores não treinados a bebida fermentada de kefir de quinoa saborizada com cacau, obtendo uma aceitação global de 7,6 ($\pm 1,38$) de um total de 9 pontos, localizando-se entre os valores descritos na escala hedônica “gostei regularmente” e “gostei muito”. Montanuci & Garcia (2010) estudando o efeito do iniciador da fermentação (grãos de Kefir ou cultura starter), teor de gordura e inulina, obtendo aceitabilidade compreendida entre 6 e 7, indicando que os consumidores gostaram moderadamente das formulações.

No geral, a formulação C (50% de polpa e 12% de açúcar) foi a que obteve melhores respostas na aplicação sensorial, em se tratando de sabor, doçura e aceitação global, com maiores valores da somatória e tendo diferença significativa para os atributos doçura e aceitação global.

3.5. CONCLUSÕES

A formulação C composta por 50% de polpa e 12% de açúcar foi a que apresentou a maior preferência e intenção de compra pelos consumidores, entre as formulações selecionadas e avaliadas. Porém, há a necessidade de validação destas respostas, uma vez que houveram limitações de aplicação sensorial devido à pandemia do COVID-19.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHLARA, A., Mustafa, S., Manap, Y.A., Mohamad, R. Characterization of headspace volatile flavour compounds formed during kefir production: application of solid phase microextraction. **International Journal of Food Properties**, v.12, p.808-818, 2009.

ALMEIDA, F.A., Ângelo, F.F., Silva, S.L., Silva, S.L. Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 51-56, 2011.

ALVES, A. C. et al. Análise sensorial: uma revisão sobre os métodos sensoriais e aplicação dos testes afetivos em alimentos práticos para consumo. 2021.

AMARAL, A., SANTOS, E. N. F. Análise sensorial: testes discriminativos, descritivos e afetivos. **Anais do Seminário de Pesquisa e Inovação Tecnológica-SEPIT**, 2017.

BELIN, J.M. Microbial biosynthesis for the production of food flavours. **Trends of Food Science and Technology**, v.3 p.11-14, 1992.

BESHKOVA, D.M., Simova, E.D. Frengova, G.I., Simov, Z.I., Dimitrov, Z.H.P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. **International Dairy Journal**, v.13, p.529-535, 2003.

BESHKOVA, D.M., Simova, E.D., Simov, Z.I., Frengova, G.I., Spasov, Z.N. Pure cultures for making kefir. **Food Microbiology**, v.19, p.537-544, 2002

BENTO, R. A., Andrade, S.A.C., Silva, A.M.A.D. **Análise sensorial de Alimentos**. 2018.

CARMO, J. L. **Manual de boas práticas em análise sensorial** (Tese de Doutorado). 2018.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. [S.l.]: Editora da Unicamp, 2007

CHAVES, K. F., Wahanik, A. L., Paludo, M. C., Toledo, B. I., Leme, A. M. V., Orelli Junior, A. A., Behrens, J. H. Tetrad vs. triangle test: a case study with brazilian guarana soft drink. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 9, n. 4, p. 1-16, 20 mar. 2020.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos**. 3. ed. Curitiba, PR: Champagnat, 2011.

GARROTE, G.L., Abraham, A.G., De Antoni, G.L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.639-652, 2001.

GUERRERO, L. et al. Consumer attitude towards store brands. **Food Quality and Preference**, v. 11, n. 6, p. 387-395, 2000.

GUTIERREZ, E. M. R., Zibordi, G., De Souza, M. C. Avaliação físico-química e sensorial de leites fermentados probióticos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 384, p. 22-29, 2012.

GUZEL-SEYDIM, Z.B., Seydin, A.C., Greene, A.K., Bodine, A.B. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.13, p.35-43, 2000

HOUGH, G. **Sensory Shelf Life: Estimation of Food Products**, 2010.

LAWLESS, H. T., Heymann, H. **Sensory evaluation of food: principles and practices**. New York: Springer, 2013.

LIMA, D. S., Egea, M. B., Cabassa, I. C. C., Almeida, A. B., Sousa, T. L., Lima, T. M., Loss, R. A., Volp, A. C. P., Vasconcelos, L. G., Dall'oglio, E. L. Technological quality and sensory acceptability of nutritive bars produced with Brazil nut and baru almond coproducts. **Lwt**, [S.L.], v. 137, p. 110467, fev. 2021.

LONGO, G. Influencia na adição de lactase na produção de iogurtes. 2006. (Dissertação de Mestrado), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2006

MAGALHÃES, K.T., Dias, D.R., Pereira, G.V.M., Oliveira, J.M., Domingues, L., Teixeira, J.A., Silva, J.B.A., Schwan, R.F. Chemical composition and sensory Analysis of cheese whey – based beverage using kefir grains as starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, p.871-878, 2011a.

MAGALHÃES, K.T., Dragone, G., Pereira, G.V.M., Oliveira, J.M., Domingues, L., Teixeira, J.A., Silva, J.B.A., Schwan, R.F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compounds during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v.126, p.249-253, 2011b.

MAGALHÃES, K.T., Pereira, G.V.M., Campos, C.R., Dragone, G., Schwan, R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.693-702, 2011c.

MAGALHÃES, K.T., Pereira, M.A., Nicolau, A., Domingues, L., Teixeira, J.A., Silva, J.B.A., Schwan, R.F. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v.101, p.8843-8850, 2010

MEILGAARD, M. C., Carr, B. T., Civille, G.V. **Sensory evaluation techniques**. CRC press, 1999.

MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de Avaliação sensorial**. 2. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, CEPPA, p. 101. 1984.

MONTOUTO-GRANA, M., Cabanas-Arias, S., Porto-Fojo, S., Vázquezodériz, M. L., Romero-Rodríguez, M. A. Sensory Characteristics and Consumer Acceptance and Purchase Intention Toward Fresh-Cut Potatoes. **Journal Of Food Science**, [S.L.], v. 77, n. 1, p. 40-46, 10 nov. 2011.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 6. ed. Campinas: Editora da Unicamp, p. 93. 1988.

NEWELL, G. J., Macfarlane, J. D. Expanded tables for multiple comparison procedures in the analysis of ranked data. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 6, p. 1721-1725, 1987.

NORA, F.M.D. **Análise sensorial clássica [livro eletrônico]: fundamentos e métodos**. Canoas, RS: Mérida Publishers, 2021.

OLIVEIRA, E. N. A. D. et al. Estabilidade de geleias convencionais de umbu-cajá durante o armazenamento em condições ambientais. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas Grande, v. 18, n. 3, p. 329-337, 2014.

O'SULLIVAN, M. G. **Sensory Affective (Hedonic) Testing**. A Handbook For Sensory And Consumer-Driven New Product Development, [S.L.], p. 39-57, 2017.

OTT, A.; GERMOND, J.E.; CHAINTREAU, A. Origin of acetaldehyde production by *Streptococcus thermophilus*. **Applied Environment Microbiology**, v.68, p.5656-5662, 2002.

ROSA, J. M. A., Pinheiro, I.R. Planejamento Experimental DCCR aplicando a Hidrólise Enzimática do bagaço de Laranja empregando as enzimas Celulases e Pectinases. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 3191-3208, 2021.

SALMERÓN, I., Thomas, K., Pandiella, S. S. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 106-115, 2015.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 3rd ed. Food Science and technology. International series, 2004.

SCHAWN, Rosane Freitas; MAGALHÃES-GUEDES, Karina Teixeira; DIAS, Disney Ribeiro. Kefir-grains and beverages: a review. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2015.

TEIXEIRA, E. Meinert, E. M., Barbeta, P. A. **Análise sensorial de alimentos**. Florianópolis: Ed. da UFSC, p. 180. 1987.

TIREKI, S. A review on packed non-alcoholic beverages: ingredients, production, trends and future opportunities for functional product development. **Trends In Food Science & Technology**, [S.L.], v. 112, p. 442-454, jun. 2021.

YANG, J., Lee, J. Application of Sensory Descriptive Analysis and Consumer Studies to Investigate Traditional and Authentic Foods: a review. **Foods**, [S.L.], v. 8, n. 2, p. 54-71, 2 fev. 2019

CAPÍTULO 4 - VIABILIDADE DAS CULTURAS PROBIÓTICAS DURANTE O PERÍODO DE ARMAZENAMENTO

4.1. INTRODUÇÃO

O lançamento de uma bebida fermentada de umbu com grãos de kefir deve não somente ser bem aceita pelos consumidores no momento em que é produzida, mas também apresentar uma boa estabilidade de suas propriedades qualitativas e microbiológicas ao longo do armazenamento. Estudos anteriores mostram que a viabilidade de bebidas fermentadas como o kefir diminui drasticamente durante o armazenamento devido à exposição aos fatores ambientais prejudiciais assim como devido ao acúmulo de ácidos orgânicos, íons hidrogênio, oxigênio molecular e componentes antibióticos (GILLILAND e SPECK, 1977; HAMILTON-MILLER, 1999; WANA et al., 1993; LANKAPUTHRA e SHAH, 1995; SHAH et al., 1995; DAVE e SHAH, 1996; DAVE e SHAH, 1997; KAILASAPATHY e RYBKA, 1997; SHAH e LANKAPUTHRA, 1997; KEBARY et al., 1998; BEAL et al., 1999; GARDINI et al., 1999; HAMILTON-MILLER et al., 1999; SCHILLINGER, 1999; VINDEROLA et al., 2000; SULTANA et al., 2000; MORTAZAVIAN et al., 2006).

Os efeitos benéficos dos microrganismos probióticos aparecem quando eles, após sobreviverem às condições desfavoráveis, chegam ao intestino viáveis e em quantidade suficientemente alta para atuarem no meio (GILLILAND, 1989). Com isso, estipula-se que haja uma quantidade mínima de células probióticas (UFC/g) no produto no momento de consumo, possibilitando a ocorrência dos efeitos benéficos esperados (preventivo ou terapêutico) dos probióticos, sendo representado pelo mínimo do índice “bio-value” (MORTAZAVIAN et al., 2006).

De acordo com a recomendação da “International Dairy Federation (IDF)” o índice deve estar igual ou acima de 10^7 UFC/g (OUWEHAND e SALMINEN, 1998). Em alguns países, como Argentina e Brasil, este valor deve estar igual ou acima de 10^6 UFC/g no caso de bifidobactérias. Já no Japão, este padrão tem sido apresentado como sendo acima de 10^7 UFC/g (ROBINSON, 1987).

Outras recomendações têm sido apresentadas para outros produtos com índice acima de 10^6 UFC/g para todos os probióticos presentes em iogurtes (ROBINSON, 1987;

KURMAN e RASIC, 1991) e acima de 10^7 UFC/g no caso de bifidobactérias (HOLCOMB et al., 1991). O índice denominado ID ("*intakedaily*") é utilizado para determinar o potencial ou efetividade probiótica de cada produto alimentar. A quantidade mínima deste índice tem sido recomendada com aproximadamente 10^9 células viáveis por dia (SHAH et al., 1995; KURMAN e RASIC, 1991; MORTAZAVIAN, 2006).

Cepas probióticas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* vem sendo consideradas seguras para o seu consumo, sendo consideradas GRAS (General Recognized as Safe) (SAAD et al., 2011). No caso das leveduras, a capacidade de aglutinar patógenos, resistir ao pH ácido e aos sais biliares do trato gastrointestinal estão entre os mais importantes critérios para sua pré-seleção como probióticos (GARCÍAHERNÁNDEZ et al., 2012).

A perda de viabilidade dos probióticos em produtos alimentares (especialmente fermentados) e em condições ácidas da bile do trato gastrointestinal tem estimulado pesquisadores a encontrar novos métodos eficientes que mantenham a viabilidade (PEREIRA, 2012). Desta forma, torna-se importante o estudo da viabilidade dos microrganismos de característica probiótica presentes no produto elaborado, ao longo do tempo de armazenamento, além de acompanhar a estabilidade dos compostos bioativos e características físico-químicas.

4.2. OBJETIVO

Avaliar a viabilidade das culturas probióticas utilizadas na produção de bebida fermentada a base de umbu com grãos de kefir durante o armazenamento, conjuntamente com a estabilidade dos compostos bioativos e características físico-químicas.

4.3. MATERIAIS E MÉTODOS

A formulação contendo 50% de polpa e 12% de açúcar mascavo foi elaborada e realizada a fermentação com os grãos de kefir (24h a $25 \pm 1^\circ\text{C}$). Após a fermentação, a solução foi filtrada e o sobrenadante reservado para a maturação (24h a $8 \pm 1^\circ\text{C}$) em refrigerador, sendo utilizados frascos âmbar de 200ml para a deposição do produto preparado.

As análises foram realizadas a cada 7 dias, até completar 28 dias de armazenamento em refrigeração ($8 \pm 1^\circ\text{C}$). As mesmas foram executadas no

Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Sergipe, seguindo os protocolos de segurança impostos para evitar a contaminação da COVID-19.

4.3.1. Análises físico-químicas

4.3.1.1. Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada de acordo com a metodologia 312/IV descrita por Adolfo Lutz (2008), onde foram medidos 2,5mL da amostra – em um balão de 25mL – e aferida com água destilada. Para titulação, foi adicionado 3 gotas de fenolftaleína 1% e titulado com solução de hidróxido de sódio 0,1M, sob agitação constante, até que a coloração rósea persistisse por, pelo menos, 30 segundos.

O cálculo da acidez foi realizado utilizando-se a Equação 1, tendo os resultados expressos em g de ácido láctico/100mL da bebida fermentada.

$$\frac{V \times f \times M \times PM}{10 \times P \times n} = \text{g de ácido láctico/100ml} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: V = volume da solução de NaOH gasto na titulação (ml)

f = fator de correção da solução de NaOH

M = molaridade da solução de NaOH

PM = peso molecular de ácido cítrico (PM=90)

P = massa da amostra (g)

n = número de hidrogênios ionizáveis (N=1).

4.3.1.2. Análise de sólidos solúveis

A análise de sólidos solúveis foi realizada pela medição de seu índice de refração por comparação com tabelas de referência, de acordo com as normas analíticas do IAL, utilizando a metodologia 315/IV Frutas e produtos de frutas – Determinação de sólidos solúveis por refratometria. A amostra homogeneizada foi transferida para o prisma do refratômetro digital (HI 96801), previamente calibrado e feita a leitura diretamente na escala dos graus brix (IAL, 2008).

4.3.1.3. Potencial hidrogeniônico (pH)

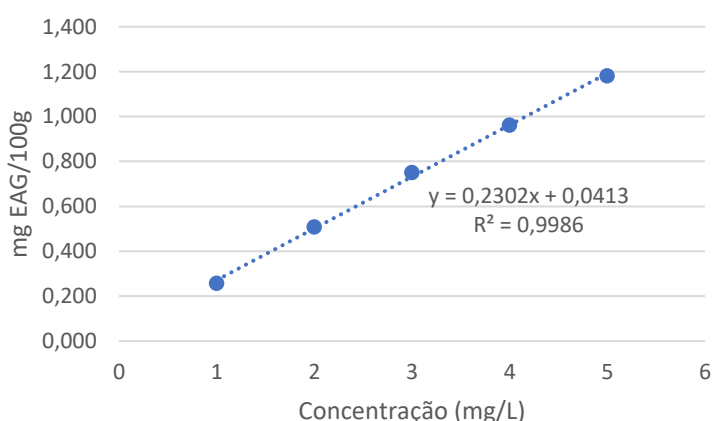
A análise de pH foi realizada pelo método de determinação direta, através de medição pelo potenciômetro diretamente na amostra, de acordo com as normas analíticas do IAL, utilizando a metodologia 017/IV Determinação do pH. Foram medidos 2,5mL da amostra, diluídas com auxílio de 25ml de água, homogeneizadas e o pH foi determinado utilizando pHmetro (Marca: Hanna), previamente calibrado com soluções tampão 4,0 e 7,0 (IAL, 2008).

4.3.2. Análise de compostos bioativos

4.3.2.1. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin Ciocateau utilizando ácido gálico como padrão de referência, de acordo com Singleton e Rossi, (1965), onde primeiramente foram preparadas as soluções de ácido gálico (5mg de ácido/100ml) e carbonato de sódio (7,5mg de carbonato/100ml) e realizada a curva de calibração. Em seguida, as amostras foram analisadas utilizando 50 µL de extrato na diluição 1:8, 3,95ml de água, 0,25m da solução de Folin Ciocateau (10%) e 0,75ml de carbonato de sódio. Foi homogeneizado e incubado no escuro por 2 horas. Após o período de incubação foi lido no espectro com comprimento de onda de 750 nm. Onde os resultados foram expressos em mg EAG/100g.

Figura 18. Curva padrão de ácido gálico

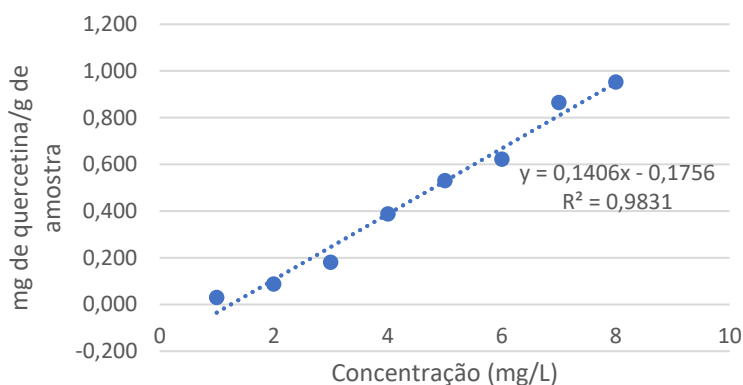


4.3.2.2. Flavonoides totais

Os teores de flavonoides foram analisados seguindo a metodologia proposta por Boroski et al. (2015), com modificações. O procedimento consistiu na adição de 500µL de extrato, o qual foi preparado com metanol P.A., em 250µL de cloreto de alumínio 5% em metanol (v/v) e 4,25ml de metanol P.A. O preparado foi homogeneizado em vórtex e mantido a temperatura ambiente por 30 min. Após o tempo de descanso da solução, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Rayleigh modelo UV-2601) com absorbância em 425 nm. O branco foi analisado substituindo a quantidade de adição de extrato por metanol P.A. Os resultados foram expressos em mg/L.

Utilizou-se como padrão a quercetina nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, e 150 mg/L para a construção da curva de calibração. A partir da equação da reta obtida, realizou-se o cálculo do teor de flavonoides, expresso em mg de quercetina/g de amostra.

Figura 19. Curva padrão de quercetina



4.3.2.3. Carotenoides totais

O teor de carotenoides foi determinado conforme o método descrito por Lichtenthaler et al. (1987), pesando 2 g da amostra e 0,2 g de carbonato de cálcio. Então, em cada amostra foi adicionado 7 ml de acetona a 80 %. Em seguida, cada amostra foi filtrada diretamente em balão volumétrico âmbar de 25 ml. O resíduo do papel de filtro foi lavado 2 vezes com acetona a 80% e o volume completado com acetona a 80%. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm. Os resultados foram calculados de acordo com as normas recomendadas pela metodologia utilizada e expressos em µg/100 ml de β-caroteno.

4.3.3. Análises de microrganismos probióticos

4.3.3.1. Contagem de Leveduras

Para a pesquisa de leveduras utilizou-se o meio seletivo GYP (Glucose YeastPeptone Agar): glucose 20 g/L (Copam, Portugal), extrato de levedura 5 g/L (BiokarDiagnostics, França), peptona 5 g/L (BiokarDiagnostics, França), agar 20 g/L (Hispanagar, Espanha), um anti-fungico, bifenil (Sigma-Aldrich, EUA) 0,08 g/L e um antibiótico, cloranfenicol (Sigma-Aldrich, EUA) 0,1 g/L, de forma a inibir o crescimento de fungos filamentosos e bactérias, respetivamente. As condições de incubação estão apresentadas na tabela 11.

4.3.3.2. Contagem de Bactérias Lácticas

A Contagem de Bactérias Lácticas objetivou-se verificar a viabilidade dos microrganismos probióticos presentes na bebida fermentada. Essas foram realizadas em triplicata no Laboratório de Análises Microbiológicas do departamento de tecnologia de alimentos da Universidade Federal de Sergipe utilizando o *Lactobacillus* MRS Agar (Himedia, Mumbai, Índia), segundo a metodologia descrita por SILVA, et al (2010). As amostras de 25mL foram diluídas em 225 ml água peptonada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Para contagem de BAL foi utilizado o Ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe), realizando o plaqueamentopourplate, sendo as placas incubadas invertidas em jaras de anaerobiose (Probac, São Paulo-Brasil) a 30°C por 72 horas (SILVA et al., 2010).

O período de armazenamento para a viabilidade da bebida fermentada foram: 0,7, 14, 21 e 28, na temperatura de $8 \pm 1^{\circ}\text{C}$ em geladeira Frost Free Eletrolux, modelo DF 50/157 e utilizada estufa para incubação a 37°C .

4.3.3.3. Contagem de Bactérias Ácido Acéticas

Para a seleção de bactérias acéticas, foi utilizado o meio GYC (Glucose YeastExtractCarbonate) glucose 5 g/L, extrato de levedura 1 g/L, carbonato de cálcio [Merck, Alemanha] 3 g/L, ágar 20 g/L).As condições de incubação estão apresentadas na tabela 12.

Tabela 11. Meios utilizadas e as respectivas condições de incubação.

Meio	Período de Incubação	Temperatura	Condições
GYP	2 dias	25°C	Aerobiose
MRS	5 dias	30°C	Anaerobiose/ Microaerofília
GYC	5 dias	30°C	Aerobiose

4.3.4. Análises microrganismos patogênicos

4.3.4.1. Análise de coliformes totais e termotolerantes

As amostras de 25mL foram diluídas em 225 ml água peptonada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). O teste presuntivo foi realizado em série de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), incubado em estufa da 35°C por 48 horas. Os tubos com caldo que apresentarem crescimento positivo foram semeados com o auxílio de uma alça de platina previamente flambada em Caldo Verde Brilhante Bile (VB) com tubos de Durhan e incubados a 35°C, durante 48 horas, para a confirmação de coliformes totais, e para coliformes termotolerantes o processo semelhante, semeando-se em Caldo de E. cole (EC), sendo incubado em banho-maria a uma temperatura de $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 24 horas (SILVA et al., 1997).

4.3.4.2. Contagem de bolores e leveduras

As amostras de 25mL foram diluídas em 225 ml água peptonada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Uma alíquota de 0,1 ml foi transferida para a placa de Petri com Agar Extrato de Levedura Glicose Cloranfenicol (YEGC), e incubadas na BOD a 25°C por 5 dias. As contagens das colônias foram realizadas de forma ocular e as colônias expressas em UFC/ml.

4.3.5. Análise estatística

Os resultados obtidos no acompanhamento dos parâmetros físico-químicos, de compostos bioativos e viabilidade dos microrganismos probióticos foram analisados utilizando o Software SISVAR versão 5.6 (Copyright © 2015 by Daniel Furtado Ferreira) com nível de significância de 5%, com as referidas validações.

4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas a cada 7 dias, utilizando amostras independentes para cada momento de avaliação. Os resultados estão expressos nas Figuras 20 a 22. A tabela 12 apresenta os resultados estatísticos das análises físico-químicas, com a auxílio do programa estatístico SISVAR 5.6.

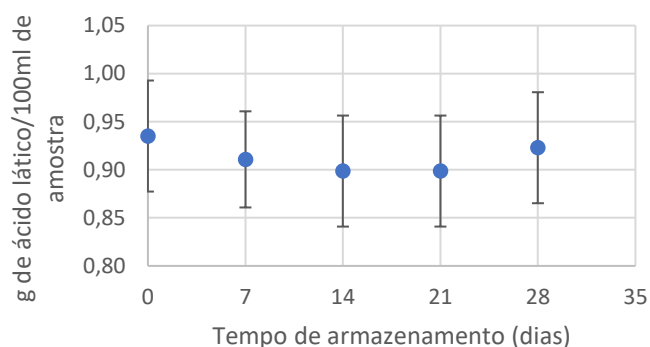
Tabela 12 Resultado dos parâmetros físico-químicos analisados durante 28 dias de armazenamento a 8°C.

DIAS	Acidez Titulável (g de ácido	Sólidos	Potencial
	lático/100ml de amostra)	Solúveis (°Brix)	Hidrogeniônico
0	0,94 ^a	12,47 ^a	3,54 ^a
7	0,93 ^a	11,97 ^a	3,11 ^b
14	0,92 ^a	11,53 ^a	3,21 ^c
21	0,91 ^a	11,10 ^a	3,39 ^d
28	0,92 ^a	11,23 ^a	3,34 ^e

*Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A acidez titulável não apresentou diferença significativa, mantendo-se estável ao longo do armazenamento ($p < 0,05$). Comportamentos semelhantes foram obtidos por Oliveira (2018), analisado a viabilidade dos microrganismos presentes no kefir de leite obtido com diferentes concentrações de mel como prebiótico, sendo que a acidez titulável apresentou uma variação de 4,13 a 3,38 g de ácido lático/100ml do produto ao longo de 21 dias a 8°C.

Figura 20. Acidez titulável (g de ácido láctico/100ml de amostra) da bebida fermentada de umbu com grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.



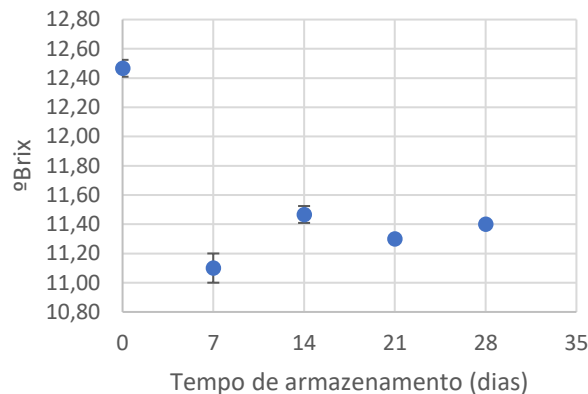
Estudos anteriores mostram que a acidez titulável de kefir pode variar de 0,80 a 1,15% (m/v) (GARROTE et al, 2001). Outros estudos mostram que a acidez titulável encontrada na bebida fermentada pode aumentar com o tempo de armazenamento, passando de 1,27 para 1,48% de ácido láctico após 28 dias (Contim et al., 2018), sendo esta acidez acentuada proveniente da polpa de graviola.

Os valores de acidez estudados por Leite et al. (2013), em kefir fermentado em leite após as 24 horas de fermentação até 28 dias de armazenamento, apresentaram comportamento semelhante, verificando que os valores de acidez aumentaram durante o armazenamento. Nas primeiras 24 horas após a fermentação, a produção de ácido láctico foi de 7,38 mg/L, enquanto que no final do período de 28 dias, a produção de ácido láctico foi de 9,54 mg/L. Junior et al (2018) também relataram aumento nos valores de acidez titulável ao longo de 28 dias de armazenamento (de 0,42 a 1,02 g de ácido láctico/10ml de kefir com 2% de yacon), salientando que a acidez se torna um fator determinante para a aceitação dos consumidores, não sendo desejável produtos com característica muito ácida.

Assim como a acidez, o teor de sólidos solúveis não obteve diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento (Figura 21). Os resultados apresentados na Figura 21 mostram uma acentuada queda nos teores de sólidos solúveis nos primeiros 7 dias de armazenamento. Sabe-se que os microrganismos utilizam dos carboidratos presentes na solução como meio de aquisição de energia para o seu metabolismo, porém os grãos foram retirados nas primeiras 24h de preparação da bebida (período de fermentação) (CARVALHO, 2016). Sendo assim, esta resposta pode ter sido apresentada pelas alterações provenientes da polpa. Conceição et al (2014) avaliou o armazenamento da

polpa de umbu com diferentes condições de processamento e observou que houve a redução dos teores de sólidos solúveis, possivelmente devido a atividade metabólica acelerada causada pelos danos aos tecidos.

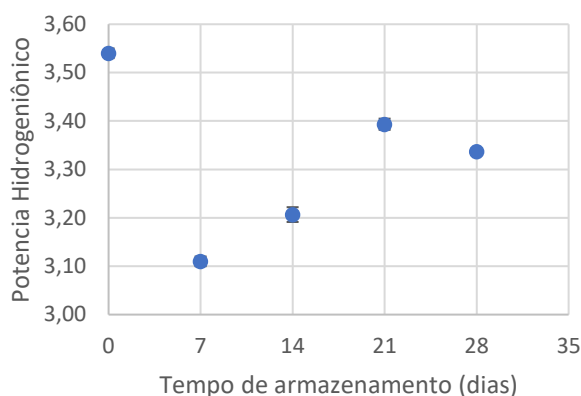
Figura 21. Teor de sólidos solúveis da bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.



As mudanças no pH e acidez estão relacionadas com a formação de compostos orgânicos, como o ácido lático e o acético durante a fermentação, capazes de conferir proteção antimicrobiana ao produto (Farnworth, 2005). De acordo com os resultados obtidos, em todos os dias de avaliações houveram diferenças significativas ($p < 0,05$) para o pH da bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir (Figura 22).

Os valores encontrados na atual pesquisa foram menores que os dos valores citados na literatura para kefir tradicional, que se encontram na faixa de 4,2 e 4,6 ao final da fermentação, fato este que pode ter ocorrido pela adição da polpa de umbu, cujo pH se encontrava em 2,85 (MONTANUCI et al., 2010; OTLES & CAGINDI, 2003). Resultado este semelhante ao observado por Costa et al (2018), no qual após adição de 20% de geleia de amora-preta o pH passou de 5,13 para 4,73, em razão da presença de ácidos nas polpas de frutas.

Figura 22. pH da bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.



Sabe-se que a fase de maior mudança no pH e acidez é decorrente das primeiras 24h de fermentação, sendo que no decorrer do tempo de armazenamento também há pequenas alterações nestes parâmetros devido a formação de compostos orgânicos (FARNWORTH, 2005; GUIMARÃES TAVARES, 2018). Porém, como é notório neste trabalho (Figura 22), os valores de pH e acidez tiveram um acentuado decréscimo e posteriormente um acréscimo, podendo ser explicado devido a presença de leveduras que produzem substância com capacidade tamponante (IRIGOYEN et al., 2005). Além disso, Lima (2016) estudou as características físico-químicas de umbu e obteve resultados semelhantes com relação ao aumento do pH no decorrer de 90 dias de armazenamento. Assim sendo, a utilização da polpa de umbu pôde ter contribuído para os resultados de pH observados nos dias 7 a 21 (Figura 22).

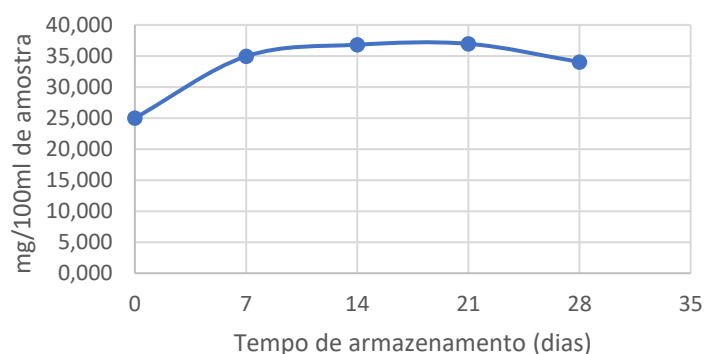
4.4.2. Análise de compostos bioativos

Os estudos dos compostos bioativos são importantes para apresentar as potencialidades das propriedades dos alimentos e incentivar sua introdução na alimentação. Assim sendo, foram realizadas as análises de dos compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides presentes na bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir, tendo seus resultados apresentados nas Figuras 23 a 25.

Os compostos fenólicos são responsáveis pela alta capacidade antioxidante do produto (LIMA, 2016). Tais compostos estão presentes naturalmente em muitas frutas e seus derivados, possuindo comprovada a atividade antioxidante e antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (AHERNE; O'BRIEN, 2002; CASSIDY, 2018).

Os teores de compostos bioativos analisados na bebida fermentada apresentaram maiores valores aos 0 e 7 dias de armazenamento (de 25 a 35 mg/100ml do fermentado), se mantendo constante até 21 dias, seguido pela sua redução (Figura 23). Lopusiewicz et al. (2019) obtiveram resultados semelhantes utilizando extratos vegetais obtidos a partir do óleo de linhaça e fermentados com grãos de kefir, onde ocorreu a estabilidade compostos fenólicos, flavonoides e da microbiota do fermentado, no período de 21 dias.

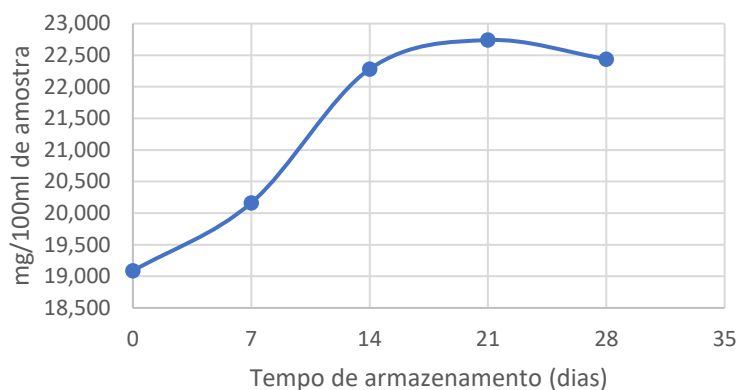
Figura 23. Compostos fenólicos totais em bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.



Os teores de compostos fenólicos encontrados foram inferiores aos observados por Randazzo et al. (2016) em bebidas fermentadas com kefir adicionado de sucos de frutas, onde foram observados valores de compostos fenólicos totais de 176,4 mg/L para kefir com suco de maçã e 61,69 mg/L para kefir com suco de uva.

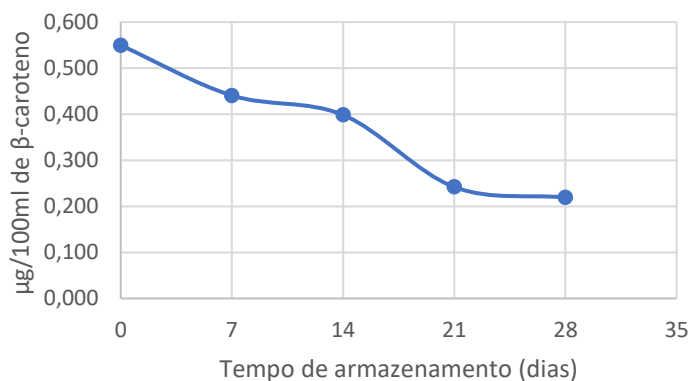
Os teores de flavonoides tiveram seu comportamento crescente até 21 dias de armazenamento, passando de 19,086 mg/100ml a 22,739 mg/100ml de amostra (Figura 24). Lopusiewicz et al. (2019) encontraram teores de flavonoides de 13,68 a 16,27 mg/ml, aos 0 e 21 dias de armazenamento a 6 °C. Apesar de poucos estudos terem avaliado o comportamento de flavonoides em bebidas de kefir, os microrganismos presentes nestas bebidas apresentam capacidade de síntese destes compostos (COUTINHO et al, 2009; LOPEZ et al., 2010). Neste estudo, os resultados mostram que os teores de flavonoides no produto final, bem como ao longo do armazenamento, são definidos pelos teores presentes na polpa do umbu somados aos teores de flavonoides sintetizados pelos microrganismos, tornando a bebida mais atraente aos consumidores.

Figura 24. Flavonoides em bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.



As respostas das análises de carotenoides estão representados na Figura 25, onde retrata que ao longo dos 28 dias de armazenamento a 8°C os carotenoides foram sofrendo degradação, passando de 0,550 a 0,219 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ de β -caroteno. Dos Santos Cavararo et al (2018) estudou os teores de carotenoides em kefir, geleia de goiaba e kefir com geleia de goiaba, tendo os maiores teores na geleia (12,69mg/100g) do que no kefir (6,75 mg/100g), e valores intermediários no kefir com geleia de goiaba (10,13mg/100g).

Figura 25. Carotenoides em bebida fermentada de umbu utilizando grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a 8°C.



Este comportamento pode ser explicado pela cinética de degradação dos carotenoides. Ferreira & Rodriguez-Amaya (2008), ao estudarem a degradação do licopeno e do β -caroteno em sistemas modelo de baixa umidade e aquoso na presença e ausência de luz, e explicitaram que a degradação dos carotenoides seguiu uma cinética de primeira ordem em todas as condições estudadas. Segundo Tsimidoube & Biliaderis (1997), a degradação dos carotenoides presentes em produtos aquosos, como o suco de umbu, segue o comportamento de uma reação de primeira ordem.

4.4.3. Análise de microrganismos probióticos

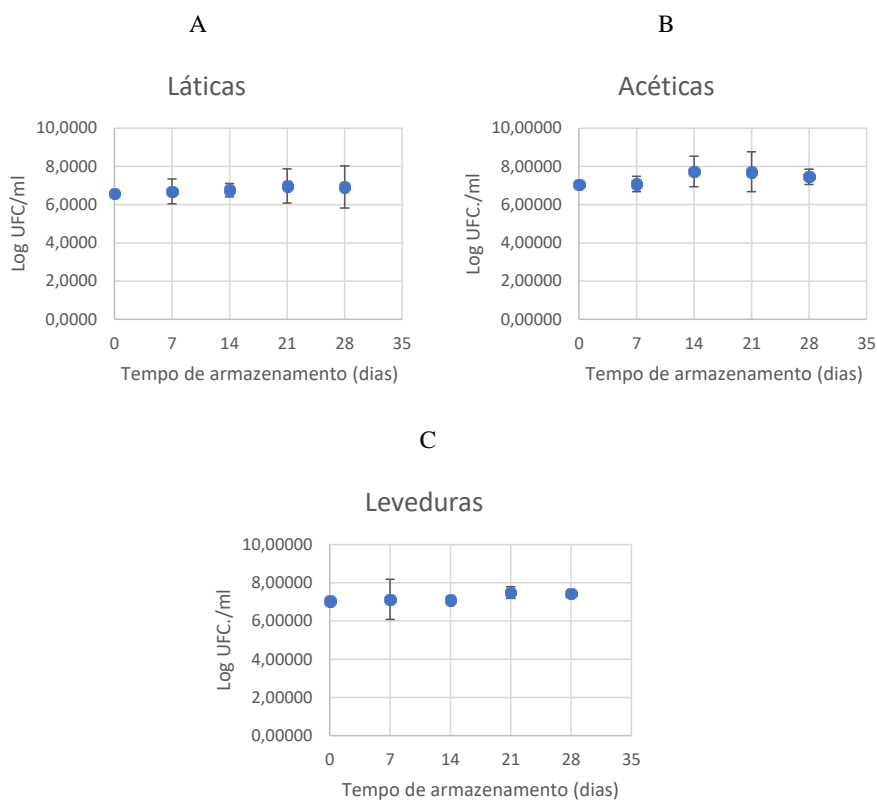
O comportamento dos microrganismos probióticos ao longo do armazenamento a $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 28 dias está apresentado na Tabela 13 e na Figura 26.

Tabela 13. Contagem dos microrganismos probióticos presentes na bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Dias de armazenamento	Láticas (log UFC/ml)	Acéticas (log UFC/ml)	Leveduras (log UFC/ml)
0	6,56 ^{a*}	7,04 ^a	7,04 ^a
7	6,68 ^a	7,08 ^a	7,13 ^a
14	6,76 ^a	7,74 ^b	7,11 ^a
21	6,88 ^a	7,72 ^b	7,49 ^b
28	6,86 ^a	7,46 ^b	7,45 ^b

*Médias seguidas pela mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Figura 26. Contagem bactérias lácticas (A), acéticas (B) e leveduras (C) presentes na bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir durante 28 dias de armazenamento a $8^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.



De acordo com os resultados obtidos, a concentração de bactéria ácido láctica se mantiveram estáveis ($p < 0,05$) durante 28 dias de armazenamento, estando seus valores na faixa de 6,58 a 6,93 log UFC/ml (Figura 26A). A concentração de bactérias acéticas aumentou ($p < 0,05$) aos 14, 21 e 28 dias de armazenamento, estando seus valores na faixa de 7,04 a 7,74 log UFC/ml (Figura 26 B, Tabela 13).

A concentração de leveduras também apresentou um aumento ($p < 0,05$) aos 21 e 28 dias de armazenamento, estando seus valores na faixa de 7,04 a 7,49 log.UFC/ml (Figura 26 C, Tabela 13). Contin et al (2018) observaram resultados semelhantes em bebida fermentada de kefir de leite com polpa de graviola ao final de 28 dias de armazenamento, onde todos os grupos de microrganismos tiveram contagem em torno de 10^7 UFC/ml para todas as populações microbianas de bactérias ácido lácticas, acéticas e leveduras. Junior et al (2018), em estudo da bebida com polpa de yacon em kefir sabor morango, observaram que as leveduras aumentaram 1 ciclo log nos primeiros 14 dias e reduziram na mesma proporção até os 28 dias de armazenamento ($3,2 \times 10^{-5}$ / $3,2 \times 10^{-6}$ / $1,3 \times 10^{-5}$, respectivamente).

Este estudo obteve resultados superiores aos encontrados por Irigoyen et al. (2005), em se tratando de população de leveduras e bactérias acéticas de 10^5 e 10^6 UFC/ml, respectivamente. Porém, inferiores em se tratando de bactérias lácticas, as quais estiveram em torno de 10^8 UFC/ml. O mesmo relatou a redução de 1,5 a 2,0 ciclos log UFC/ml de bactérias ácido lácticas no período de 7 a 14 dias de armazenamento, enquanto as bactérias acéticas e leveduras permaneceram constantes por todo o período do experimento (28 dias). Apesar de não relatado pelo autor, podemos concluir que as possíveis razões para o decréscimo na concentração dos microrganismos, pode estar relacionado à natureza da matriz, influenciando no crescimento e atividade dos microrganismos presentes no kefir (CASSANEGO et al, 2015; WSZOLES et al., 2001; WITTHUHN et al., 2004).

Lopusiewicz et al. (2019) desenvolveram uma bebida fermentada de kefir de água a base de óleo de linhaça, obtendo populações semelhantes as registradas neste trabalho, com resultados da contagem das bactérias ácido lácticas compreendidas em torno de 10^7 UFC/ml e para leveduras de 10^6 UFC/ml. No entanto, valores mais altos foram relatados por Koh et al. (2017) (10^{12} UFC/ml e 10^9 UFC/ml para bactérias ácido lácticas e levedura,

respectivamente), os quais usaram purê de abóbora para desenvolver bebida semelhante ao kefir, complementando com açúcar mascavo.

Gonçalves et al. (2018) avaliaram a viabilidade de bactérias lácticas ao longo de 28 dias de armazenamento em fermentado de kefir com a adição de yacon, registrando a redução populacional dos microrganismos aos 14 primeiros dias, de 8,82 para 8,27 log UFC/g e no preparado controle (kefir fermentado no leite e sem adição do yacon), de 8,91 para 7,80 log UFC/g. Neste mesmo estudo, os resultados mostram que de 14 para 28 dias ocorre o aumento populacional de tais microrganismos.

Vale ressaltar que foi notória a presença de gases ao abrir os recipientes das amostras ao longo do armazenamento. Isto ocorre devido ao fato dos principais produtos finais da fermentação do kefir serem o ácido láctico, acetaldeído, etanol, acetoína, diacetil e dióxido de carbono (ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM, 2009; FERREIRA et al., 2010). Estes produtos são provenientes da relação simbiótica de bactérias ácido lácticas (BAL), ácido acéticas e leveduras (YANG et al., 2008; CASANEGO et al, 2015). Conforme Farnworth (2005), as leveduras fornecem nutrientes essenciais para o crescimento das bactérias ácido lácticas, tais como aminoácidos e vitaminas, resultando na liberação de metabólitos como etanol e CO₂.

4.4.4. Análise de microrganismos patogênicos

A contagem de coliformes mostrou a ausência de colônias em todas as diluições, estando de acordo com a legislação vigente, que estabelece no máximo de 10¹ NMP/g para coliformes a 35 °C e máximo de 10²UFC/g para coliformes a 45 °C (BRASIL, 2001).

A contagem de bolores e leveduras apresentou apenas colônias de leveduras, o que era de se esperar por se tratar de um produto que há presença de leveduras, porém houve ausência de colônias de bolores(CASSANEGO et al., 2015).

4.5. CONCLUSÕES

A bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir se mostrou capaz de manter as características de composição de compostos bioativos, em se tratando de compostos fenólicos e flavonoides, no decorrer dos 21 dias de armazenamento a 8°C. O teor de carotenoides diminuiu ao longo do armazenamento, passando de 0,550 a 0,219 µg/100ml de β-caroteno após 28 dias.

A bebida fermentada de umbu utilizando os grãos de kefir apresentou estabilidade para a concentração de microrganismos probióticos, permanecendo em torno de 6,76, 7,74 e 7,11 log UFC/ml para bactérias ácido lácticas, acéticas e leveduras, respectivamente. Podendo ser considerado como um produto com potencialidade probiótica.

Estudos futuros devem validar a análise sensorial da formulação selecionada no momento da produção e ao longo do armazenamento da bebida. Vale salientar que o processo de recuperação dos grãos de kefir se tornaram inviáveis pela retenção de fibras da polpa de umbu, sendo necessário um processo mais eficiente de filtração da polpa antes da utilização na fabricação da bebida fermentada.

Como requisito para rotulagem do produto final, há a necessidade de realizar a especificação da espécie dos microrganismos presentes na formulação. Podendo também aderir a utilização de culturas com certificação de espécie de cada linhagem presente nos grãos de kefir.

4.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL, A. Instrução normativa-IN No 28, de 26 de julho de 2018. Estabelece as listas de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília**, v. 2018, n. 2, 2018a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 243, de 26 de julho de 2018**. 144.ed. 2018b.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF**. Seção I, p. 45-53. 2001.

CARVALHO, I. T. **Microbiologia básica**. 2016.

CASSANEGO, D. B. et al. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**, v. 37, n. 5, p. 175-186, 2015.

DA CONCEIÇÃO, E. A. et al. Qualidade físico-química e microbiológica de polpa de umbu durante o armazenamento. In: **Embrapa Mandioca e Fruticultura-Resumo em**

anais de congresso (ALICE). In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 8., 2014, Cruz das Almas, Ba. Pesquisa: despertando mentes para a inovação e transformando o futuro:[anais]. Cruz das Almas, Ba, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2014., 2014.

DA COSTA, E. et al. Aspectos físico-químicos e funcionais de bebida látea fermentada com kefir enriquecida com amora-preta (RUBUS SP.). **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 2018.

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

DOS SANTOS CAVARARO, C. et al. Desenvolvimento e aceitação sensorial de kefir com geleia de goiaba e avaliação de compostos bioativos. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 13, n. 2, p. 503-515, 2018.

CONTIM, Luciana Silva Rocha; OLIVEIRA, Ila Maria Aguiar; NETO, José Cardoso. Avaliação microbiológica, físico-química e aceitação sensorial do kefir com polpa de graviola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 1, p. 1-9, 2018.

COUTINHO, M.A.S, MUZITANO, M. F., COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

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

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

FERREIRA, J. E. M.,Rodriguez-Amaya, D. B. Degradation of lycopene and beta-carotene in model systems and in lyophilized guava during ambient storage: kinetics, structure, and matrix effects. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 78, n. 8, p. 589-594, 2008.

FERREIRA, V. L. P. Princípios e aplicações da colorimetria em alimentos. Campinas: ITAL, 1981. 86p. GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and

concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 4, p. 1686- 1690, 2007.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 27-31, 2010.

GONÇALVES, I. F. et al. Efeito de yacon na aceitação sensorial de kefir e viabilidade de bactérias lácticas na bebida. **Vértices (Campos dos Goitacazes)**, v. 20, n. 2, p. 194-201, 2018.

GUIMARÃES TAVARES, Pedro Paulo Lordelo et al. Produção de bebida fermentada kefir de quinoa (*Chenopodium quinoa*) saborizada com cacau (*Theobroma cacao*) em pó. **Brazilian Journal of Agricultural Sciences/Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, 2018.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008.

IRIGOYEN, A. et al. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. , v. 90, n. 4, p. 613-620, 2005.

JUNIOR, S. M. et al. Avaliação do efeito de yacon em kefir sabor morango. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 2, p. 51-61, 2018.

KOH, W.Y., Utra, U., Rosma, A., Effarizah, M.E., Rosli, W.I.W., Park, Y.-H. Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: A response surface methodology approach. **Food Sci. Biotechnol.** 2017

LIMA, T.M.C. Qualidade e compostos bioativos de frutos de umbuzeiro cultivados sob o sistema orgânico e convencional. 2016.

LOPES, R.M. et al. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência& Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 18-22, 2010.

LOPUSIEWICZ, L, Drozłowska, E, Siedlecka, P, Mezynska, M, Bartkowiak, A, Sienkiewicz, M, Zielisnka-Blizniewska, H, Kwiatkowski, P. Development, characterization, and bioactivity of non-dairy kefir-like fermented beverage based on flaxseed oil cake. **Foods**, 8(544), 1-15, 2019.

MONTANUCI, F. D. et al. Caracterização sensorial e aceitação de Kefir adoçado integral e desnatado com inulina. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 6, p. 19-21, 2010.

PEREIRA, Beatriz Silva. Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado (Dissertação de mestrado). 2012. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/BUOS-98MHME>>.

RANDAZZO, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germana, M. A., Erten, H. y Settanni, L. (2016). Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology** 54, 40-51.

OLIVEIRA, T. L. Viabilidade de microrganismos presentes no kefir adicionado de mel e resistência às condições Gastrointestinais simuladas *in vitro*. (Tese de Doutorado). Instituto Federal de Educação. 2018

OTLES, S., Cagindi, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan journal of nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

SCHAWN, R. F., Magalhães-Guedes, K. T., Dias, D. R. Kefir-grains and beverages: a review. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 14, n. 1, p. 1-9, 2015.

TSIMIDOU, M., Biliaderis, G. C. Kinect studies of saffron (*Crocus sativus* L.) quality deterioration. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 8, p. 2890-2898, 1997.

WITTHUHN, R. C. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of Kefir grains. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 337-344, 2005.

WSZOLEK, M. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **LWT-Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

YANG, Z. et al. Symbiosis between microorganism from Kombucha and Kefir: Potential significance to the enhancement of kombucha function. **Applitive Biochemical and Biotechnology**, v. 107, p. 8361–8366. 2008.

YANG, Y. et al. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. **Journal of Archaeological Science**. v. 45, p. 178-186, 2014.