

**CENTRO ESTADUAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA PAULA
SOUZA**

**Etec TRAJANO CAMARGO
Ensino Médio Integrado ao Técnico em Química**

**Amanda Alves Pereira
Beatriz Baasch
Érica Fernanda da Silva**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE
LACTOBACILLUS KEFIR NA ELABORAÇÃO DE BEBIDAS LÁCTEAS**

**LIMEIRA-SP
2022**

**Amanda Alves Pereira
Beatriz Baasch
Érica Fernanda da Silva**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES E APLICAÇÃO DE
LACTOBACILLUS KEFIR NA ELABORAÇÃO DE BEBIDAS LÁCTEAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Técnico em Química da ETEC Trajano Camargo orientado pela Prof. Dra. Gislaine Aparecida Barana Delbianco e coorientado pela Prof. Jéssica Carolina Paschoal de Macedo, como requisito parcial para obtenção do título de técnico em química

**LIMEIRA-SP
2022**

AGRADECIMENTOS

Iniciamos esta parte, agradecendo primeiramente a Deus e dedicamos um agradecimento especial para nossos pais, avó, irmãos (ãs), tias e outros familiares que forneceram os meios para a realização deste trabalho e nos apoiaram e nos incentivaram a continuar nos momentos mais difíceis.

Agradecemos aos nossos professores da base técnica e da base nacional comum, por ter nos orientado e mostrado os melhores caminhos para realizar este projeto. Somos gratas a nossa orientadora Gislaine, que nos guiou, nos aconselhou e nos fez críticas constitutivas. Prestigiamos a nossa coorientadora Jéssica, que desde o momento em que começou a participar do nosso projeto, teve prazer em nos ajudar, estando disposta e sendo proativa em cada etapa do processo.

Somos agradecidas a Letícia, técnica responsável pelo laboratório, por nos assegurar os equipamentos, ceder o espaço do laboratório e nos orientar em nossas dúvidas.

Aos nossos amigos é gratificante reconhecer seu fundamental apoio em momentos que, mesmo realizando seus projetos, nos apoiaram e nos ajudaram de alguma forma. Agradecemos aos nossos médicos, psiquiatras e psicólogos, que nos ajudaram na construção de nossa saúde emocional e que nos apoiaram nas questões escolares.

Por último e não menos importante, somos gratas a cada integrante deste grupo, que trabalhou em sintonia e que manteve a harmonia até mesmo nos momentos mais complicados. Somos gratas por cada esforço e sacrifício que os membros do presente trabalho fizeram, para que o concluíssemos de forma satisfatória.

“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça”.

Cora Coralina

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo utilizar o grão de Kefir como microrganismo probiótico e prebiótico através da bebida láctea fermentada, analisando os aspectos sensoriais, físico-químicos e funcionais do produto. Para isso, realizamos alterações nas propriedades nutritivas a partir do enriquecimento da bebida fermentada com as cascas de farinhas mistas, além da correção de acidez, tornando assim o produto mais atrativo. Cabe ainda destacarmos que para além da utilização de geleias de banana, maracujá e maçã, as farinhas mistas foram produzidas através do aproveitamento de resíduos de frutas (cascas), visando à diminuição da deposição desses resíduos e, o aumento do valor nutricional de formulações alimentícias, sendo então uma boa opção para enriquecimento do Kefir. Embora exista um mercado aberto para alimentos funcionais, o Kefir é pouco conhecido no Brasil, visto que em nosso país é raramente comercializado, sendo ainda novidade para muitos. A maneira mais provável de obtê-lo é sendo passado entre as pessoas através de doações, também, podendo ser preparado em casa. Possui o gosto ácido, razão de um número considerável de pessoas deixarem de consumir o produto. O produto criado a partir do microrganismo Kefir, traz diversos benefícios para a saúde humana, como a manutenção do ecossistema intestinal, além disso, trabalhos recentes têm demonstrado que o Kefir e seus constituintes possuem atividade antimicrobiana, antitumoral, anticarcinogênica, imunomoduladora, melhora da digestão da lactose, entre outras, além de ser uma boa fonte de nutrientes para o corpo humano. Dessa forma, o projeto busca trabalhar com a economia circular e diminuir a acidez da bebida láctea de Kefir, o que tornaria o produto mais atrativo visando a qualidade e uma alternativa resíduo zero - dado que a bebida é produzida através dos grãos de Kefir, por meio da fermentação mediada por microrganismos de uma fonte nutritiva: bactérias e leveduras.

Palavras chave: Lactobacillus kefir. Probiótico. Microrganismo. Benefícios. Acidez.

ABSTRACT

The present study aimed to use Kefir grain as a probiotic and prebiotic microorganism through the fermented milk drink, analyzing the sensory, physical-chemical and functional aspects of the product. For this, we made changes to the nutritional properties by enriching the fermented beverage with mixed flour husks, in addition to correcting the acidity, thus making the product more attractive. It should also be noted that in addition to the use of banana, passion fruit and apple jellies, the mixed flours were produced through the use of fruit residues (peels), aiming at reducing the deposition of these residues and increasing the nutritional value of food formulations, thus being a good option for enriching Kefir. Although there is an open market for functional foods, Kefir is little known in Brazil, since in our country it is rarely sold, and is still new to many. The most likely way to get it is by passing it around through donations, too, and it can be prepared at home. It has an acidic taste, which is why a considerable number of people stop consuming the product. The product created from the Kefir microorganism, brings several benefits to human health, such as the maintenance of the intestinal ecosystem, in addition, recent studies have shown that Kefir and its constituents have antimicrobial, antitumor, anticarcinogenic, immunomodulatory activity, improves digestion of lactose, among others, in addition to being a good source of nutrients for the human body. In this way, the project seeks to work with the circular economy and reduce the acidity of the Kefir dairy drink, which would make the product more attractive with a view to quality and a zero-waste alternative - given that the drink is produced from Kefir grains, by through microorganism-mediated fermentation of a nutrient source: bacteria and yeast.

Keywords: Lactobacillus kefir. Probiotic. Microorganism. Benefits. Acidity.

Sumário

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 8. |
| 2. OBJETIVO..... | 10. |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA..... | 11. |
| 3.1 Histórico do Kefir | 11. |
| 3.2 Definição..... | 12. |
| 3.3 Elaboração de Kefir pelo Método Tradicional | 12. |
| 3.4 Leite..... | 13. |
| 3.5 Leites Fermentados | 14. |
| 3.6 Fermentação Láctea..... | 15. |
| 3.7 Bactérias lácticas | 16. |
| 3.8 Grãos de Kefir | 16 |
| 3.9 Os Microrganismos Fermentáveis | 17 |
| 3.10 A Composição Química de Kefir | 18 |
| 3.11 Kefiran | 19 |
| 3.12 Diferença entre coalhada, Kefir, iogurte e yakut..... | 20 |
| 3.12.1. Coalhada | 20 |
| 3.12.2 Kefir..... | 21 |
| 3.12.3 Iogurte..... | 21 |
| 3.12.4 Yakult | 22 |
| 3.13. Bactérias gram-positivas e gram-negativas | 22 |
| 3.14 Probióticos e Prebióticos..... | 23 |
| 3.15 Propriedades do Maracujá | 24 |
| 3.16 Propriedades da Maçã | 24 |
| 3.16 Propriedades da Banana | 25 |
| 3.17 Adição de Aditivos Naturais e Artificiais na Saborização de Alimentos..... | 25 |
| 4. METODOLOGIA | 27 |
| 4.1 Coleta e Preservação das Amostras..... | 28 |
| 4.2 Elaboração da Bebida Láctea como Padrão..... | 28 |
| 4.3. Produção de Farinhas Mistas | 29 |
| 4.4 Produção de Geleia..... | 30 |
| 4.5 Bebida Láctea com Adição de Farinhas..... | 31 |

| | |
|--|-----------|
| 4.6 Propriedades Físico-Químicas | 32 |
| 4.7 Coloração de Gram - Gram-positivas ou Gram-negativas..... | 34 |
| 5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS..... | 35 |
| 5.1 Coleta e Preservação das Amostras..... | 35 |
| 5.2 Elaboração da Bebida Láctea como Padrão..... | 35 |
| 5.3 Produção de Farinhas Mistas | 35 |
| 5.4. Produção de Geleias..... | 37 |
| 5.5 Bebida Láctea com Adição de Farinhas..... | 39 |
| 5.6 Propriedades físico-químicas..... | 39 |
| 5.7 Coloração de Gram | 41 |
| 5.8 Ensaio Sensorial..... | 41 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 46 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A diminuição da taxa de bactérias que formam a nossa microbiota intestinal relaciona-se a doenças crônicas não transmissíveis, tais como alergias, doenças autoimunes, obesidade e problemas gastrointestinais, conforme aponta Ribeiro (2019). Estudos epidemiológicos têm confirmado essa tendência que indica déficit de consumo de ácidos graxos polinsaturados, proteínas de alto valor biológico, vitaminas, Cálcio, Ferro, Iodo, Flúor, Selênio e Zinco. De acordo com o estudo de Moraes & Colla (2006), este estado nutricional carente têm originado elevadas incidências de doenças crônico degenerativas, dentre elas doenças cardiovasculares, câncer, hipertensão, diabetes, obesidade, entre outras. A situação é tão grave que dados da OMS mostram que essas doenças são responsáveis por 70-80% da mortalidade nos países desenvolvidos e cerca de 40% naqueles em desenvolvimento (MORAES, COLLA, 2006; RIBEIRO, 2019).

Segundo Fiocchi & Pereira (2012), o local de maior densidade e diversidade de comunidades bacterianas é o trato gastrointestinal, e a microbiota intestinal desempenha um enorme impacto sobre a função e a saúde do sistema digestivo. Sendo um complexo ecossistema que engloba bactérias benéficas e não benéficas. Assim, a microbiota normal do corpo humano convive em um delicado equilíbrio, necessário para a manutenção da nossa saúde (FIOCCHI, PEREIRA, 2012; RIBEIRO, 2019).

Deste modo, temos por pressuposto que os probióticos afetam as bactérias intestinais, aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a população de microrganismos potencialmente patogênicos. Para Cabral (2014) os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa (CABRAL, 2014).

Em consonância a essa afirmação, para Farnworth (2005), tratando-se de um alimento funcional, em razão de seus efeitos benéficos ao organismo, tais como manter o equilíbrio da microbiota intestinal, o Kefir é uma bebida láctea viscosa, ligeiramente carbonatada que contém pequenas quantidades de álcool. Conforme sinaliza Almeida *et al* (2011), a bebida fermentada de Kefir possui consistência semelhante à de um iogurte, mas seus valores energéticos e terapêuticos são muito maiores (FARNWORTH, 2005; ALMEIDA, *et al*, 2011).

Em conformidade com Lima (2015), embora exista um mercado aberto para alimentos funcionais, o Kefir é pouco conhecido no Brasil. Em nosso país ele não é comercializado, sendo passado entre as pessoas através de doações, também, podendo ser preparado em casa. Possui o gosto ácido, razão de um número considerável de pessoas deixarem de consumir o produto (LIMA, 2015).

Neste contexto, destaca-se o aproveitamento de resíduos de frutas, como o maracujá, a maçã e a banana, visando à diminuição da deposição desses resíduos e, o aumento do valor nutricional de formulações alimentícias, como uma boa opção para enriquecimento do Kefir. O Instituto Brasileiro de Frutas, em 2004, verificou que a produção e consumo de sucos e polpas à base de frutas no Brasil foram estimada em 350 milhões de litros. E este processamento gera cerca de 40% de resíduos agroindustriais, composto de restos de polpas, cascas, caroços ou sementes (IBRAF, 2004).

De acordo com o trabalho de Souza, Silva e Costa (2020), os princípios da Química Verde, que segundo Anastas & Warner (1998), pode ser definida como: “a criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o uso e a geração de substâncias nocivas à saúde humana e ao ambiente” (ANASTAS; WARNER, 1998). Este conceito se relaciona então ao presente projeto, sobretudo no que diz respeito a sua aplicabilidade no desenvolvimento e configuração de produtos e processos de síntese orientados ao objetivo de resíduo zero, aos quais se encaixam em:

- **Prevenção:** significa que é mais preferível e menos oneroso prevenir a formação de resíduos, do que tratá-los posteriormente. Devido a aplicação desse princípio na utilização das cascas das frutas que poderiam ser descartadas.
- **Uso de Substâncias Renováveis:** é importante optar pelas utilizações de matérias primas renováveis, quando técnica e economicamente praticável. No que se aplica ao grão de Kefir que pode ser reutilizado por tempo indeterminado (SOUZA; SILVA; COSTA, 2020; ANASTAS; WARNER, 1998).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Estudar as propriedades e características do leite fermentado aplicando o Kefir (*Lactobacillus kefir*) como microorganismo probiótico e prebiótico, benéfico para a saúde da flora intestinal.

2.2 Objetivos Específicos

- Acompanhar o processo de fermentação da bebida láctea fermentada com grãos de Kefir;
- Analisar os aspectos sensoriais, físico-químicos e funcionais da bebida láctea;
- Determinar e comparar as características de pH, acidez total titulável (% de ácido láctico), sólidos solúveis totais (°Brix) e valor energético no Kefir comum com o Kefir com características de sabor e propriedade nutritiva alterada;
- Analisar alternativas de correção de acidez;
- Enriquecer a bebida láctea fermentada com o acréscimo das farinhas mistas compostas por cascas de maçã, maracujá e banana;
- Desenvolver possibilidades de saborização na bebida láctea de Kefir.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Histórico do Kefir

Conforme o trabalho de Brasil (2007), a origem do termo Kefir vem da língua turca keyif, que significa “bom sentimento” devido à boa sensação que deixa após bebê-lo, a bebida fermentada de Kefir é considerada um alimento funcional probiótico, e muitos o designam como o iogurte do século. Originalmente os grãos de Kefir surgiram a partir da fermentação do leite de cabra ou vaca em bolsas confeccionadas com peles de animais. Dessarte, assim como reiterado por Rea et al. (2008), o leite fermentado era removido para o consumo e um novo leite era adicionado aos resíduos que ficavam dentro da bolsa. Ao longo do tempo diferentes microrganismos se acumularam e foram se incorporando a um material composto por proteínas e polissacarídeos, formando assim o grão (BRASIL, 2007; REA et al., 2008).

De acordo com Gorski (1994), o Kefir é uma bebida refrescante, estima-se que a origem dessa bebida remonte a mais de 2000 a. C. nas montanhas do Cáucaso, na Rússia, entre o Mar Negro e o Mar Cáspio. Segundo Costa & Rosa (2010), as tribos muçulmanas consideravam o Kefir um presente de Alá e, por isso, não permitia que outros povos, principalmente não muçulmanos, tivessem acesso a ele. Corroborando com esse histórico, Lopitz et al. (2006) afirma que isso fez com que, durante muitos anos, o conhecimento a respeito desse alimento não fosse difundido para o restante do mundo. (GORSKI, 1994 apud COSTA; ROSA, 2010; LOPITZ – OTSOA et al., 2006).

O estudo de Santos (2008) afirma que, no final do século XIX, uma expedição russa foi à região do Cáucaso com a finalidade de conseguir grãos de Kefir e utilizá-los no tratamento de doença, como a tuberculose, em casa de saúde, pois já se falava em propriedades “milagrosas” atribuídas ao produto. Em 1908, o produto chegou a Moscou, e começou a ser difundido para outras regiões. Conforme Costa & Rosa (2010), ao longo dos anos, o consumo de Kefir ficou restrito aos indivíduos que tinham grãos em suas residências e os utilizavam, repetindo sucessivamente o processo. Atualmente, o produto é encontrado nos comércios dos países como Rússia, Turquia, EUA, Canadá e França. No Brasil, não é encontrado em forma

industrializada, porém, seu consumo artesanal é bastante difundido. (SANTOS, J.,2008; COSTA; ROSA, 2010).

3.2 Definição

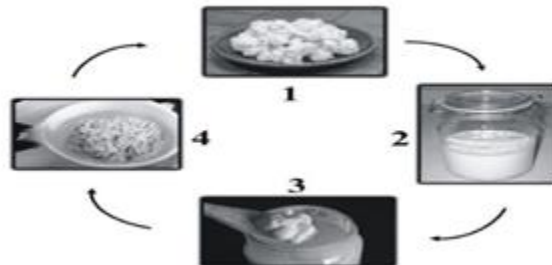
De acordo com Abraham & Deantoni (1999) o Kefir é um leite fermentado, exclusivamente produzido a partir da incubação dos grãos de Kefir (cultura starter), conforme também reiterado por Costa & Rosa (2010), pode ser produzido integralmente em leite, tais como: de vaca, cabra, ovelha ou búfala). Segundo Liu & Lin (2000) e retratado na metodologia de Brasil (2007), tem sido reportado o uso de extrato hidrossolúvel de soja para obtenção do Kefir. (ABRAHAM; DEANTONI, 1999; LIU; LIN, 2000; BRASIL, 2007; COSTA; ROSA, 2010).

Por essas razões, as bebidas lácteas produzidas com Kefir apresentam determinados atributos intrínsecos à composição deste composto, conforme aponta Ordoñez (2005) & Lopitz et al. (2006). O Kefir apresenta, segundo Costa & Rosa (2010), as seguintes características sensoriais: um leve sabor ácido e refrescante, devido à formação de ácido láctico e ácido acético; sabor alcoólico, devido à produção de etanol; uma efervescência devida ao gás produzido (CO₂); aroma moderado de levedura fresca; consistência cremosa e uniforme (ABRAHAM; DEANTONI, 1999; ORDOÑEZ, 2005; LOPITZ – OTSOA et al., 2006; COSTA; ROSA, 2010).

3.3 Elaboração de Kefir pelo Método Tradicional

A elaboração do Kefir ocorre pela adição dos grãos do Kefir ao leite UHT. De acordo com Simova et al. (2002) a razão entre o peso dos grãos e o volume de leite ideal seria de 1:10, ou seja, 100 gramas de Kefir para 1L de leite. A fermentação é realizada a 22°C por 18-24h até alcançar PH 4,7, quando é feita a homogeneização ponto os grãos de Kefir são separados do leite fermentado com ajuda de uma peneira podendo ser destinados para uma próxima elaboração da bebida láctea. O procedimento foi exemplificado no exemplo (Figura 1), conforme Schwan et al. (2015). (SIMOVA et al., 2002)

Figura 1. Produção de Kefir pelo método tradicional. (1) Grãos de Kefir. (2) Inoculação dos grãos ao leite a temperatura ambiente. (3) Multiplicação e crescimento dos grãos. (4) Separação dos grãos.



Fonte: (SCHWAN et al, 2015)

Conforme o estudo de Simova et al. (2002), durante a fermentação do leite os grãos crescem, propagam-se e passam suas propriedades às gerações seguintes de novos grãos. É também nesse momento que os microrganismos são dispersos no leite. De acordo com Toba et al. (1989) os grãos perdem a capacidade de se multiplicar após 3 ou 4 dias de transferência de um leite para outro, no entanto eles continuam a fermentar o leite e a produzir a formulação de Kefir. (TOBA et al. 1989; SIMOVA et al., 2002; SCHWAN et al. 2015)

3.4 Leite

Para Pacheco (2022), o leite cru de boa qualidade é levemente ácido, apresentando um pH entre 6,6 e 6,8, com média de 6,7 a 20 °C ou 6,6 a 25 °C. Este pH é conferido pelos constituintes naturalmente presentes no leite como as caseínas, fosfatos, albumina, citratos e dióxido de carbônico (CO₂) dissolvido (PACHECO, 2022).

Corroborando com esse dado, Pereira et al. (2001) afirma que, o aumento da acidez do leite pode ocorrer devido à produção de ácidos orgânicos, especialmente o ácido lático, pela ação fermentativa dos microrganismos (PEREIRA et al. 2001).

De acordo com o Brazilian Journal of Development (2022) o leite UHT é o mais adequado para o preparo do Kefir. A viscosidade é uma característica importante de leites fermentados, bem como apresentam melhor estabilidade do

produto avaliada pela saída de soro e estas análises foram melhores no tratamento com leite UHT, com maior viscosidade e menor sinérese. A provável manutenção do teor de gordura do leite fermentado, nesse tipo de tratamento, também contribui para a escolha de leite UHT, uma vez que microrganismos produtores de lipases provavelmente não estavam presentes na amostra analisada. Nos estudos realizados percebeu-se que a padronização e estabilidade do leite UHT contribuiu para obtenção de um produto de fermentado de Kefir também mais padronizado, característica importante para a produção caseira. A quantidade de leite e o tempo de fermentação interferem diretamente na acidez do produto, que é outra característica muito importante avaliada pelo consumidor. (BJD, 2022)

3.5 Leites Fermentados

Segundo Fonseca (2018), a fermentação é um dos mais antigos e disseminados métodos de preservação de alimentos, particularmente do leite. A suplementação de alimentos com micro-organismos vivos é feita há milhares de anos, havendo, inclusive, menções sobre o uso de leites fermentados no Velho Testamento estão escrito que “Abraão deve sua longevidade ao consumo de leite ácido.” (GÊNESIS, 18:8; FONSECA, 2018)

No Brasil, de acordo a Instrução Normativa nº 16 de 2005, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, sobre Padrão de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, entende-se por leite fermentado o produto adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2005).

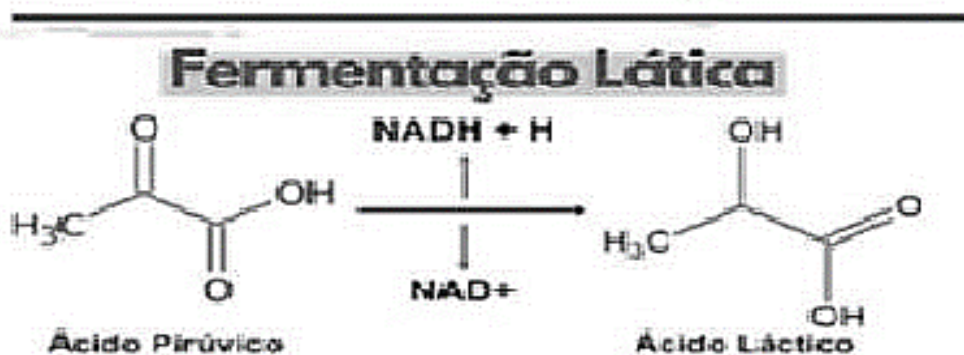
Da mesma forma que é possível concluir, por Fonseca (2018) que, o impacto na acidez se deve ao processo de fermentação, os grãos de Kefir de leite, convertem e consomem o açúcar do leite, lactose (composto por Galactose + Glicose) em ácido láctico e esse, em grandes quantidades, justamente pelo desequilíbrio de proporções, fica em maior quantidade, então o gosto ácido prevalece. (FONSECA, 2018)

3.6 Fermentação Láctea

Para Sneath et al. (1994), a fermentação é um processo que se caracteriza pela ausência de oxigênio em seu processo bioquímico em meio a fungos e bactérias como forma de obtenção de energia, consiste na glicólise de maneira que ela vai produzir ATP (adenosina trifosfato), que é uma molécula que fornece energia para as células, e também ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$). O metabolismo fermentativo dos lactobacilos produz como produto final docarbone, o lactato, que usualmente não é fermentado. Produtos adicionais são o acetato, etanol, CO_2 , formato ou succinato. Não são produzidos ácidos voláteis com mais de dois átomos de carbono (SNEATH et al., 1994).

Segundo I gastroped (2014), o ácido láctico provoca a diminuição do pH no leite o que leva a coagulação de suas proteínas, a equação dessa reação pode ser representada na equação demonstrada (Figura 2). (IGASTROPED, 2014)

Figura 1. Reação da fermentação láctica



Fonte: (IGASTROPED, 2014)

O estudo acima afirma que, após a glicólise, a redução do piruvato é catalisada pela enzima lactato-desidrogenase. O equilíbrio global dessa reação favorece fortemente a formação de lactato. Microrganismos fermentadores regeneram continuamente o NAD^+ pela transferência dos elétrons do $NADH$ para formar um produto final reduzido, como o são o lactato e o etanol (IGASTROPED, 2014).

3.7 Bactérias lácticas

O ácido láctico é um composto não volátil e inodoro responsável pela acidez característica dos produtos fermentados. Segundo Dellaglio *et al.* (1994), ele é o principal ácido produzido durante o processo de fermentação dos grãos de Kefir, uma vez que é resultado da degradação da lactose pelas bactérias ácido-láticas homofermentativas e heterofermentativas. Essas bactérias, em específico, são amplamente utilizadas como fermentos lácticos devido a sua propriedade de conservar os alimentos e de fornecer uma proteção eficaz ao homem e animais contra infecções intestinais (DELLAGLIO *et al.*, 1994).

Conforme Kim & Gilliland (1983), esses microrganismos quando isolados dos intestinos do homem e dos animais constituem atualmente uma subdivisão do grupo bactérias probióticas que, consumidas em números elevados, têm a propriedade de repor a microbiota intestinal desbalanceada pela dieta, por tratamentos com antibióticos/quimioterapia ou por estresse do hospedeiro. Em Marteau *et al.* (1990), seu estudo cita, assim como corroborado no trabalho de Igarashi *et al.* (1994) uma série de vantagens benéficas como: a diminuição do colesterol sérico, a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, aumento da absorção de minerais como o cálcio, ferro e magnésio, aumento da resposta do sistema imune do hospedeiro e por meio da atuação de suas enzimas favorecem o metabolismo de algumas substâncias como o da lactose, em indivíduos lactase persistentes. (KIM e GILLILAND 1983; MARTEAU *et al.*, 1990; IGARASHI *et al.*, 1994)

3.8 Grãos de Kefir

Para Marshall (1993), os grãos de Kefir, são grânulos gelatinosos de forma irregular, com coloração branca ou levemente amarela, apresentam aspecto de couve-flor e o tamanho varia de 2-3 cm de diâmetros. Corroborando com essa afirmação, Garrote *et al.* (2001) diz que os grãos de Kefir são compostos por uma matriz de polissacarídeos (Kefiran) e proteína, densamente povoada por bactérias ácido-láticas, ácido acéticas e leveduras. (MARSHALL, 1993; GARROTE *et al.*, 2001).

Dando seguimento a essa linha de pensamento, o estudo de Garrote et al. (2001) afirma que os principais microrganismos responsáveis pela fermentação do Kefir segundo a literatura são: *S. lactis*, *L. bulgaricus* e leveduras fermentadoras de lactose que, através da fermentação láctica e alcoólica mista os microrganismos se acumulam para formar grãos de Kefir.

Segundo a definição da Food and Agriculture Organization World Health Organization (2001), os grãos de Kefir são uma mistura complexa de bactérias (*Lactobacillus kefir*) e espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcuse* e *Acetobacter*, além de leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) que apresentam uma associação forte e específica. (FAO, 2001)

3.9 Os Microrganismos Fermentáveis

Conforme citado por Scott & Sullivan (2008), a fermentação é a conversão mediada por micro-organismos de uma fonte nutritiva presente em produtos orgânicos simples. Os principais agentes fermentadores são as bactérias e leveduras, e os principais produtos gerados nesse processo são o ácido láctico e o álcool. (SCOTT, SULLIVAN, 2008).

Em pesquisas anteriores, Magalhães (2011), buscou analisar a produção de uma bebida Kefir brasileira, desse modo, foram isolados *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactococcus lactis*, *Acetobacter lovaniensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kazachstania aerobia*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Lachancea meyersii* (MAGALHÃES, 2011).

Diante esses dados, podemos determinar os principais gêneros e espécies de bactérias e leveduras encontrados no Kefir, conforme apresentado na tabela 1:

Tabela 1. Microrganismos isolados de grãos de Kefir de leite

| Grupo Microbiano | Gênero | Microrganismos |
|----------------------|----------------------|---|
| Bactéria | <i>Acetobacter</i> | <i>A. fabarium</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. rasens</i> |
| | <i>Lactobacillus</i> | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranoferiens</i> , <i>L. kefir</i> , <i>L. otakiensis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. sunkii</i> . |
| | <i>Leuconostoc</i> | <i>L. mesenteroides</i> . |
| | <i>Lactococcus</i> | <i>L. cremoris</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. raffinolactis</i> . |
| | <i>Pediococcus</i> | <i>P. acidilactici</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. pentosaceus</i> . |
| | <i>Streptococcus</i> | <i>S. durans</i> , <i>S. thermophilus</i> . |
| | Levedura | <i>Candida</i> |
| <i>Saccharomyces</i> | | <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. turicensis</i> . |
| <i>Pichia</i> | | <i>P. fermentans</i> . |
| <i>Lanchancea</i> | | <i>L. meyericii</i> . |
| <i>Kluyveromyces</i> | | <i>K. lactis</i> . |
| <i>Kazachstania</i> | | <i>K. unispora</i> , <i>K. servazzii</i> , <i>K. aerobia</i> , <i>K. solicola</i> . |
| <i>Hanseniaspora</i> | | <i>H. guillermondi</i> . |
| Outras espécies | | <i>Cryptococcus humicolus</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> . |

Fonte: (Modificado de Fiorda *et al*, 2017)

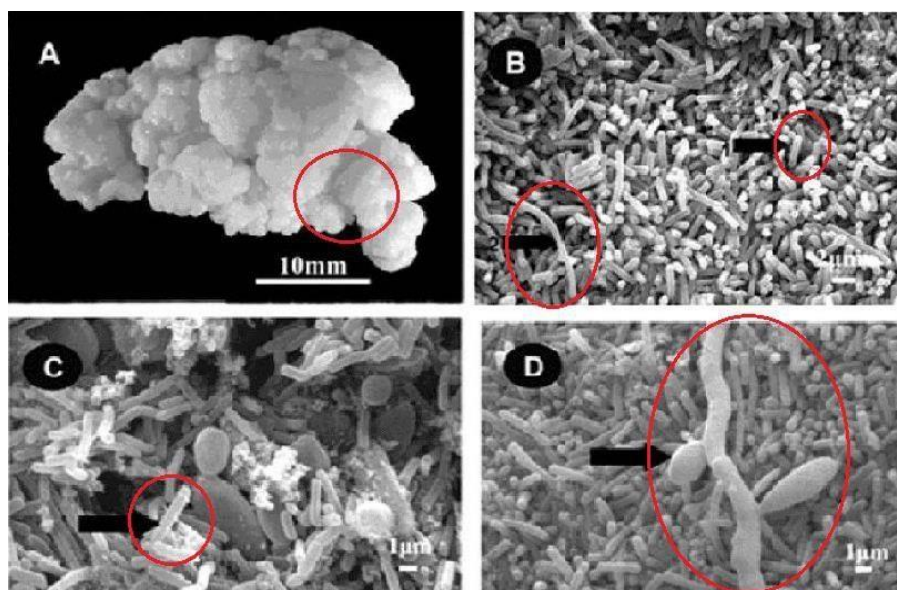
3.10 A Composição Química de Kefir

Para Arezou *et al.* (2009), os produtos principais formados por bactérias na produção da bebida Kefir incluem ácido láctico, acetaldeído, diacetil, acetoína, acetona, etanol, CO₂ e ácido acético. As leveduras são as principais produtoras do etanol presente no Kefir. Corroborando com essa ideia, Beshkova *et al.* (2003) diz que, o ácido láctico é um composto não volátil e inodoro responsável pela acidez característica dos produtos fermentados. Ele é o principal ácido produzido durante o processo de fermentação dos grãos de Kefir e resulta da degradação da lactose pelas bactérias ácido-láticas homofermentativas e heterofermentativas. Conforme Güzel & Seydim *et al.* (2000), o acetaldeído é responsável pelo aroma característico de “fruta fresca” dos iogurtes e é um dos principais compostos de aroma encontrados no Kefir. O diacetil é responsável pelo aroma amanteigado dos produtos lácteos e também é considerado um composto de aroma importante do Kefir. Por outro lado, a acetoína e a acetona desempenham papel pouco significativo nas características organolépticas do Kefir, o ácido acético é um ácido graxo volátil

de cadeia curta que dá um sabor semelhante ao vinagre, porém, esse sabor não é predominante no Kefir (AREZOU *et al.*, 2009; BESHKOVA *et al.*, 2003; GÜZEL, SEYDIM *et al.*, 2000).

Para Magalhães *et al.* (2003), essa característica intrínseca ao Kefir deve-se em razão da quantidade de bactérias e leveduras, como mostrado na imagem a seguir (Figura 3). Em que é possível observar que os grãos de Kefir brasileiros apresentaram uma superfície macia (Figura 3A) e sua porção externa coberta por um aglomerado de micro-organismos (3B, C e D), o Kefir possui um material fibrilar (provavelmente o polissacarídeo Kefiran) foi observado na parte externa, bem como na porção interna dos grãos (Figura 3C). (MAGALHÃES *et al.*, 2003)

Figura 2. Características microbiológicas do Kefir por meio de microscopia de varredura



A - Grão de Kefir. B - Bactérias curtas encontradas no Kefir. C – Bactérias longas encontradas no Kefir. D - Levedura encontrada no Kefir.

Fonte: (MAGALHÃES *et al.* 2001)

3.11 Kefiran

Para Rodrigues *et al.* (2005), o Kefiran (KFG-C) é um gel formado de polissacarídeos, é reconhecido como o único elemento que possui também seu

nome idêntico, dado a ausência de metodologias aprofundadas no mecanismo destinado a construção da estrutura bio-matriz (grãos). Pesquisas relacionadas a essa área relatam que as bactérias ácido-lácticas dos grãos de Kefir reagem formando bacteriocinas e o próprio Kefiran, que são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES et al., 2005).

Segundo o acima citado, a presença do Kefiran como cola para os microrganismo de Kefir pode ser representado como um líquido branco, dado que, para Rodrigues *et al.* (2005), os grãos de Kefir são formados por uma matriz que tem aproximadamente 45% de Kefiran. E tem a presença de dois monossacarídeos, Glicose e Galactose em proporções quase iguais. Este lactobacilo em particular é guardado no meio dos grãos, onde as condições anaeróbicas são favoráveis à síntese do Kefiran na presença do álcool etanol. Existem outros lactobacilos que produzem um polissacarídeo similar (com pequenas variações entre as proporções de glicose e galactose), *Lb.sp. KPB-167B* e *Lb. brevis*. As espécies de Lactobacilos que produzem Kefiran ou uma forma similar de polissacarídeos podem ser os mecanismos responsáveis pela tendência natural dos grãos de se propagarem em estruturas fechadas (RODRIGUES et al., 2005).

3.12 Diferença entre coalhada, Kefir, iogurte e yakut

3.12.1. Coalhada

Pela definição de Brasil (2001), explica-se o queijo de coalho por aquele que se obtém pela coagulação do leite por meio do coalho ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não pela ação de bactérias lácteas selecionadas, sendo comercializado normalmente com até dez dias de fabricação (BRASIL, 2001).

Sua produção se dá através da fermentação natural ou estimulada do leite. De acordo com Brasil (2001), essa coagulação do leite pode ser obtida usando-se uma enzima designada quimosina ou coalho. O leite coalhado é a parte sólida, resultante da coagulação, fermentação do leite, enquanto a parte líquida é chamada

de soro. Esse subproduto do leite resulta da ação de fermentos lácticos selecionados – ou por bactérias lácticas mesófilas – sobre o leite pasteurizado ou esterilizado. O teor em ácido láctico está na faixa entre 0,5% e 1,5%. (BRASIL, 2001).

Segundo Taquari (2021), a maior parte da lactose do leite é consumida pelas bactérias benéficas que fermentam o leite durante o processo de produção da coalhada. (TAQUARI, 2021).

3.12.2 Kefir

Segundo Falcão (2020) o Kefir, em suma, é uma cultura de micro-organismos, a partir da qual é possível elaborar uma bebida fermentada. Essa bebida pode ser elaborada diversas vezes em sua cozinha, afinal, os grãos de Kefir se multiplicam a cada preparo. (FALCÃO, 2020).

Para Cabral (2014) e Brasil (2007) um produto de características probióticas é o Kefir. Kefir é um leite fermentado de sabor ácido, viscoso, levemente carbonatado e de baixo teor alcoólico, consumido tradicionalmente na Europa Oriental, Rússia e sudoeste asiático. Atualmente, o consumo desse alimento está se expandindo devido a suas propriedades sensoriais únicas e sua longa história associada aos efeitos benéficos à saúde humana. Por esse motivo, é considerado um alimento funcional probiótico, e muitos o designam como o iogurte do século (BRASIL, 2007; CABRAL, 2014).

3.12.3 Iogurte

Entende-se por iogurte, segundo Sousa, o produto obtido pela fermentação láctea através da ação de *Lactobacillus bulgaricus* e do *Streptococcus thermophilus* sobre o leite integral, desnatado ou padronizado. É um produto fermentado do leite com um sabor ligeiramente azedo. Fonte de proteínas, cálcio, fósforo, potássio, algumas embalagens citam como complementos vitaminas e minerais tais com do complexo B (B6 e B12, riboflavina, ácido fólico e niacina), vitamina A e zinco. (SOUSA, 2009)

Para ser iogurte, conforme Sousa (2009), é preciso que o leite contenha culturas vivas, estas culturas são compostas de micro-organismos exclusivos, que são responsáveis pelos benefícios à saúde e nutrição. (SOUSA, 2009).

3.12.4 Yakult

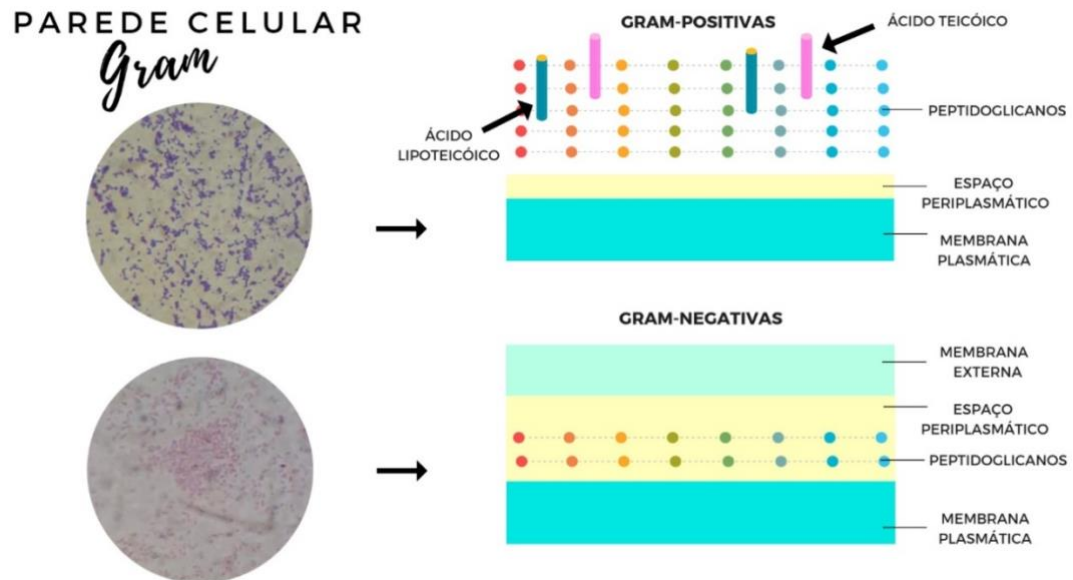
Conforme Madifa (2018), o Leite Fermentado Yakult é um alimento à base de leite desnatado, fermentado por lactobacilo selecionado, o exclusivo probiótico *Lactobacillus casei* Shirota, que resiste como nenhum outro à acidez do estômago e chega vivo em maior quantidade ao intestino, para auxiliar na regularização das funções intestinais e na proteção do sistema digestório. A ingestão regular deste lactobacilo, juntamente com uma alimentação equilibrada, contribui para uma vida muito mais saudável. (MADIFA, 2018)

Yakult, segundo Min (2019), é uma bebida láctea que contém o probiótico exclusivo da *Yakult Lactobacillus casei cepa Shirota (LcS)*, descoberto por um cientista japonês Dr. Minoru Shirota em 1930. (MIN, 2019)

3.13. Bactérias gram-positivas e gram-negativas

Em 1884, Hans Cristian Joaquim Gram observou que ao tratar bactérias com diferentes corantes, elas adquiriam cores distintas. Isso permitiu classificá-las em dois grupos: as que se coravam de roxas, então denominadas de Gram-positivas, e as que se coravam de rosa ou vermelhas, chamadas de Gram-negativas. Essa classificação se refere às diferenças da composição da parede celular. As bactérias Gram-negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa composta por bicamada lipídica, a qual se solubiliza na presença do álcool-acetona (agente diferenciador), perdendo a coloração do cristal violeta (corante primário), adquirindo a coloração rosa ou vermelho do corante secundário, safranina ou fucsina. Já as bactérias Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e grandes quantidades de ácido teicóico, adquirem a coloração violeta ou roxa pela capacidade em reter o corante primário na presença do agente diferenciador, conforme descrito na figura 4 (OPLUSTIL *et al*, 2004).

Figura 3. Esquema ilustrativo da estrutura da parede celular de bactérias gram-negativas e gram-positivas



Fonte: (CHIO, 2009)

3.14 Probióticos e Prebióticos

Segundo Bussolot (2019), os prebióticos são elementos nutricionais que agem como fertilizantes e estimulam o crescimento de bactérias saudáveis no intestino. Eles estão presentes em muitas frutas e vegetais, especialmente aqueles que contêm carboidratos complexos, como fibras e amido. Esses carboidratos não são digeríveis pelo organismo, então passam pelo sistema digestivo e se tornam alimento para as bactérias benéficas e outros micróbios.

Cada probiótico age de uma maneira no organismo, mas, de modo geral, eles ajudam a manter o equilíbrio da flora intestinal e, conseqüentemente, a saúde. Uns contribuem para o aumento da imunidade, melhora da função digestiva, no controle do peso e outros na diminuição da diarreia e constipação. Os probióticos contêm organismos vivos, geralmente cepas específicas de bactérias que ajudam na multiplicação de micróbios saudáveis no intestino.

O alimento probiótico mais comum é o iogurte, feito a partir da fermentação do leite com diferentes bactérias, obtido por meio dos produtos da reação (BUSSOLOT, 2019).

3.15 Propriedades do Maracujá

Conforme Pita (2012), as cascas do maracujá transformadas em farinha vêm sendo estudadas para uso terapêutico. A casca do maracujá é rica em pectina, niacina (vitamina B3), Ferro, Cálcio e Fósforo. Nutrientes que atuam no crescimento e na produção de hormônios e previnem problemas gastrointestinais, atuando ainda na prevenção da anemia, no crescimento e fortalecimento dos ossos e na formação celular. Sua casca é comumente estudada em função do seu poder de diminuir a glicemia e o colesterol LDL sem diminuir o colesterol HDL, atuando, portanto, como um alimento funcional (PITA, 2012).

3.16 Propriedades da Maçã

Para Wosiacki *et al* (2007), as propriedades funcionais do bagaço de maçã se destacam pela presença de pectina, a fruta possibilita um decréscimo no risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e na incidência de derrame. Nos estudos realizados por Loo & Foo (2000), com o bagaço de maçã, observaram a presença de polifenóis responsáveis pela atividade antioxidante ainda presentes neste produto (WOSIACKI *et al*, 2007; LOO, FOO, 2000).

Huber e Rupasinghe (2009) observaram que cascas de maçã apresentaram-se como inibidores eficazes da oxidação de lipídios. Ayala-Zavala *et al* (2010), identificaram diversas aplicações, tais como antioxidantes, antimicrobianos, aromatizantes, corantes e texturizantes, para coprodutos. De acordo com Silva *et al* (2014), a identificação e quantificação de compostos de interesse em coprodutos de frutas são importantes para comprovar seus potenciais benefícios (HUBER, RUPASINGHE, 2009; AYALA-ZAVALA *et al*, 2010; SILVA *et al*, 2014).

Segundo Levin (1989) e o estudo de Wosiacki (2005), sobre o bagaço de maçã, se os resíduos forem adequadamente desidratados, podem ser secos até que

contenham menos de 10% de umidade a fim de ser armazenado e servir como matéria-prima para a obtenção de componentes de alto valor agregado com pectinas (LEVIN, 1989; WOSIACKI, 2005).

3.16 Propriedades da Banana

Segundo Nunes *et al* (2011), esta fruta é rica em diversos nutrientes como as vitaminas A, C, B3, B6 entre outras e minerais como Cálcio, Ferro, Manganês, Cobre e Potássio que auxiliam no tratamento de inflamações intestinais e outros, estando presentes também as fibras que ajudam na regulação intestinal (NUNES *et al*, 2011).

Conforme indica Sousa *et al* (2012), sendo uma fruta altamente nutritiva, a banana é fonte das vitaminas A e C, B1, B2, B6, e B12 e minerais como Cálcio, Potássio, Fósforo, ácido fólico, Ferro e Magnésio. Ricas em carboidratos, é uma excelente fonte de energia, possuindo três tipos de açúcares naturais (sacarose, frutose e glicose), além do alto teor de fibras solúveis existentes nela (SOUSA *et al*, 2012).

3.17 Adição de Aditivos Naturais e Artificiais na Saborização de Alimentos

Aditivo alimentar: é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Isto implicará direta ou indiretamente fazer com que o próprio aditivo ou seus produtos se tornem componentes do alimento. Esta definição não inclui os contaminantes ou substâncias nutritivas que sejam incorporadas ao alimento para manter ou melhorar suas propriedades nutricionais.

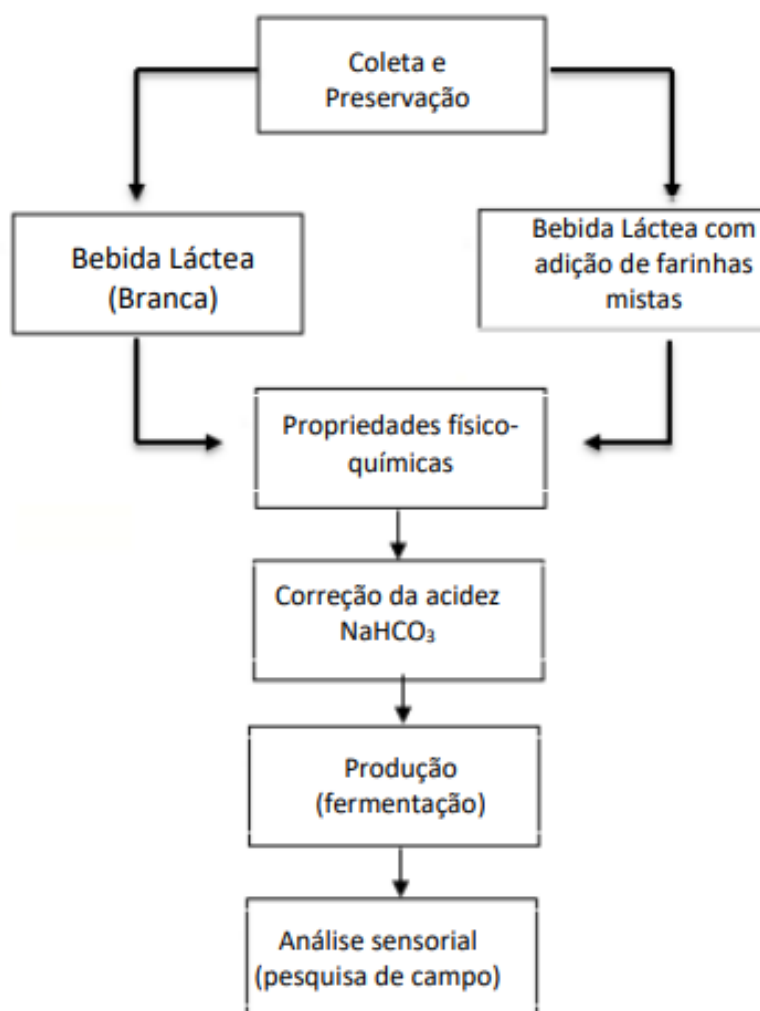
Geralmente dois são os fatores levados em consideração na criação de uma lista de aditivos permitidos legalmente. Sendo eles a necessidade de sua aplicação e sua inofensividade em relação a saúde. Assim, os principais usos de aditivos químicos, são:

1. Substâncias que tem por objetivo estender o tempo de vida útil ou reduzir a deterioração de um determinado alimento;
2. Produtos que alteram as características de um alimento, melhorando o seu sabor, a sua cor, e a sua textura;
3. Produtos que são adicionados com a finalidade de variar o valor nutritivo do mesmo;
4. Substâncias que ocorrem em alimentos, devido a contaminações acidentais.

4. METODOLOGIA

As atividades experimentais foram realizadas no Laboratório de Química da ETEC Trajano Camargo de Limeira sob a supervisão dos professores Gislaine Aparecida Barana Delbianco e Jéssica Carolina Paschoal de Macedo, baseado nos trabalhos de Magalhães (2011), Zhou (2021) e More (2019), conforme exposto na figura 5:

Figura 4. Atividades experimentais realizadas



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

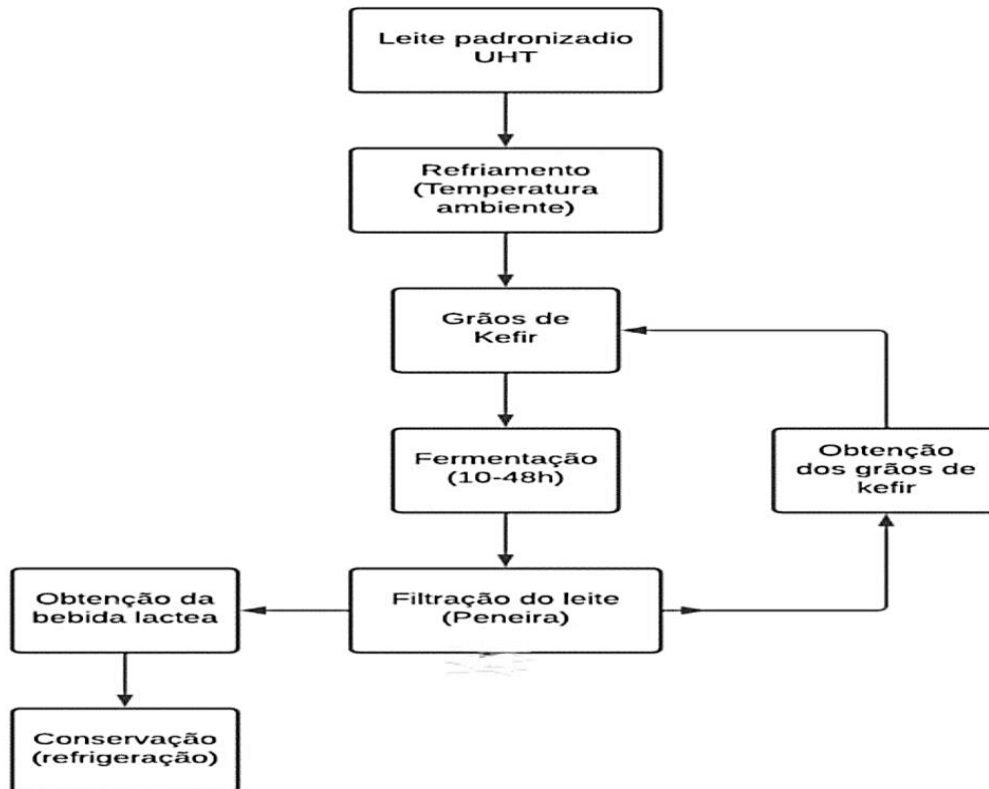
4.1 Coleta e Preservação das Amostras

Através de familiares locais, os grãos de Kefir foram doados para a realização do projeto. Para elaboração e formulação da bebida láctea foi utilizado 1 litro de leite integral e desnatado e o espécime *Lactobacillus kefir*. Foi necessária uma busca para adquirir os alimentos (banana, maracujá e maçã) em estabelecimentos comerciais do município de Limeira-SP. A preservação das amostras foi realizada em ambientes refrigerados. Tivemos um cuidado especial com a descontaminação do leite e dos recipientes nos quais os grãos de kefir (*Lactobacillus kefir*) foram produzidos e armazenados.

4.2 Elaboração da Bebida Láctea como Padrão

A bebida foi fermentada em temperatura ambiente, usando os grãos de Kefir e leite UTH, procedendo-se nas condições normais de temperatura e pressão, sem a presença de luz, tampada com papel toalha e vedada para proteção de formigas e insetos. O procedimento é descrito no fluxograma abaixo (Figura 6):

Figura 5. Fluxograma de preparo do Kefir



Fonte: Arquivo Pessoal, 2022.

Obtivemos amostras com diferentes tempos de fermentação, sendo eles: 40horas, 32horas e 13horas. A bebida láctea de Kefir no estado de reativação (1ª troca de leite). Separamos amostras de leite integral UHT sem alterações e o iogurte integral natural (produzido através de leite e fermento), ao decorrer do tempo foi realizado o processo de disoração do iogurte Kefir, separando o soro que é produzido em sua fermentação.

4.3. Produção de Farinhas Mistas

As frutas higienizadas com sabão em água corrente, foram submetidas à sanitização com água clorada a 1% e ácido acético 4% durante 10 minutos. Posteriormente, cada fruto foi cortado ao meio para a separação da polpa com as sementes e as cascas, descascado a fim de restituir a polpa para a geleia.

As cascas de maracujá e maçã foram cortadas em fatias de aproximadamente 0,5 cm de espessura, posteriormente foi realizada a secagem em uma estufa, junto com as cascas da banana e da maçã a uma temperatura de 80°C durante 24 horas. Finalizando a secagem, as cascas de frutas foram trituradas no liquidificador, peneiradas e armazenadas em recipiente hermético.

4.4 Produção de Geleia

Primeiramente, com a recepção e conservação das frutas, optamos por escolher frutas recebidas a partir de caixas, sacos ou a granel para a produção da geleia, de modo que estivessem suficientes maduras, visto que temos por pressuposto que frutas maduras apresentam características específicas, tais como sabor, cor, aroma, e se diferem das frutas verdes por possuírem maior teor de pectina, que se decompõe em ácido péctico, impedindo a formação de gel.

As maçãs e o maracujá foram armazenados dentro da geladeira em uma sacola plástica aberta para que pudessem ficar refrigerados e a banana foi preservada fora da geladeira em local com baixa umidade, ao abrigo da luz e protegido de insetos e roedores.

Na etapa de seleção e lavagem das frutas, as frutas foram selecionadas aparentando estar totalmente sadias, sendo que elas não devem apresentar manchas, nem terem aspectos de ter sido atacada por insetos e/ou larvas. Para a seleção das frutas é muito importante de que o local seja bem iluminado.

A fruta foi submetida à pré-lavagem pelo método de imersão, foram utilizados 15 mL de água sanitária para cada litro de água. Foram utilizados dois béqueres com 2 litros para que todas as frutas ficassem completamente submersas. Esse método serviu para que ocorra a desinfecção externa da fruta.

Em determinação da presença de pectina no suco de fruta, foi adicionado em um béquer 50mL de álcool etílico (C₂H₅OH). Logo após, adicionar juntamente com o álcool, 50mL de suco da fruta a ser analisada. Foi agitado levemente, seguinte por repouso por 1 minuto.

Segundo a metodologia de Cavenagh (2021), a formação de uma massa sólida, é sinal de que o suco é rico em pectina. Se a massa se quebrar em pedaços com facilidade, a fruta tem presença moderada de pectina. No entanto,

se a massa se quebra em pedaços pequenos é considerado pobre em pectina. Portanto, quando o suco da fruta for de rico à moderadamente rico em pectina, o açúcar deve ser adicionado em uma proporção de 1:¾, ou seja, 160mL de suco para 123,75 gramas de açúcar. Se o suco for pobre em pectina deve ser usada outra fonte de pectina, no caso, foi usada a pectina extraída do albedo do maracujá.

No teste com a maçã e a banana, foi concluído que elas são frutas ricas em pectina e não foi necessário o uso de fontes de pectina externa. Entretanto, com a fruta maracujá, a pectina está concentrada no albedo e não em sua polpa.

Para a extração da pectina foi retirada a película amarela da casca cortando ao meio para retirada da polpa. O albedo foi cortado, cozido em água potável com 5 mL de suco de limão por 40 minutos e transferido para um liquidificador para ser triturado até obtenção de uma massa homogênea.

Na produção da geleia de maracujá a polpa e as sementes do maracujá foram trituradas no liquidificador, para em seguida, ser cozida juntamente com a pectina extraída anteriormente e o açúcar na proporção 1 de polpa para 1 de pectina e 1 de açúcar usando um béquer de 150mL como medida.

Para a produção da geleia de maçã, as maçãs sem casca foram raladas em ralador doméstico comum e cozidas em fogo baixo com 200 mL de água até que as raspas estivessem semitransparentes. O açúcar foi adicionado na mesma proporção da geleia anterior durante o cozimento.

Por fim, para a produção da geleia de banana, foram utilizadas uma dúzia de bananas, submetidas a aquecimento em fogo médio, com adição de 160 gramas de açúcar e pó de canela. Iniciando a fervura, a geleia entrou em um ponto em que a amostra despregava-se do fundo do recipiente utilizado para aquecimento, podendo assim ser retirada e armazenada em um frasco de vidro.

4.5 Bebida Láctea com Adição de Farinhas

Foi adicionado na bebida láctea do *Lactobacillus kefir* as farinhas de maracujá (*Passiflora edulis*), maçã Fuji (*Malus x doméstica*) e banana prata (musa prata). Segundo as seguintes formulações apresentadas na tabela 2:

Tabela 2. Formulação da bebida láctea

| Materiais | Formulação 1 | Formulação 2 | Formulação 3 | Formulação 4 |
|------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Bebida láctea de Kefir | 99,5% | 65% | 65% | 65% |
| Farinha mista | - | 9,5% | 9,5% | 9,5% |
| Geléia 1 | - | 25% | - | - |
| Geléia 2 | - | - | 25% | - |
| Geléia 3 | - | - | - | 25% |
| Bicarbonato | 0,5% | 0,5% | 0,5% | 0,5% |

Fonte: Acervo pessoal, 2022.

4.6 Propriedades Físico-Químicas

O pH é uma escala que serve para medir a acidez e/ou a alcalinidade de um meio. A medição de pH foi feita através da utilização do aparelho pHmetro. Assim, com o objetivo de fazer uma análise comparativa com as metodologias de base, realizamos a determinação do pH nas amostras de kefir, leite e iogurte, em que se transferiu 50 mL da amostra em um béquer de 250 mL. Para, em seguida, com o pHmetro calibrado ser feita a medição do pH. Obtendo os seguintes valores apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Primeira análise

| AMOSTRA | pH | Temp. °C |
|-----------------|------|----------|
| Leite Integral | 6,86 | 21,8°C |
| 1° reativação | 4,06 | 21,9°C |
| Amostra 13h | 5,44 | 21,8°C |
| Amostra 32h | 4,74 | 23,1°C |
| Amostra 40h | 4,41 | 23,4°C |
| iogurte natural | 4,22 | 23,1°C |
| Soro do kefir | 4,3 | 23,5°C |

Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Para a determinação do ácido láctico presente no Kefir fizemos uma titulação com o indicador ácido base fenolftaleína e NaOH 0,1N realizada nas

amostras de Leite UHT integral e Kefir. Para isso, foram transferidos 10 mL da amostra para um Erlenmeyer de 250 mL e adicionado água destilada até completar 50mL, após isso a solução foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro. Sendo adicionado 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1 % e titulado com hidróxido de sódio 0,1 N, até o aparecimento de uma coloração rósea.

Nas amostras de Kefir foram utilizados: 1° amostra 25,3mL de NaOH; 2° amostra: 14mL de NaOH e 3° amostra: 10,8mL de NaOH. Com isso, o cálculo da acidez foi obtido através da fórmula exposta na figura 7:

Figura 6. Fórmula acidez titulável

$$\text{Acidez titulável, \% de ácido láctico (m/v)} = \frac{V \times f \times 0,09 \times N \times 100}{v}$$

Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Onde:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gasto na titulação, em mL;

v = volume da amostra, em mL;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

0,09 = fator de conversão do ácido láctico;

N = normalidade de solução de hidróxido de sódio 0,1 N.

Para determinar o fator de correção do NaOH titulamos com o biftalato de potássio, obtendo os resultados presentes na tabela a seguir (tabela 4).

Tabela 4. Padronização do NaOH

| Padronização | |
|--------------|--------|
| V gasto NaOH | N |
| 10,3 | 0,0972 |
| 10,5 | 0,0953 |
| 10,4 | 0,0963 |

Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Com os dados da padronização foi possível realizar os cálculos e obter a acidez presente nas amostras. Os valores obtidos são demonstrados na tabela 5, com os quais determinamos a porcentagem de ácido láctico, um composto não volátil e inodoro responsável pela acidez característica dos produtos fermentados. Ele é o principal ácido produzido durante o processo de fermentação dos grãos de Kefir e resulta da degradação da lactose pelas bactérias ácido- lácticas homofermentativas e heterofermentativas.

Tabela 5. Ácido láctico na amostra de Kefir

| Titulação Kefir | |
|-----------------|--------------|
| Amostra (ml) | %ac. Láctico |
| 10,8 | 0,826575 |
| 11 | 0,82730455 |
| 14 | 0,64383429 |

Fonte: acervo pessoal, 2022.

4.7 Coloração de Gram - Gram-positivas ou Gram-negativas.

Através da coloração é possível identificar e diferenciar os dois principais grupos de bactérias, sejam Gram-positivas ou Gram-negativas. Na técnica de Gram, um esfregaço é fixado na lâmina pelo calor e coberto com um corante primário, geralmente o cristal violeta. Após um minuto, o esfregaço é lavado e em seguida cobre-se a lâmina com lugol, que age como mordente (fixador), fixando o cristal violeta.

Nessa etapa tanto as bactérias Gram-negativas como as Gram-positivas permanecem com a coloração violeta. Em seguida, a lâmina é lavada com uma solução de álcool-acetona a 95%. Esta solução age como descolorante, retira o cristal violeta das bactérias Gram-negativas e deixando-as incolores. Após essa etapa o excesso do álcool é retirado e em seguida as bactérias são submetidas ao corante secundário, podendo ser a fucsina ou safranina a 0,1 a 0,2%. A lâmina é lavada, seca com papel-filtro e observada ao microscópio óptico, aplicar uma gota de óleo de imersão e observar na objetiva de imersão (100x) (ZOCHIO, 2009).

5. DISCUSSÃO DE RESULTADOS

5.1 Coleta e Preservação das Amostras

Tivemos um cuidado especial com a higienização do leite e dos recipientes nos quais os grãos de Kefir (*Lactobacillus kefir*) foram produzidos e armazenados, esterilizando os utensílios em água fervida por 30 minutos.

5.2 Elaboração da Bebida Láctea como Padrão

As amostras que não tiveram uma faixa de fermentação de 12h a 48h não poderiam mais ser utilizadas, de maneira que apresentavam um gosto ácido e odor pouco atrativo.

5.3 Produção de Farinhas Mistas

Para o processo da produção das farinhas mistas de cascas de maracujá, banana e maçã foi realizada a secagem em uma estufa, porém não pudemos deixar as 24h consecutivas dentro da estufa, realizando da seguinte maneira: com a casca de maracujá, nós a colocamos na estufa, com a temperatura ajustada para que pudéssemos usar a estufa junto com outro grupo, alterando esse dado da metodologia para 100°C e por 3h consecutivas. O resultado foi favorável em relação à casca da farinha de maracujá, que apresentava um aspecto amarronzado. Como apresentado na figura 8:

Figura 7. Cascas de maracujá após secagem em estufa



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Em uma aula de TCC fizemos novamente o processo de secagem com as cascas de maracujá, maçã e banana. A casca de banana não secou o suficiente, pois ela estava muito úmida e sua cor já havia se tornada preta, como exposto na figura 9, com isso foi necessário descartá-las.

Figura 8. Cascas de banana



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Como uma possibilidade alternativa, utilizamos a casca de banana para um doce que pôde ser usado para conservar a ideia de resíduo zero do projeto, da mesma forma que também poderíamos utilizar como adubo para plantas. A nova farinha de maracujá foi levada ao mesmo processo, porém por não ter sido mantida na estufa por tempo o suficiente e ter sido armazenada em uma

embalagem de vidro, ela desenvolveu formação de bolor, como observados na figura 10:

Figura 9. Farinha de Maracujá – bolor



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

A casca de maçã não foi mantida por tempo o suficiente na estufa, porém por ter uma espessura menor, ela ficou mais seca e com a coloração agradável, assim como o cheiro, mesmo ainda não obtendo a granulidade exata de farinha.

5.4. Produção de Geleias

As frutas foram conservadas ao abrigo da luz do sol e em temperatura ambiente, de modo que não houve perdas por deterioração biológica visível.

Durante a seleção, ocorreu tudo como o esperado e as frutas foram lavadas e desinfetadas conforme a metodologia indicada anteriormente.

No teste com a maçã e a banana, concluímos que elas são frutas ricas em pectina e não foi necessário o uso de fontes de pectina externa. Entretanto, com a fruta maracujá, a pectina está concentrada no albedo e não em sua polpa, representado na figura 11. O albedo precisou de 20 minutos à mais que o previsto na metodologia para que atingisse a consistência desejada. Logo após o cozimento, a homogeneização no liquidificador com a água do cozimento ocorreu conforme o planejado.

Figura 10. Gel de Albedo



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

A geleia de maracujá, representada na imagem abaixo, atingiu a viscosidade e cor esperada. Logo após o fim de seu preparo, foi armazenada em um franco de vidro com tampa, previamente esterilizado e mantido em refrigeração constante. Não foi aberto até a sua necessidade nos testes sensoriais previamente esterilizados e mantidos em refrigeração constante.

Na produção da geleia de maçã, a geleia atingiu a viscosidade e cor esperada.. Logo após o fim de seu preparo, foi armazenada em um frasco de vidro com tampa, previamente esterilizado e mantido em refrigeração constante. Não foi aberto até a sua necessidade nos testes sensoriais.

O resultado das três geleias (maçã, banana e maracujá) são representadas na figura 12, de modo que A corresponde à geleia de maçã, B geleia de maracujá e C geleia de banana).

Figura 11. Geleias de maçã, maracujá e banana



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Para a produção da geleia de banana foi utilizadas uma dúzia de bananas, submetidas ao aquecimento em fogo médio com adição de 160 gramas de açúcar e pó de canela. Iniciando a fervura, a geleia entrou em um ponto em que desgrudava da panela, podendo assim ser retirada e armazenada em um frasco de vidro.

5.5 Bebida Láctea com Adição de Farinhas

Adicionamos as farinhas para análise de cor, odor, textura e posteriormente fazer a titulação, para a farinha de maracujá obtivemos: 8,2mL; e 7,6mL. Para a farinha de maçã obtemos 7,6mL; e 8,0mL. Para cada análise separamos uma amostra para representação.

5.6 Propriedades físico-químicas

Como precaução analítica, o procedimento tem uma exigência de ser preparado, teoricamente, entre 20 e 30 segundos, dado que os fosfato presente

no leite mediante a adição de NaOH converte-se em ácido fosfórico. Isso, naturalmente, aumenta a acidez da amostra. Se a situação for demorada, ocorre maior precipitação de fosfato tricálcico e conseqüente formação de ácido fosfórico. A média de tempo apresentada nas titulações feitas variou de 50 segundos a um minuto e meio, o que justifica a diferença nos resultados dos cálculos obtidos.

A medida padrão determinou a quantidade de NaOH, padronizando a solução, o ponto exigido era uma nuance-rósea, conforme a figura 13:

Figura 12. Padronização do NaOH



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

Após padronizar a solução, repetimos o mesmo processo com as amostras de Kefir, até apresentarem um nuance rosado, como mostra a figura 13:

Figura 13. Titulação da acidez do Kefir

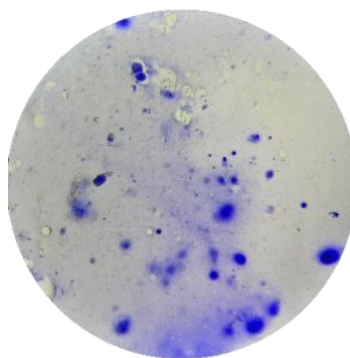


Fonte: Acervo pessoal, 2022.

5.7 Coloração de Gram

Utilizamos o laboratório de físico-química para fazer uma análise comparativa do iogurte com o Kefir no procedimento de coloração de Gram, sob orientação do professor Sérgio Delbianco. As bactérias Gram-positivas retêm o cristal violeta devido à presença de uma espessa camada de peptidoglicano (polímero constituído por açúcares e aminoácidos que originam uma espécie de malha na região exterior à membrana celular das bactérias) em suas paredes celulares, apresentando-se na cor roxa, característica apresentada pelo Kefir, como mostra a figura 15.

Figura 14. Coloração de Gram do Kefir



Fonte: Acervo pessoal, 2022.

5.8 Ensaio Sensorial

Conforme a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993), a análise sensorial é uma “disciplina da Ciência usada para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos alimentos e materiais tal como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, paladar, tato e audição”. Essas características, também chamadas de atributos sensoriais, tendem a ser percebidas em ordem de: aparência, aroma, consistência e sabor. Porém, durante o processo de percepção, todos os atributos ou sua maioria acabam se sobrepondo, como se a pessoa recebesse as impressões sensoriais quase que simultaneamente. Todos os sentidos são utilizados durante o processo e determinam a qualidade da sensação que o alimento provoca.

A análise sensorial tem uma enorme importância, visto que através dela é possível detectar problemas na qualidade do produto e analisar o resultado da interação entre o consumidor e o alimento. As análises sensoriais também são importantes para avaliar a aceitação e preferência mercadológica de um determinado produto, propor mudanças na formulação e/ou no processamento, avaliar as matérias-primas utilizadas no processo produtivo, desenvolver novos produtos, avaliar a vida útil e as condições de armazenamento dos produtos. Tomando como base os seguintes parâmetros de aparência.

A análise sensorial foi realizada na escola ETEC Trajano Camargo, em Limeira, com a aprovação da professora Gislaine Aparecida Barana Delbianco. O produto elaborado foi mantido sob refrigeração. As análises sensoriais foram feitas sete dias após o processamento, após a avaliação dos resultados das análises microbiológicas, para garantir a segurança do produto oferecido aos provadores.

Os participantes não treinados da pesquisa foram recrutados voluntariamente, entre eles alunos e funcionários da Escola ETEC Trajano Camargo. Aqueles participantes que informaram ter alergia ou intolerância a qualquer um dos ingredientes do produto, leite, açúcar e polpa de maracujá, maçã ou banana, assim como aqueles que apresentavam qualquer tipo de doença que impedia o consumo de um ou mais ingredientes do produto, não participaram da pesquisa. Todos os participantes assinaram o Termo concordando em participar.

As amostras de Kefir foram analisadas pelo teste de aceitação pelo consumidor usando uma ficha de avaliação sensorial com escala hedônica de nove pontos (Figura 16) para parâmetros como aparência, cor, aroma, sabor, consistência e impressão global, onde os extremos correspondem a “desgostei extremamente” (1) e “gostei extremamente” (9). Também foi avaliada a intenção de compra, utilizando uma escala de cinco pontos, onde os extremos correspondem a “eu certamente não compraria” (1) e “eu certamente compraria” (5).

Figura 15. Formulário do Forms

Análise sensorial do projeto Estudo das propriedades e Aplicações do Lactobacillus Kefir na Elaboração de Bebidas Lácteas

Projeto do 3º química da etec Trajano Camargo

bia.baasch@gmail.com (não compartilhado) Alternar conta

***Obrigatório**

Qual o seu nome completo? *

Sua resposta

Qual o seu vínculo com a escola? *

Aluno

Funcionário

Professor

Se você for aluno, qual a sua turma? Se for professor/funcionário, digite apenas o * seu vínculo com a escola.

Sua resposta

Qual a sua idade? *

Sua resposta

Você possui alergia a algum alimento? Se sim, qual? *

Sua resposta

Você possui alguma restrição alimentar? Se sim, qual? *

Sua resposta

Você possui intolerância a lactose? *

Sim

Não

Você faz uso de alguma medicação que poderá influenciar na sua capacidade de * perceber odores e/ou sabores?

Sim

Não

Você já fez parte de alguma análise sensorial? *

Sim

Não

Você está resfriado(a) ou com alguma dificuldade de sentir cheiro? *

Sim

Não

Você conhece o iogurte feito pelos grãos de Kefir? *

Sim

Não

Você já provou o iogurte feito pelos grãos de Kefir? *

Sim

Não

Você tem algum hábito regular que possa interferir na sua percepção sensorial? * (Exemplo: fumar, beber café, mascar chiclete, entre outro.)

Sim

Não

Se sim à pergunta anterior, quais hábitos você possui? *

Sua resposta

Você gosta de iogurte? *

Sim

Não

Com que frequência consome iogurte? *

Sua resposta

Enviar Limpar formulário

Fonte: Acervo pessoal, 2022.

A análise sensorial foi feita com 23 participantes não-treinados, maiores de 18 anos que avaliaram as diferentes formulações, em laboratório. As amostras foram entregues refrigeradas (aproximadamente 12°C), em copos plásticos descartáveis de 50 mL, de cor branca. Cada copo continha em torno de 30 mL de cada amostra, codificados com números e foi disponibilizada junto com a amostra a ficha de avaliação sensorial com escala hedônica, bem como água para limpeza do palato. Com isso obtivemos os resultados expressos na figura 17 e 18.

Figura 16. Ficha para a análise sensorial**FICHA DE AVALIAÇÃO SENSORIAL COM ESCALA HEDÔNICA**

Nome: _____ Data: _____

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

NOTAS/ESCALA:

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

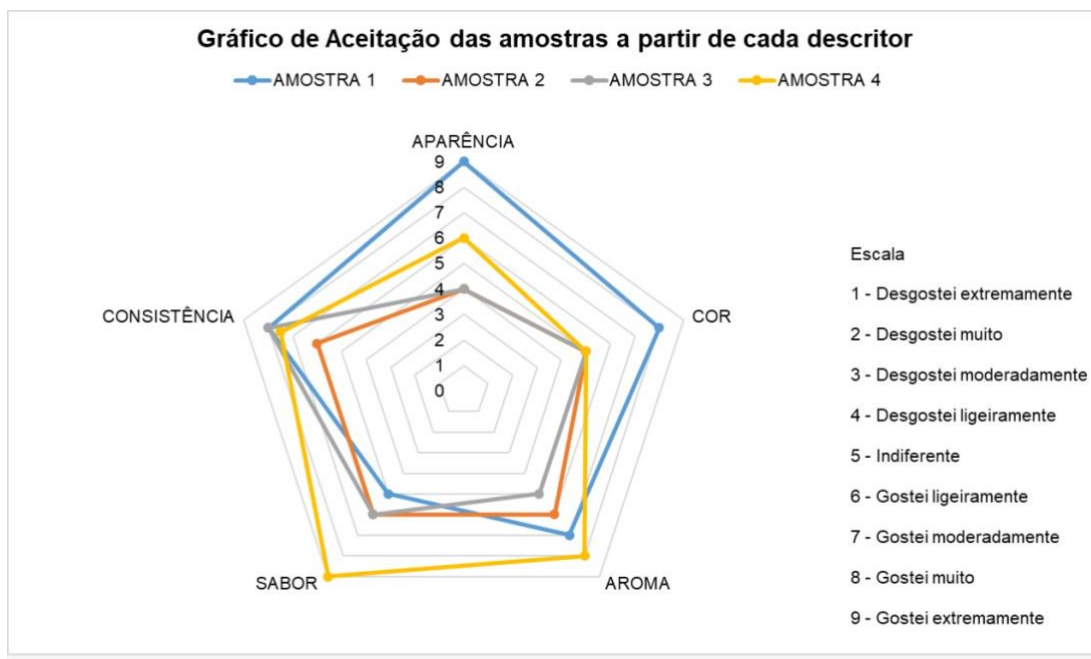
INTENÇÃO DE COMPRA**NOTAS/ESCALA:**

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

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

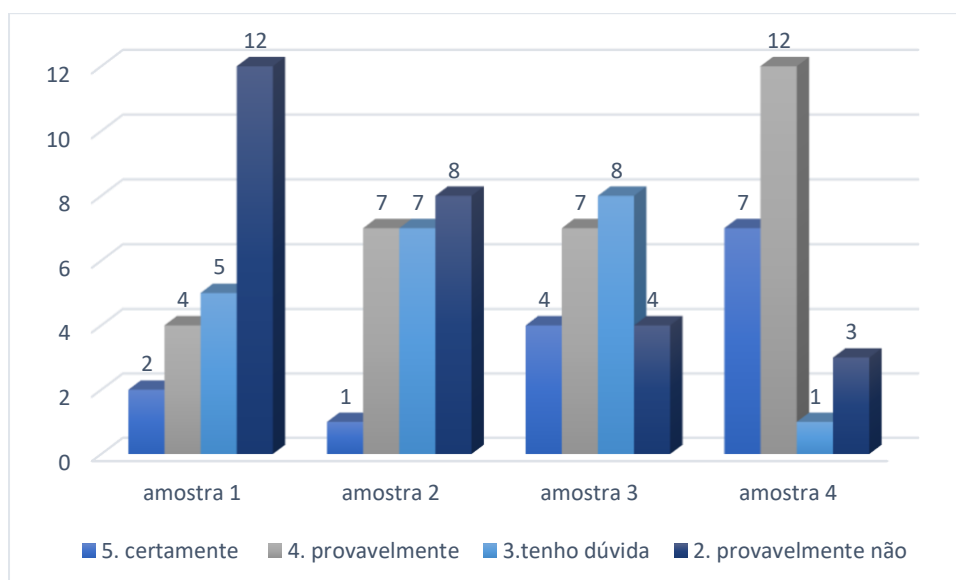
Fonte: (Adaptado) More, 2019.

Figura 17. Gráfico de aceitação das amostras



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

Figura 18. Gráfico de intenção de compra



Fonte: Arquivo pessoal, 2022.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como principais potencialidades destacamos a produção de uma bebida láctea mais saudável, tanto para o meio ambiente com para os seres humanos, produzida a partir da fermentação do leite realizada pelo micro-organismo Kefir e a identificação de fontes alternativas de redução de acidez na bebida Láctea de Kefir, sobretudo por meio do uso do bicarbonato de sódio e da adição de farinhas mistas e geleias, que além de tornarem o alimento mais atrativo, nutritivo, e saborizado, possibilitou ainda o reaproveitamento de cascas de frutas, que seriam descartadas pela indústria (atendimento à política de destinação zero para resíduos).

Através do presente trabalho, foi possível analisarmos as etapas que ocorreram durante o processo fermentativo do leite. Observamos assim, que a coagulação do leite e a produção do soro, é responsável pelo sabor levemente ácido, que são ocasionados pelo ácido láctico.

Através da análise sensorial, obtivemos resultados positivos diante do produto obtido, que foi apresentado aos avaliadores voluntários. Os produtos foram analisados em diversos aspectos como cor, aparência, aroma, sabor e consistência. A partir da análise sensorial tivemos um parâmetro de qual foi o produto mais aceito em cada um dos aspectos aqui já citados.

Com todas as análises realizadas, concluímos de que esse trabalho atingiu de maneira excepcional todas as expectativas das autoras, bem como os objetivos iniciais da pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Characterization of kefir grains in cow's milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, v. 66, p. 327-333, 1998. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

ALMEIDA, F. A.; et al. Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. Minas Gerais: *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 66, 2011. Disponível em: <https://scholar.google.com.br/scholar?>. Acesso em 2 de março de 2022.

BOURRIE, B.C.; Willing, B.P.; Cotter, P.D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Front. Microbiol.* 2016, 7, 647. acesso em 6 de março de 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. *Diário Oficial da União, Brasília*, n. 205, seção 1, p. 4, 2007. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instru%C3%87%C3%83onormativ-a-n%C2%BA-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf>. Acesso em: 25 Abril de 2012.

CABRAL, Nathalia de Sousa Moulin; Kefir Sabor Chocolate: caracterização microbiológica e físico-química. Universidade Federal Fluminense Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro. Acesso em: 5 de abril de 2022.

DELLAGLIO, F.; DICKS, L.M.T.; DU TOIT, M.; TORRIANI, S. Designation of ATCC 334 in place of ATCC 393 (NCDO 161) as the neotype strain of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and rejection of the name *Lactobacillus paracasei* (Collins et al. 1989). Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, v. 41, p. 340-342, 1991. Acesso em: 26 de agosto de 2022.

DESCONHECIDO. Aditivos nos alimentos. Disponível em <https://www.enemvirtual.com.br/vestibular/biologia/aditivos-nos-alimentos/> Acesso em 18 de abril em 2022.

FAO/WHO Expert Consultation: "Guidelines for the evaluation of probiotics in food". London, Ontario (Canada), 2002. Acesso em: 25 de abril de 2022.

FARNWORTH, Edward R. Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, Reino Unido, v. 2, n.1, p. 1–17, 2005. Acesso em: 17 de maio de 2022.

FIOCCHI, C.; PEREIRA, H. S. Microbiota intestinal: sua importância e função. Rio de Janeiro: *J. bras. Med.*, 2012. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/porta1/resource/pt/lil-678748> Acesso em: 2 de março de 2022.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p. 639-652, 2001. Acesso em: 22 de julho de 2022.

GORSKI, D. kefir, 21st century yogurt? *Dairy Foods*, v. 95, p. 49, 1994. Acesso em: 23 de julho de 2022.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Comparison of amino acid profiles of milk, yoghurt and Turkish kefir, *Milchwissenschaft*, v. 58, p. 158-160, 2000. Acesso em: 23 de julho de 2022.

HERTZLER, S.R.; CLANCY, S.M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *J. Am. Diet. Assoc.*, v.153, n. 5 p.582-587, 2003. . Acesso em: 23 de julho de 2022.

IGARASHI, M.; LIYAMA, Y.; KATO, R.; TOMITA, M.; ASAMI, N.; EZAWA, I. Effect of *Bifidobacterium longum* and lactulose on the strenght of bone in ovariectomized osteoporosis model rats. *Bifidus*, v.7, p. 139-147, 1994. Acesso em: 31 de agosto de 2022.

KANDLER, O. and WEISS, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL, p. 1209-1234. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G.(eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2. Baltimore: Williams & Wilkins. Acesso em: 4 de outubro de 2022.

KIM, H.S.; GILLILAND, S. *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct for milk to aid lactose digestion in humans. *J. Dairy Sci.*, v. 66, p. 959-966, 1983. Acesso em: 31 de agosto 2022.

LIMA, F. Kefir: propriedades funcionais e gastronômicas. Bahia: Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015. Disponível em: <<https://scholar.google.com.br/scholar?>>. Acesso em 2 de março de 2022.

LOPITZ-OTSOA F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol.* 2006. Acesso em: 12 de agosto de 2022.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian Kefir: Structure, Microbial Communities and Chemical Composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 693-702, 2011.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M. Methods for making kefir and fermented milks based on kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 52, p. 451-456, 1985. . Acesso em: 23 de julho de 2022.

MARTINS, F.S. et al. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. [s. l.] v. 5, n. 2, p.14-20, 2005. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos: Definições, legislação e benefícios a saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*. [s. l.], v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006. Acesso em: 18 de outubro de 2022.

MORE, J. C. R. S. et al. Kefir: características microbiológicas e métodos de fabricação. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento, 2006. Disponível em: < <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/metodos-de-fabricacao> > acesso em 6 de março de 2022.

MORE, Juan C. R. S; Escola de veterinária e zootecnia. "Produção e caracterização do Kefir Saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)". Universidade Federal de Goiás (2019). Acesso em: 19 de nov.

NEVES, U. Kefir: 5 motivos para incluir a bebida fermentada na sua alimentação. VivaBem, 2020. <<https://www.uol.com.br/vivabem/noticias/redacao/2020/03/18/kefir-5motivos-para-incluir-a-bebida-fermentada-na-sua-alimentacao.amp.htm>>. Acesso em 2 de março de 2022.

OLIVEIRA, A. Leite: fatores que influenciam na acidez. Cursos CPT, 2013. Disponível em: < <https://www.cpt.com.br/cursos-bovinos-gadodeleite/artigos/leite-fatores-que-influenciamna-acidez>> Acesso em 5 de março de 2022.

PESSOA, T. R. B., Avaliação do processo de obtenção de farinha da casca de banana (*Musa sapientum*) das variedades Prata, Pacovan e Maçã. 2009.123p. Dissertação (Pós graduação em Ciência e tecnologia em Alimentos) – Programa pós-graduação. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2009. Acesso em: 5 de abril de 2022.

PRADO MR, Blandón LM, Vandenberghe LP, Rodrigues C, Castro GR, Thomaz-Soccol V, et al. Milkkefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Front Microbiol. 2015; 6:1177. acesso em 26 de março de 2022.

REA, M.C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, M. Irish kefir – like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. Journal of Applied Bacteriology, v. 81, p. 8394, 2008. Acesso em: 23 de julho de 2022.

RIBEIRO, F. Microbiota intestinal: desequilíbrio entre bactérias do sistema digestivo ameaça a saúde. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<https://ge.globo.com/euatleta/saude/noticia/microbiota-intestinal-desequilibrio-entre-bacterias-do-sistema-digestivoameaca-a-saude.ghtml>>. Acesso em 3 de março de 2022.

RODRIGUES KL, Caputo LRG, Carvalho JCT, Evangelista J, Schneedorf JM. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. Int J Antimicrob Agents. 2005. Acesso em: 12 de setembro de 2022.

SANTOS A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. Syst Appl Microbiol. 2008. Acesso em: 23 de agosto de 2022.

SANTOS, F.L., SILVA, E.O., BARBOSA, A.O., SILVA, J.O. Kefir: uma nova fonte alimentar funcional. *Diálogos & Ciência (Online)*, v. 10, p1-14, 2012. acesso em 12 de junho de 2022. Acesso em: 3 de junho de 2022.

SANTOS, H S. Origem do Kefir. Goiânia, 2019. Disponível em: <https://m.biologianet.com/curiosidades-biologia/kefir.htm>> Acesso em 3 de março de 2022.

SILVA, A. P; et al. Influência do tipo de leite bovino nas características do kefir. *Brazilian Journal of Development*, Curitiba, v.8, n.1, 2022. Disponível em <https://brazilianjournals.com> Acesso em: 2 de novembro de 2022.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, TS.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p. 1-6, 2002. Acesso em: 12 de agosto de 2022.

SNEATH, P.H.A.; KRIEG, N.R.; HOLT, J.G.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.J.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787p. Acesso em: 1 de setembro de 2022.

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2002. Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro. Acesso em: 5 de abril de 2022.

WESCHENFELDER, Simone. Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-*Escherichia coli*. 2009. INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS. Acesso em: 5 de abril de 2022.

ZOCHIO, L. B. *Biossegurança em Laboratórios de Análises Clínicas*. Academia de Ciência e Tecnologia. São José do Rio Preto, 2009. Acesso em: 3 de setembro de 2022.