



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

BRUNA KRISTYER LIMA DE PAULA

**VIABILIDADE E POTENCIAL DO KEFIR LIOFILIZADO DE CASTANHAS NA  
ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA: UM ESTUDO DE  
ESTABILIDADE E ANÁLISE SENSORIAL**

Recife  
2025

BRUNA KRISTYER LIMA DE PAULA

**VIABILIDADE E POTENCIAL DO KEFIR LIOFILIZADO DE CASTANHAS NA  
ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA: UM ESTUDO DE  
ESTABILIDADE E ANÁLISE SENSORIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Perrelli Randau

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Fonseca Marques

Recife

2025

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Paula, Bruna Kristyer Lima de.

Viabilidade e potencial do kefir liofilizado de castanhas na elaboração de uma bebida vegetal fermentada: um estudo de estabilidade e análise sensorial / Bruna Kristyer Lima de Paula. - Recife, 2025.

119 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2025.

Orientação: Karina Perrelli Randau.

Coorientação: Maria de Fátima Fonseca Marques.

Inclui referências e apêndices.

1. Microbiota; 2. Fermentação; 3. Aceitabilidade; 4. Conservação. I. Randau, Karina Perrelli. II. Marques, Maria de Fátima Fonseca. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

BRUNA KRISTYER LIMA DE PAULA

**VIABILIDADE E POTENCIAL DO KEFIR LIOFILIZADO DE CASTANHAS NA  
ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA: UM ESTUDO DE  
ESTABILIDADE E ANÁLISE SENSORIAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Farmácia

Aprovado em: 07/02/2025.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Perrelli Randau (Orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jenyffer Medeiros Campos Guerra (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Danielle Cristine Almeida Silva de Santana (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico esta dissertação à garotinha sonhadora e determinada que um dia ousou imaginar-se cientista, desejando transformar o mundo em um lugar melhor. Que o brilho do seu espírito continue a pulsar em mim, nutrindo os sonhos que, agora, começam a se concretizar.

## AGRADECIMENTOS

Pai, estou aqui cumprindo o Teu propósito. Agradeço por me permitires esta conquista, por segurares minha mão com firmeza e nunca me deixares só. Que o Teu amor continue guiando meus passos. Eu Te amo.

À minha orientadora Karina Randau, que desde o primeiro momento me ouviu, acolheu e ensinou, além de nunca permitir que eu desistisse. Você é um exemplo raro de humanidade em um mundo que tanto carece dela.

À minha coorientadora Fátima Fonseca, pelos valiosos ensinamentos profissionais e pessoais, pelo apoio constante, pela empatia e pelo amor que irradia. Que Deus continue iluminando sua vida, assim como você ilumina o caminho de tantos outros.

À professora Marina Oliveira, um exemplo de profissionalismo e pessoa ímpar, por sua paciência, dedicação e amor, que me inspiram profundamente.

Às professoras Jenyffer Campos e Danielle Santana, por contribuírem com afabilidade e cuidado para o aperfeiçoamento do meu trabalho. Que a academia possa contar com mais profissionais tão comprometidas e empáticas como vocês.

À família BioLogicus: Cristiana Najara, Moisés Matias, Gilvan Gama, Marcellly Santana, Henrique Kuster, Djalma Marques, Mykaela Rogrigues, Rita Luz e Osvaldo Freitas. Sem vocês, esta jornada seria impossível. Minha gratidão eterna.

À Thais Aline, pelo nosso raio de sol, Cecília.

À família Lima, especialmente às mulheres fortes que me inspiram – minhas tias e minha avó, Zilda Lima; ao meu tio Hary Péricles, pelo suporte nos momentos difíceis; ao meu primo Bruno Péricles, que, mesmo sem entender nada do que faço no laboratório, me estendeu a mão quando precisei; e ao meu irmão Ícaro Lima, pela sua presença inquestionável (risos). Um dia espero ser tão extraordinária quanto vocês.

Ao meu pai, Romualdo Lima, por ser o pai mais incrível que eu poderia ter. De todos os títulos que eu possa alcançar, o mais honroso será sempre o de ser sua filha.

À minha mãe, Valdirene Lima, que é mãe, pai, amiga, super-heroína e exemplo profissional, por ter sido o meu chão mesmo nos momentos em que já não tinha o seu.

Ao meu fiel amigo Shake Shakespeare de Lima, que esteve ao meu lado quando até eu mesma me questioneei se esse era um lugar bom para se estar.

Ao meu pequeno guerreiro Mavis Mavisson de Lima, que, com sua energia de pinscher destemido, me lembrou que até os menores podem ser grandes e enfrentar o mundo.

À Thomas Holanda, por sua paciência e por nunca deixar de acreditar nos meus sonhos.

À Dilza e Maurício Monteiro, cujo cuidado transborda em gestos de amor, cujas bênçãos iluminam meu caminho e cujo apoio, inestimável, é alicerce de força e gratidão na minha jornada.

Aos secretários Paulo Germano (PPGIT) e Rilvan Guedes (PPGCF), que, mesmo sem me conhecerem, me ajudaram a concluir as inscrições quando o sistema travou por dois dias.

À minha amiga Maria Lavinya Arruda da Rocha, que tornou o caminho mais leve, rosa e animado.

Ao meu amigo Kaio Souto Maior, por dividirmos os mesmos surtos com os microrganismos do kefir.

À minha anjinha da guarda, Kelly Viviane, por estar sempre presente de maneira tão especial.

Às minhas amigas Larissa Maria Barreto de Medeiros Trigueiros e Camila Gomes de Melo, por acreditarem no meu potencial desde a graduação e me motivarem a seguir em frente.

À estimada Família Aragão da Costa, com especial gratidão a Fátima, cuja essência transcende o comum, inspirando não apenas pelo que faz, mas pelo que é, um farol de humanidade e excelência profissional.

À Walquíria Correia, cuja generosidade e afeto fazem dela mais que uma madrinha incrível, um verdadeiro presente de vida. Sou grata por seu amor e por me carregar em suas orações, envolvendo-me sempre em luz e bênçãos.

À CAPES, pelo apoio essencial ao desenvolvimento das pós-graduações no Brasil.

À Universidade Federal de Pernambuco, pelo suporte e incentivo contínuos aos seus discentes.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, por proporcionar crescimento e aprendizado.

A todos do Laboratório de Farmacobotânica, por serem tão acolhedores e pacientes. Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, foram fundamentais para esta conquista, o meu mais sincero agradecimento.

“Porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém”. (Romanos, 11:36).

## RESUMO

A mudança de preferência dos consumidores por alimentos que promovem equilíbrio e saúde é evidente nos padrões de compra atuais, dando uma maior notoriedade aos alimentos funcionais, que além da nutrição básica, oferecem outros benefícios adicionais à saúde. Entre esses, os probióticos se destacam, por serem microrganismos vivos que, quando consumidos regularmente, promovem melhorias à saúde do hospedeiro. Um exemplo reconhecido é o kefir, composto por bactérias e leveduras, probióticas e não probióticas, que coexistem em simbiose. O interesse por esse alimento funcional, aliado à maior demanda por produtos livres de ingredientes de origem animal, apresenta desafios para sua produção em escala industrial. Nesse contexto, a liofilização surge como uma alternativa viável, impulsionando pesquisas e o desenvolvimento do kefir à base de extratos vegetais. Este estudo teve o objetivo de avaliar a viabilidade das bactérias lácticas e leveduras do kefir liofilizado de extratos hidrossolúveis de castanha do Brasil e castanha de caju, além de seu potencial na elaboração de uma bebida vegetal fermentada estável e da análise sensorial de ambos os produtos. Inicialmente, o inóculo líquido foi cultivado em extratos hidrossolúveis de castanha-do-brasil e castanha-de-caju para adaptação dos microrganismos ao meio vegetal, em seguida ele foi congelado e submetido ao processo de liofilização. A estabilidade do kefir liofilizado foi avaliada organolépticamente e microbiologicamente ao longo de 1 ano e 6 meses. A bebida fermentada foi formulada a partir da reidratação do kefir liofilizado em outros substratos de contendo sucos de frutas, seguida de fermentação sob condições controladas. Durante 150 dias de armazenamento refrigerado, foram monitorados pH, acidez titulável, sólidos solúveis e viabilidade microbiana de bactérias ácido-lácticas e leveduras. Para avaliação sensorial, 30 julgadores não treinados participaram de um teste de aceitação, utilizando uma escala hedônica de 7 pontos para atributos como aspecto visual, impressão geral, sabor e odor. A estabilidade e viabilidade dos microrganismos no kefir liofilizado atenderam aos requisitos microbiológicos da Instrução Normativa N. 46 de 2007 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por 1 ano e 5 meses, onde apresentaram aspecto, cor, odor e sabor apresentando aspecto homogêneo, coloração e odor característicos e sabor levemente ácido e viabilidade de  $1,67 \times 10^7$  UFC/g para bactérias ácido lácticas e  $1,83 \times 10^5$  UFC/g para leveduras. A bebida vegetal fermentada apresentou estabilidade e viabilidade durante os 5 meses avaliados, em armazenamento refrigerado, com pH variando de 3,35 a 4,0, acidez total de 0,19% a 0,24% e sólidos solúveis de 9°brix e viabilidade que permaneceu em  $2,97 \times 10^7$  UFC/g para bactérias ácido lácticas e  $3,47 \times 10^6$  UFC/g após 150 dias avaliados. A análise sensorial, que foi conduzida com 30 avaliadores não treinados, revelou boa aceitação em parâmetros como aspecto visual, impressão geral, odor e sabor, tanto para o kefir liofilizado, quanto para a bebida vegetal fermentada, reforçando o potencial de sucesso de ambos os produtos no mercado e na aplicabilidade da liofilização como método de produção em larga escala.

**Palavras-chave:** Microbiota; Fermentação; Aceitabilidade; Conservação.

## ABSTRACT

The change in consumer preferences for foods that promote balance and health is evident in current purchasing patterns, giving greater prominence to functional foods, which in addition to basic nutrition, offer other additional health benefits. Among these, probiotics stand out as they are live microorganisms that, when consumed regularly, promote improvements in the health of the host. A recognized example is kefir, composed of probiotic and non-probiotic bacteria and yeasts that coexist in symbiosis. The interest in this functional food, combined with the greater demand for products free of ingredients of animal origin, presents challenges for its production on an industrial scale. In this context, freeze-drying emerges as a viable alternative, boosting research and the development of kefir based on plant extracts. This study aimed to evaluate the viability of lactic acid bacteria and yeasts in freeze-dried kefir made from water-soluble extracts of Brazil nuts and cashew nuts, in addition to its potential in the production of a stable fermented plant-based beverage and the sensory analysis of both products. Initially, the liquid inoculum was cultivated in water-soluble extracts of Brazil nuts and cashew nuts to adapt the microorganisms to the plant medium. It was then frozen and subjected to the lyophilization process. The stability of the lyophilized kefir was evaluated organoleptically and microbiologically over a period of 1 year and 6 months. The fermented beverage was formulated from the rehydration of the lyophilized kefir in other substrates containing fruit juices, followed by fermentation under controlled conditions. During 150 days of refrigerated storage, pH, titratable acidity, soluble solids and microbial viability of lactic acid bacteria and yeasts were monitored. For sensory evaluation, 30 untrained judges participated in an acceptance test, using a 7-point hedonic scale for attributes such as visual appearance, general impression, flavor and odor. The stability and viability of microorganisms in freeze-dried kefir met the microbiological requirements of Normative Instruction No. 46 of 2007 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply for 1 year and 5 months, where they presented appearance, color, odor and flavor with a homogeneous appearance, characteristic color and odor and slightly acidic flavor and viability of  $1.67 \times 10^7$  CFU/g for lactic acid bacteria and  $1.83 \times 10^5$  CFU/g for yeasts. The fermented vegetable beverage presented stability and viability during the 5 months evaluated, in refrigerated storage, with pH ranging from 3.35 to 4.0, total acidity of 0.19% to 0.24% and soluble solids of 9°brix and viability that remained at  $2.97 \times 10^7$  CFU/g for lactic acid bacteria and  $3.47 \times 10^6$  CFU/g after 150 days evaluated. The sensory analysis, which was conducted with 30 untrained evaluators, revealed good acceptance in parameters such as visual aspect, general impression, odor and flavor, both for the freeze-dried kefir and for the fermented vegetable drink, reinforcing the potential for success of both products in the market and the applicability of freeze-drying as a large-scale production method.

**Keywords:** Microbiota; Fermentation; Acceptability; Conservation.

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO</b>  | <b>14</b> |
|              | <b>REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO 1</b>  | <b>17</b> |
| <b>2</b>     | <b>Artigo 1 – Eficácia Terapêutica de probióticos presentes na composição do kefir</b>                   | <b>17</b> |
| <b>2.1</b>   | Introdução   | <b>17</b> |
| <b>2.2</b>   | Metodologia  | <b>19</b> |
| <b>2.2.1</b> | Pergunta norteadora  | <b>19</b> |
| <b>2.2.2</b> | Material de estudo   | <b>19</b> |
| <b>2.3</b>   | Resultados e discussão   | <b>22</b> |
| <b>2.4</b>   | Conclusão  | <b>32</b> |
| <b>2.5</b>   | Referências  | <b>33</b> |
|              | <b>REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO 2</b>  | <b>36</b> |
| <b>3</b>     | <b>Artigo 2 – Métodos de produção e regulamentação do kefir</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.1</b>   | Introdução   | <b>37</b> |
| <b>3.2</b>   | Metodologia  | <b>38</b> |
| <b>3.2.1</b> | Pergunta norteadora  | <b>38</b> |
| <b>3.2.2</b> | Material de estudo   | <b>39</b> |
| <b>3.3</b>   | Revisão de literatura  | <b>41</b> |
| <b>3.4</b>   | Considerações finais   | <b>50</b> |
| <b>3.5</b>   | Referências  | <b>51</b> |
|              | <b>REVISÃO DE LITERATURA – CAPÍTULO 3</b>  | <b>54</b> |
| <b>4</b>     | <b>Artigo 3 – Impactos da utilização de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos no kefir</b> | <b>54</b> |
| <b>4.1</b>   | Introdução   | <b>55</b> |
| <b>4.2</b>   | Metodologia  | <b>57</b> |
| <b>4.2.1</b> | Pergunta norteadora  | <b>57</b> |
| <b>4.2.2</b> | Material de estudo   | <b>57</b> |
| <b>4.3</b>   | Resultados e discussão   | <b>60</b> |
| <b>4.4</b>   | Conclusão  | <b>71</b> |
| <b>4.5</b>   | Referências  | <b>72</b> |
|              | <b>DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO – CAPÍTULO 4</b>  | <b>75</b> |

|                |   |            |
|----------------|---|------------|
| <b>5</b>       | <b>HIPÓTESE</b>   | <b>75</b>  |
| <b>6</b>       | <b>OBJETIVOS</b>  | <b>75</b>  |
| <b>6.1</b>     | <b>Objetivo geral</b>   | <b>75</b>  |
| <b>6.2</b>     | <b>Objetivos específicos</b>  | <b>75</b>  |
| <b>7</b>       | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | <b>76</b>  |
| <b>7.1</b>     | <b>Materiais</b>  | <b>76</b>  |
| <b>7.1.1</b>   | <b>Reagentes e meios de cultura</b>   | <b>76</b>  |
| <b>7.1.2</b>   | <b>Equipamentos</b>   | <b>76</b>  |
| <b>7.2</b>     | <b>Métodos</b>  | <b>76</b>  |
| <b>7.2.1</b>   | <b>Obtenção da amostra</b>  | <b>76</b>  |
| <b>7.2.2</b>   | <b>Obtenção do kefir liofilizado de castanhas</b>   | <b>77</b>  |
| <b>7.2.3</b>   | <b>Elaboração da bebida vegetal fermentada</b>  | <b>78</b>  |
| <b>7.2.3.1</b> | <b>Inóculo para produção da bebida</b>  | <b>78</b>  |
| <b>7.2.3.2</b> | <b>Bebida vegetal fermentada</b>  | <b>79</b>  |
| <b>7.2.4</b>   | <b>Determinação dos parâmetros organolépticos e físico-químicos</b>   | <b>79</b>  |
| <b>7.2.5</b>   | <b>Caracterização microbiológica</b>  | <b>80</b>  |
| <b>7.2.6</b>   | <b>Análise sensorial</b>  | <b>81</b>  |
| <b>7.2.7</b>   | <b>Análise estatística</b>  | <b>82</b>  |
| <b>8</b>       | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | <b>83</b>  |
| <b>8.1</b>     | <b>Características organolépticas e físico-químicas do inóculo líquido do kefir de castanhas</b>                                    | <b>83</b>  |
| <b>8.2</b>     | <b>Avaliação da viabilidade do inóculo líquido do kefir de castanhas em comparação ao kefir liofilizado inicialmente (24 horas)</b> | <b>84</b>  |
| <b>8.3</b>     | <b>Avaliação da viabilidade do inóculo líquido do kefir de castanhas em comparação ao kefir liofilizado após 60 dias</b>            | <b>85</b>  |
| <b>8.4</b>     | <b>Avaliação das características organolépticas e viabilidade do kefir liofilizado</b>  | <b>87</b>  |
| <b>8.5</b>     | <b>Avaliação da estabilidade organoléptica e físico-química e viabilidade da bebida vegetal fermentada</b>                          | <b>93</b>  |
| <b>8.6</b>     | <b>Análise sensorial do kefir liofilizado e da bebida vegetal fermentada</b>  | <b>98</b>  |
| <b>9</b>       | <b>Considerações finais</b>   | <b>101</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | <b>102</b> |
| <b>APÊNDICE A – Métodos de produção e regulamentação do kefir</b>  | <b>108</b> |
| <b>APÊNDICE B – Eficácia terapêutica de probióticos presentes na<br/>composição do kefir</b>                   | <b>109</b> |
| <b>APÊNDICE C – Impactos da utilização de sucos de frutas e<br/>extratos vegetais como substratos no kefir</b> | <b>110</b> |
| <b>APÊNDICE D – Parecer consubstanciado do CEP</b>   | <b>111</b> |
| <b>APÊNDICE E – Termo de consentimento livre e esclarecido<br/>(TCLE)</b>                                      | <b>117</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde e o estilo de vida saudável tem levado muitas pessoas a buscarem uma constante atualização sobre os alimentos que consomem, visando a transformação de seus padrões de vida (Pereira *et al.*, 2020). Esta mudança de paradigma reflete uma crescente conscientização e interesse por parte da sociedade em adotar hábitos alimentares mais benéficos, contribuindo para uma maior valorização da importância da nutrição (Granato, 2020).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não estabelece uma definição para alimentos funcionais, mas regulamenta as alegações de propriedades funcionais e as condições para o registro de alimentos com essas alegações. De acordo com a Resolução Nº 18, de 30 de abril de 1999 (Brasil, 1999), a alegação de propriedade funcional é opcional e pode ser feita quando o alimento ou ingrediente, além de fornecer funções básicas, apresentar efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde, sem necessidade de supervisão médica. Para nutrientes amplamente reconhecidos pela comunidade científica, não é necessária a comprovação de eficácia para que a alegação seja feita na rotulagem, desde que as alegações façam referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes, e à redução de risco de doenças (Costa; Rosa, 2016; Brasil, 1999).

As alegações funcionais e de saúde permitidas pela ANVISA, estão associadas à presença de substâncias como ácidos graxos (ômega 3), carotenoides (como licopeno e luteína), fibras alimentares (beta-glucana, inulina, lactulose), fitoesteróis, polióis (manitol, xilitol, sorbitol) e probióticos (Brasil, 1999, 2002).

Os probióticos, por sua vez, são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos regularmente, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (Albuquerque *et al.*, 2021). No contexto dos alimentos funcionais com probióticos, destaca-se o kefir (ou quefir), associação simbiótica de bactérias e leveduras probióticas e não probióticas que se multiplicam em uma matriz constituída de exopolissacarídeos (EPS), estes produzidos pelos próprios microrganismos (Santos, 2015; Pereira *et al.*, 2020). Este produto se obtém por meio da fermentação entre os grãos e substratos de leite, extratos vegetais, sucos de frutas ou água açucarada (Oliveira, 2016).

Junto a isso, desafios relacionados ao consumo de leite, como intolerância à lactose, alergias e preferências dietéticas específicas, têm impulsionado a busca por alimentos livres de ingredientes de origem animal. Esse cenário motiva o desenvolvimento de produtos inovadores, incluindo a investigação de extratos vegetais e suco de frutas como substitutos viáveis ao leite animal (Costa; Dos Santos, 2020).

Embora os extratos de castanha sejam estudados há algum tempo, ainda recebem atenção limitada (Rios, 2021). No Brasil, a castanha-do-Brasil, amplamente produzida na região Norte, destaca-se não apenas pelo consumo significativo, mas também pela sua relevância nutricional. Ela é rica em fibras, minerais e compostos bioativos — como cálcio, selênio, compostos fenólicos e ácidos graxos poliinsaturados — que proporcionam diversos benefícios à saúde (Udayarajan *et al.*, 2022; Scarpelin, 2023). Por suas características sensoriais agradáveis, como sabor e aroma, é frequentemente combinada com outras oleaginosas em formulações mistas, como observado no estudo de Barbosa *et al.* (2020).

A castanha de caju também é valorizada por seu sabor característico e seu alto valor nutricional. É especialmente rica em lipídios predominantemente insaturados, proteínas de alto valor biológico, incluindo aminoácidos essenciais como a metionina, e minerais em quantidades expressivas (Machado, 2017). No Brasil, a área cultivada de castanha de caju atingiu 426,1 mil hectares em 2020, com 99,7% dessa produção concentrada no Nordeste, o que reforça sua importância econômica e para o desenvolvimento regional (Brainer, 2022).

O açazeiro (*Euterpe oleracea* Mart.) é outra planta de grande relevância na região Norte do Brasil. Seu fruto é rico em antocianinas, compostos responsáveis por sua cor roxa intensa e por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Além disso, o açáí contém ácidos graxos insaturados, como oleico e linoleico, e é uma excelente fonte de fibras, contribuindo para a regulação do colesterol. Diversos estudos destacam seus benefícios à saúde, incluindo ação cardioprotetora, redução do estresse muscular, proteção hepática, efeito neuroprotetor e potencial citotóxico contra células cancerígenas do cólon (Magalhães; Pereira, 2015).

O Brasil tem experimentado um crescimento notável na comercialização de suco de uva, com um aumento de 386,5% entre 2006 e 2015. Esse avanço é impulsionado pelos benefícios à saúde proporcionados pelos polifenóis presentes na bebida, como flavonoides, antocianinas, procianidinas, catequinas, quercetina e

resveratrol, que atuam na neutralização de radicais livres e na redução do estresse oxidativo (De Mello et al., 2017).

Embora ainda pouco explorado no Brasil, o cranberry apresenta características significativas, especialmente por sua composição rica em compostos bioativos. Composto por 88% de água, o cranberry contém uma variedade de ácidos e substâncias orgânicas, incluindo proantocianidinas (PACs), antocianidinas, flavonóis e ácidos hidroxicinâmicos. Entre esses compostos, as proantocianidinas e antocianidinas, pertencentes à classe dos taninos, se destacam pela sua função natural na defesa contra microrganismos e sua alta capacidade antioxidante (Silva; De Souza, 2021).

Dessa forma, o uso de extratos vegetais, como os de castanhas e sucos de açaí, uva e cranberry, como substratos para a fermentação do kefir, surgem como uma alternativa promissora.

De acordo com a regulamentação brasileira (Brasil, 2007), o kefir deve apresentar uma contagem mínima de microrganismos vivos, como bactérias ácido lácticas e leveduras, no produto final. Para atender a esses requisitos e produzir kefir em escala industrial, é necessário superar os desafios das metodologias convencionais, como a fermentação por grãos ou a partir da bebida fermentada. Esses métodos frequentemente enfrentam limitações, como fermentação irregular, dificuldades no controle do produto e perda de espécies-chave no processo (Nielsen *et al.*, 2014).

Técnicas como *spray drying*, liofilização, microencapsulação e o uso de culturas *starter* padronizadas surgem como alternativas inovadoras para superar essas barreiras. Entre elas, a liofilização se destaca pela preservação eficiente das propriedades microbiológicas do kefir de leite, embora enfrente desafios relacionados aos custos elevados e ao tempo de processamento (Nielsen *et al.*, 2014; Nambou *et al.*, 2014; Bozkir *et al.*, 2024; Fernandez *et al.*, 2022). Ainda assim, mais estudos são necessários para avaliar a viabilidade dessa técnica na produção em larga escala de kefir utilizando substratos de origem vegetal (Costa, 2019).

Portanto, este trabalho justifica-se pela relevância de explorar abordagens progressistas para a produção em larga escala de kefir a partir de fontes vegetais, promovendo soluções inovadoras no desenvolvimento de alimentos funcionais.

## REVISÃO DE LITERATURA- CAPÍTULO 1

### 2 Artigo 1 - Eficácia terapêutica de probióticos presentes na composição do kefir em ensaios clínicos recentes

#### RESUMO

O kefir é um consórcio de microrganismos, principalmente probióticos, com diversas propriedades terapêuticas. Este estudo integrativo analisou ensaios clínicos randomizados publicados em 2024, focando na eficácia dos probióticos presentes no kefir. A pesquisa foi realizada nas bases PubMed (MEDLINE), SciELO, ScienceDirect e Scopus. Os resultados indicaram que o kefir, devido à sua diversidade de microrganismos, pode proporcionar benefícios significativos à saúde. Entre os principais achados, destacam-se a redução de triglicérides em pacientes obesos, diminuição da gordura corporal, redução dos níveis de colesterol total, e melhora da inflamação. Além disso, foi observada a promoção do aumento da biodiversidade da microbiota intestinal, o que pode ajudar na diminuição das infecções gastrointestinais e respiratórias. Também houve redução nos escores de depressão em pacientes com síndrome do intestino irritável. Esses achados reforçam o potencial terapêutico dos probióticos do kefir e destacam a necessidade de mais pesquisas para consolidar e expandir o conhecimento sobre suas aplicações clínicas e terapêuticas.

**Descritores:** Kefir; Probióticos; Ensaio controlado randomizado.

#### ABSTRACT

Kefir is a consortium of microorganisms, mainly probiotics, with several therapeutic properties. This integrative study analyzes scientific clinical trials published in 2024, focusing on the effectiveness of probiotics present in kefir. The search was carried out in PubMed (MEDLINE), SciELO, ScienceDirect and Scopus databases. The results indicated that kefir, due to its diversity of microorganisms, can provide health benefits. Among the main findings, the reduction of triglycerides in obese patients, reduction of body fat, reduction of total cholesterol levels, and improvement of hypertension stand out. Furthermore, the promotion of increased biodiversity of the intestinal microbiota was observed, which can help reduce gastrointestinal and respiratory infections. There was also a reduction in depression scores in patients with irritable bowel syndrome. These results reinforce the therapeutic potential of kefir probiotics and highlight the need for more research to consolidate and expand knowledge about their applications and therapies.

**Descriptors:** Kefir; Probiotics; Randomized Controlled Trial.

#### 2.1 Introdução

O kefir é definido como um produto fermentado por culturas ácido-lácticas originadas dos grãos desse alimento, que incluem espécies bacterianas como

*Lactobacillus kefir*, além de variedades dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*. Essas bactérias são responsáveis pela produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos formam uma comunidade microbiana complexa, que inclui leveduras fermentadoras de lactose, como *Kluyveromyces marxianus*, e não fermentadoras de lactose, como *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*, além de bactérias como *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus Thermophilus* (Brasil, 2007).

As propriedades funcionais do kefir resultam da presença dos microrganismos probióticos que o compõe, da interação desses microrganismos com o microbioma humano, e das suas propriedades nutricionais bem reconhecidas (Giuffrè, 2024). Conseqüentemente, uma parte significativa das diretrizes estabelecidas pelo regulamento técnico para leites fermentados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que se aplicam ao kefir, foca no padrão microbiológico do produto (Brasil, 2007).

Para que um alimento seja considerado funcional e autorizado para comercialização com base em critérios de segurança e eficácia, é fundamental apresentar evidências científicas que demonstrem seus efeitos benéficos à saúde (Brasil, 1999a). Essa validação requer a realização de estudos em animais, ensaios clínicos e investigações epidemiológicas para respaldar a eficácia do produto. Além disso, é crucial compreender a composição química ou molecular do alimento para garantir que seu uso tradicional não represente riscos à saúde. Esses requisitos são fundamentados em evidências da literatura científica e estão alinhados com padrões internacionalmente reconhecidos (Brasil, 1999b).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo geral analisar o potencial terapêutico de probióticos presentes na composição do kefir na promoção da saúde humana, e como objetivos específicos realizar uma revisão integrativa da literatura para identificar ensaios clínicos randomizados que investigaram os efeitos dos probióticos do kefir, sintetizar os resultados dos estudos selecionados para avaliar o desses microrganismos em variáveis específicas de saúde e fornecer uma atualização sobre as propriedades terapêuticas encontradas e suas implicações para a prática clínica.

## **2.2 Metodologia**

Este estudo foi realizado por meio de uma revisão integrativa, que é a abordagem metodológica mais abrangente para revisões, permitindo a inclusão de estudos experimentais e não-experimentais para uma compreensão completa da questão em análise. Essa abordagem também considera variáveis como dados teóricos e empíricos da literatura, além de abranger uma ampla gama de objetivos, como a definição de conceitos, a revisão de teorias e evidências, e a análise de problemas metodológicos relacionados ao tópico (Souza; Silva; Carvalho, 2010).

### **2.2.1 Pergunta norteadora**

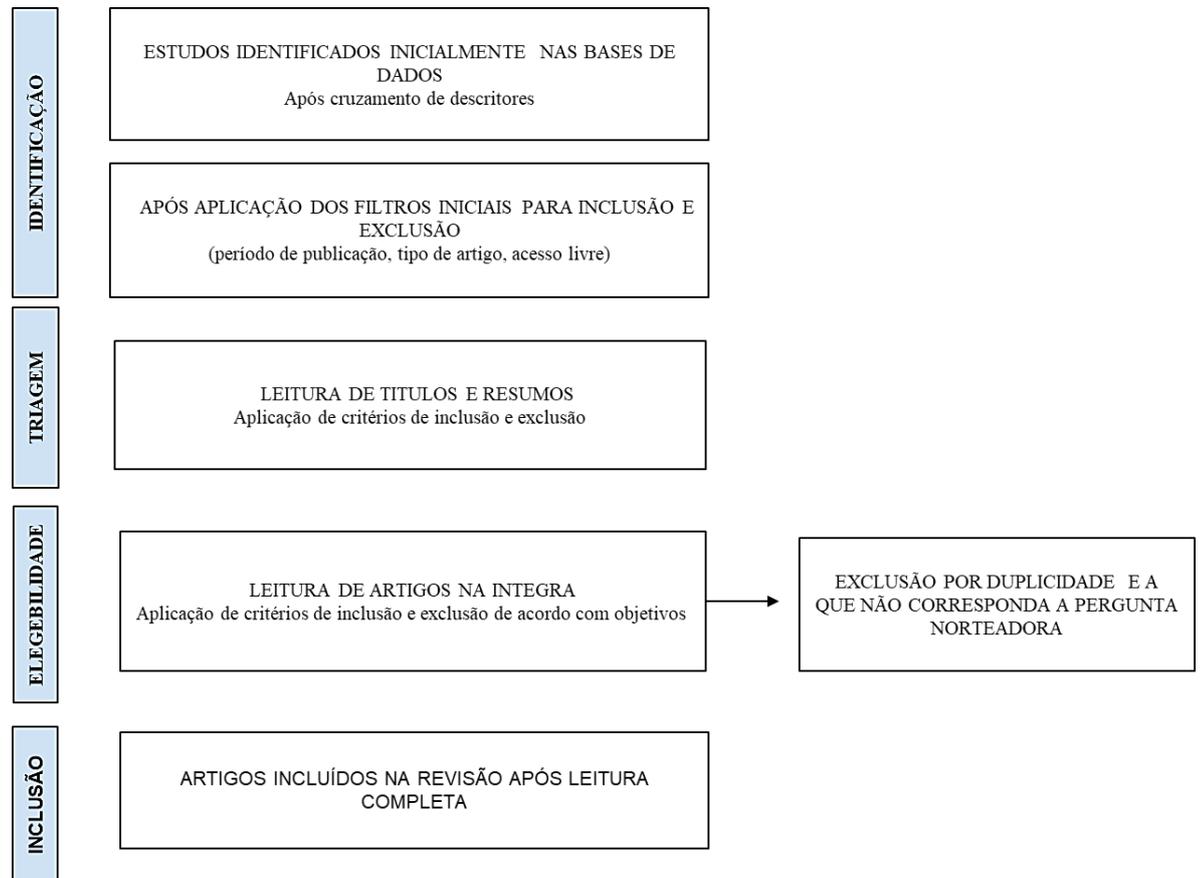
Neste trabalho, pretendeu-se elucidar o seguinte questionamento: Qual é o impacto dos probióticos presentes no kefir na promoção da saúde humana?

### **2.2.2 Material de estudo**

Para realização desta revisão, foram utilizados artigos de pesquisa, publicados em 2024, retirados das seguintes bases de dados: Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed (MEDLINE), ScienceDirect e Scopus através da plataforma Periódicos CAPES. Para pesquisa eletrônica nas bases de dados foram utilizados descritores selecionados a partir dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e incluem publicações em inglês, português e espanhol. Os descritores utilizados foram “Kefir”, “Probiotics”; “Randomized Controlled Trial”, utilizando o operador booleano “AND” entre as palavras. A pesquisa foi realizada no período de janeiro a dezembro de 2024.

Quando combinados dois a dois, utilizando Kefir ou Probiotics como descritores fixos, revelaram um número inicial total de artigos disponíveis e este foi coletado a cada busca e a cada combinação. A partir deste momento foram aplicados os critérios de inclusão (período de publicação, artigo de pesquisa e acesso livre) para filtragem inicial, coletando-se o número de artigos disponíveis. Posteriormente foi utilizado o Fluxograma PRISMA - 2020 para revisões sistemáticas (Paje *et al*, 2021) a fim de eleger os trabalhos que compõem esta revisão (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 - Fluxograma PRISMA adaptado para esta revisão integrativa da literatura.



Fonte: adaptado de Paje *et al.*, (2021)

Após a seleção inicial, através da leitura do título e resumo, e nesta triagem excluídos do número inicial os artigos duplicados e que não atendiam aos critérios de inclusão, seguiu-se para a leitura completa dos trabalhos aplicando-se os demais critérios de inclusão e exclusão (Quadro 1) para a obtenção dos estudos que atendessem aos objetivos desta revisão.

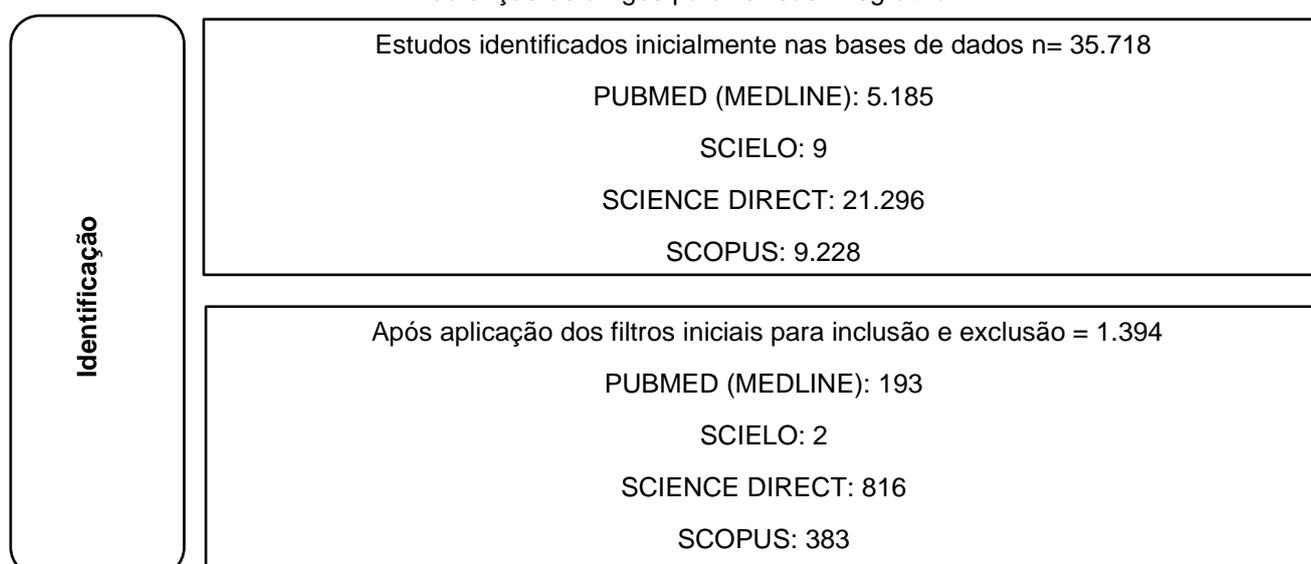
Quadro 1 – Critérios de inclusão e exclusão aplicados na seleção e elegibilidade de artigos em bases de dados eletrônicas.

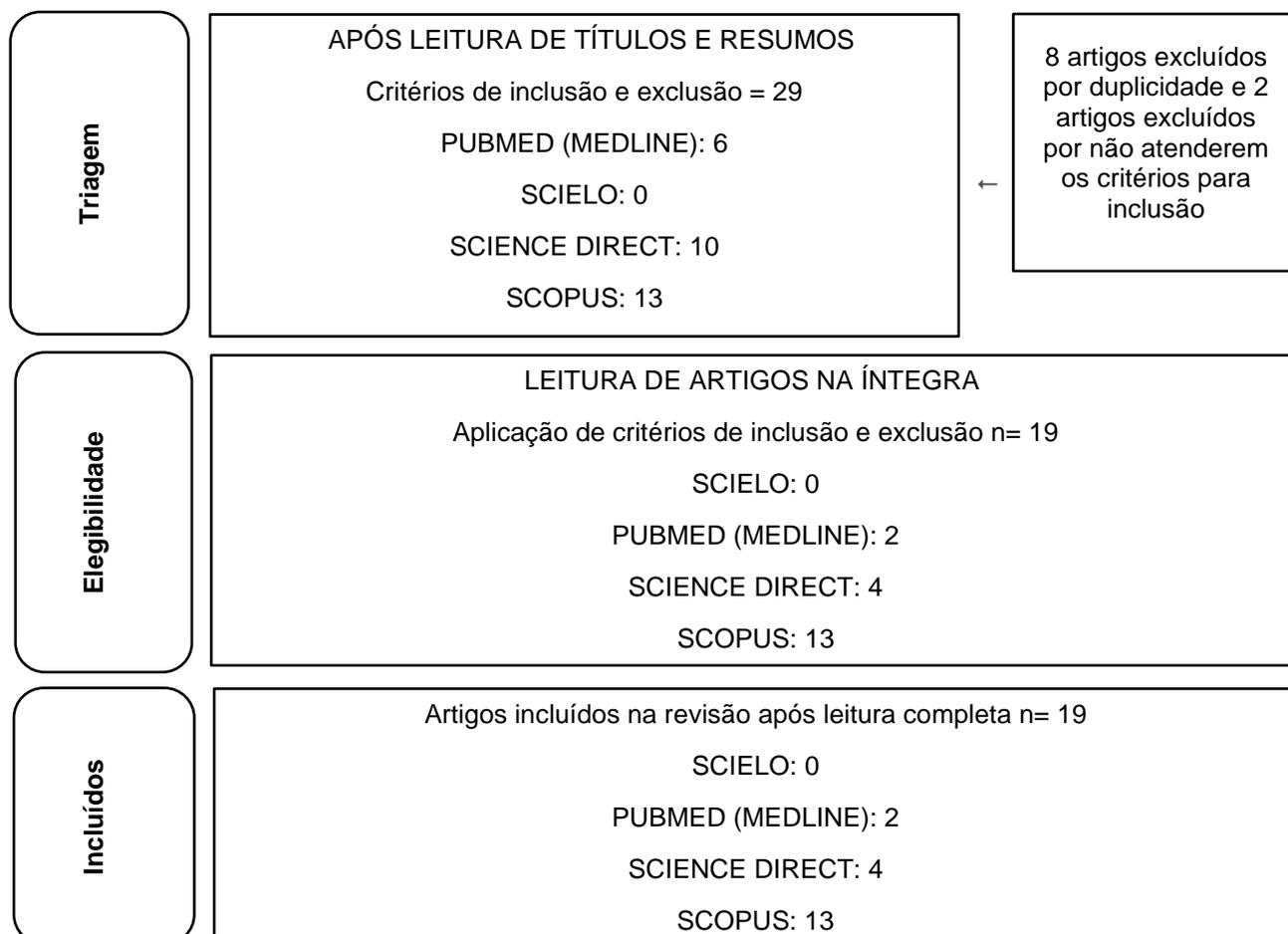
| CRITÉRIOS DE INCLUSÃO                                 | CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO   |
|---|---|
| Artigos de pesquisa publicados em 2024.               | Artigos que não fossem de cepas probióticas encontradas na composição do kefir.   |
| Disponibilidade na íntegra gratuitamente.             | Artigos que utilizassem além da cepa probiótica, outro tipo de suplemento ou excipiente na composição ou para ser administrado em conjunto. |
| Publicações das línguas: inglês, português, espanhol. | Artigos em que a quantidade de participantes do estudo fosse inferior a 30 participantes.   |
| Ensaio clínico randomizado realizado em humanos.      | Artigos em que o período de intervenção do probiótico investigado nos pacientes fosse inferior a 12 semanas.                                |
|   | Mini reviews, Carta ao editor, Capítulos de livros, Trabalhos de conclusão de curso, Resumos de congresso, Editoriais e congêneres.         |

Fonte: Autoria própria, 2024.

O cruzamento dos descritores resultou em 35.718 artigos inicialmente. Após a aplicação dos filtros iniciais, foram considerados 1.394 trabalhos para análise inicial desta revisão. Seguindo as etapas do fluxograma (Fluxograma 2), e após leitura criteriosa, foram selecionados 19 estudos para a elaboração desta revisão de literatura.

Fluxograma 2 - Fluxograma do processo de seleção eletrônica nas bases de dados para obtenção de artigos para revisão integrativa.





Fonte: Autoria própria, 2024.

## 2.3 Resultados e Discussão

A seleção dos artigos resultou em 19 publicações nos últimos 12 meses nas bases de dados analisadas. O Quadro 2 apresenta as informações gerais sobre os trabalhos, como objetivos, métodos (tipo do estudo, período de intervenção e probiótico/composição), principais resultados, principais limitações e as referências.

Quadro 2 - Descrição detalhada dos ensaios randomizados.

| OBJETIVOS  | MÉTODOS  | PRINCIPAIS RESULTADOS  | PRINCIPAIS LIMITAÇÕES   | REFERÊNCIAS   |
|--|--|--|---|---|
| Avaliar os efeitos da intervenção com o probiótico em adultos com sobrepeso ou | Estudo clínico randomizado controlado por placebo.<br>Estudo clínico randomizado e controlado por placebo com 75 participantes, dos quais 65 concluíram. | Efeitos do BBr60:<br>- Redução significativa de peso e índice de massa corporal (IMC) em comparação ao pré-tratamento e ao placebo.<br>- Melhora na bioquímica | Tamanho da amostra reduzido: o que limita generalização e detecção de pequenos efeitos. | BAI, Z. <i>et al.</i> Gut microbiome and metabolome alterations in overweight or obese adult population after weight-loss bifidobacterium |

|  |  |   |  |   |
|--|--|---|--|---|
| obesidade.   | Os elegíveis foram alocados aleatoriamente entre grupo placebo, que recebeu maltodextrina, e grupo BBr60, que consumiu BBr60 diariamente.<br><br>Período de intervenção: 12 semanas<br><br>Probiótico/composição: <i>Bifidobacterium breve</i> – BBr60   | sanguínea, com glicemia de jejum mais baixa que o placebo.  | Período curto de intervenção: o que impede avaliar sustentabilidade dos efeitos.   | breve BBr60 intervention: a randomized controlled trial. <b>International journal of molecular sciences</b> , v. 25, n. 20, p. 10871, 2024.   |
| Avaliar os resultados de crescimento e a tolerância de bebês que consumiram uma fórmula infantil contendo probióticos. | Ensaio randomizado duplo-cego.<br><br>Cento e oitenta bebês saudáveis foram incluídos neste estudo e separados em três grupos: o grupo controle (fórmula regular -infantil Youluck), o grupo <i>L. salivarius</i> AP-32 e o grupo <i>B. animalis</i> CP-9.<br><br>Período de intervenção: 16 semanas<br><br>Probiótico/composição: <i>L. salivarius</i> AP-32 e <i>B. animalis</i> CP-9. | - Peso, comprimento e circunferência da cabeça semelhantes entre os grupos.<br><br>- Microbiota: - Diversidade maior no dia 0, tornando-se mais uniforme no mês 4.<br><br>- <i>B. animalis</i> CP-9 e <i>L. salivarius</i> AP-32 suscetíveis a seis antibióticos (estreptomicina, tetraciclina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, ampicilina). | Altas taxas de abandono: (CP-9: 30%, AP-32: 50%) comprometem robustez e aumentam viés.<br><br>Baixa viabilidade bacteriana: (<10 <sup>7</sup> UFC/g no AP-32) reduz eficácia e dificulta interpretação.            | SHEN, S.P. <i>et al.</i> Assessment of the safety and gut microbiota modulation ability of an infant formula containing <i>Bifidobacterium animalis ssp. lactis</i> CP-9 or <i>Lactobacillus salivarius</i> AP-32 and the effects of the formula on infant growth outcomes: insights from a four-month clinical study in infants under two months old. <b>BMC pediatrics</b> , v. 24, n. 1, p. 840, 2024. |
| Avaliar o efeito de probióticos na doença mineral óssea (DMO) em mulheres na pós-menopausa.                            | Estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.<br><br>172 participantes elegíveis randomizados em 2 grupos (probiótico e placebo, 1:1).<br><br>Período de intervenção: 12 meses<br><br>Probiótico/composição: <i>Lactocaseibacillus</i> ( <i>L.</i> ) <i>paracasei</i> LPC100<br><i>Lactiplantibacillus</i> ( <i>L.</i> ) <i>plantarum</i> LP140                | - Redução significativa no T-score indicando desmineralização óssea foi significativa no grupo placebo, mas não no grupo probiótico.<br><br>- Vitamina D diminuiu apenas no placebo (p = 0,014).<br><br>- Melhora de sintomas gastrointestinais no grupo probiótico.  | - Ausência de análise do microbioma intestinal e biomarcadores ósseos.<br><br>- Curta duração do estudo; períodos mais longos (18-24 meses) seriam mais informativos pois as alterações ósseas ocorrem lentamente. | GŁOGOWSKA-SZELAĞ, J. <i>et al.</i> The Effect of <i>Lactocaseibacillus paracasei</i> LPC100 and <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> LP140 on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Study. <b>Journal of Clinical Medicine</b> , v. 13, n. 19, p. 5977, 2024.   |

|  |  |  |   |   |
|--|--|--|---|---|
| <p>Investigar o efeito da suplementação probiótica nos níveis de Trimetilamina-N-óxido (TMAO) em pacientes com histórico de doença cardiovascular aterosclerótica.</p> | <p>Ensaio clínico randomizado duplo-cego controlado por placebo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 30 pacientes masculinos com doença cardiovascular aterosclerótica foram randomizados.</li> <li>- Níveis de TMAO avaliados em plasma por cromatografia líquida e espectrometria de massas.</li> </ul> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição: <i>Lactobacillus plantarum</i> GLP3</p> | <p>Pacientes recebendo tratamento probiótico apresentaram uma redução significativa nos níveis de TMAO [de 284 (139) µg/L para 202,5 (96,7) µg/L; <math>p = 0,044</math>], sem nenhuma mudança significativa aparente no grupo placebo após o tratamento [de 176 (120) µg/L para 178 (150) µg/L; <math>p = 0,258</math>].</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tamanho da amostra: Estudo de centro único com amostra pequena.</li> <li>- Não considerou o estado alimentar durante o estudo.</li> <li>- Apenas 21 pacientes consentiram na análise do microbioma.</li> </ul>   | <p>SPASOVA, N. <i>et al.</i> Effect of <i>Lactobacillus plantarum</i> supplementation on trimethylamine-N-oxide levels in 30 patients with atherosclerotic cardiovascular disease: A double-blind randomized controlled trial. <b>Folia Medica</b>, v. 66, n. 5, p. 682-691, 2024.</p>  |
| <p>Comparar o efeito de pós-bióticos e probióticos vivos em pacientes com câncer colorretal (CCR) prévio de grau II e III em um ensaio clínico.</p>                    | <p>Ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.</p> <p>Trinta participantes (10 participantes em cada grupo) foram necessários neste estudo.</p> <p>Período de intervenção: 6 meses</p> <p>Probiótico/composição: <i>L.paracasei</i> SD1<br/><i>L.rhamnosus</i> SD11</p>   | <p>Os resultados sugerem que ambas as formas de <i>L. paracasei</i> e <i>L. rhamnosus</i> podem trazer benefícios para a melhoria das condições de CCR, reduzindo citocinas pró-inflamatórias, aumentando a citocina anti-inflamatória IL-10 e IL-12, reequilibrando a microbiota intestinal e reduzindo os níveis de patógenos relacionados ao câncer de cólon.</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Tamanho da amostra limitado: Com apenas 10 participantes em cada grupo, a representatividade de pode ser insuficiente para generalizações ou detecção de efeitos menores.</li> </ul>   | <p>WANITSUWAN, W. <i>et al.</i> Comparison of the effects of postbiotics and live-probiotics containing <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> SD1 and <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> SD11 in patients with previous colorectal cancer: A randomized controlled trial. <b>Journal of Functional Foods</b>, v. 123, p. 106576, 2024.</p> |
| <p>Avaliar o impacto dos probióticos na contagem de plaquetas em pacientes com câncer de ovário.</p>   | <p>Ensaio randomizado controlado por placebo.</p> <p>Cem pacientes elegíveis foram designados aleatoriamente, com 50 pacientes em cada grupo (grupo de tratamento e grupo de controle).</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probióticos/composição: <i>Bifidobacterium longum</i> JBLC-141 oral.</p>  | <p>Os probióticos orais efetivamente atenuaram os picos de contagem de plaquetas e melhoraram as funções de coagulação em pacientes com câncer de ovário com trombocitose paraneoplásica. Efeitos positivos na inflamação, níveis de marcadores tumorais e composição da microbiota intestinal também foram observados.</p>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não considerados efeitos de medicamentos como inibidores de (Poli (ADP-ribose) polimerase) PARP e bevacizumabe.</li> <li>- Período de intervenção curto (3 meses) e acompanhamento de 12 meses, necessitando mais pesquisas sobre sobrevida</li> </ul> | <p>ZHOU, X. <i>et al.</i> Probiotics alleviate paraneoplastic thrombocytopenia of ovarian cancer: A randomized placebo-controlled trial. <b>Journal of Functional Foods</b>, v. 119, p. 106316, 2024.</p>   |

|   |  |   |   |  |
|---|--|---|---|--|
|   |  |   | global com o probiótico.  |  |
| Avaliar o efeito do probiótico em sintomas subjetivos da condição física de adultos saudáveis.  | <p>Ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.</p> <p>- 200 recrutados e randomizados em dois grupos (BB536: n = 100; placebo: n = 100), com base na frequência de resfriados nos 3 anos anteriores.</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição: <i>B. longum</i> BB536</p>   | <p>- Grupo que consumiu <i>B. longum</i> BB536 teve menor incidência de febre em comparação ao placebo.</p> <p>- Sugestão de que <i>B. longum</i> BB536 pode ajudar a manter a condição física e reduzir sintomas semelhantes ao resfriado comum.</p>   | <p>- Ausência de indicadores objetivos (fezes, sangue, saliva) para esclarecer os mecanismos de supressão dos sintomas de resfriado.</p> <p>- Inclusão de muitos itens subjetivos na avaliação sem considerar a multiplicidade, o que pode ter distorcido os resultados.</p>  | XU, C. <i>et al.</i> Probiotic <i>Bifidobacterium longum</i> BB536 and its impact on subjective symptoms of physical conditions associated with common cold-like symptoms in healthy adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. <b>Journal of Functional Foods</b> , v. 115, p. 106113, 2024. |
| Investigar os papéis de bebidas lácteas cultivadas contendo probióticos na depressão e variáveis relacionadas entre participantes com síndrome do intestino irritável e depressão subliminar. | <p>Ensaio clínico paralelo, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo.</p> <p>110 participantes com SII com humor normal (NM) e depressão subliminar (DS) foram aleatoriamente designados para um dos quatro grupos de intervenção: SII-NM com placebo, SII-NM com probiótico, SII-DS com placebo e SII-DS com probiótico. Cada participante consumiu duas garrafas de leite cultivado todos os dias.</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição: <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus paracasei</i> e <i>Lactobacillus casei</i>.</p> | <p>Os escores de depressão foram significativamente reduzidos na SII-DS com probiótico e placebo em relação ao valor basal (<math>p &lt; 0,001</math>). Apenas a SII-DS com probiótico mostrou um aumento significativo nos níveis séricos de serotonina (<math>p &lt; 0,05</math>). Medidas de qualidade de vida significativamente maiores foram observadas na SII-DS com probiótico, SII-DS com placebo e SII-NM com placebo (<math>p &lt; 0,05</math>). A bebida láctea cultivada contendo <i>lactobacillus</i> de cepas duplas por meio de sua regulação de biomarcadores relevantes é um potencial agente profilático antidepressivo para pacientes com SII em risco.</p> | <p>- Uso de leite pasteurizado como transportador pode ter impactado a eficácia do probiótico.</p> <p>- Características individuais (gênero, estresse, educação) podem ter influenciado os resultados.</p> <p>- Estudantes universitários foram afetados por estresse acadêmico, impactando cortisol e função intestinal.</p> | SARKAWI, M. <i>et al.</i> A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial on <i>Lactobacillus</i> -containing cultured milk drink as adjuvant therapy for depression in irritable bowel syndrome. <b>Scientific Reports</b> , v. 14, n. 1, p. 9478, 2024.  |
| Avaliar o impacto de 6 meses de suplementação com probiótico na incidência, no primeiro ano de vida,  | <p>Ensaio multicêntrico, randomizado, prospectivo e controlado</p> <p>164 crianças nascidas por cesárea (versus 249 controles não tratados).</p>   | <p>- Suplementação probiótica reduziu dermatite atópica, infecções respiratórias e sintomas dispépticos.</p> <p>- Aumento da <math>\alpha</math>-biodiversidade da microbiota intestinal e de filas e gêneros benéficos (<i>Bacteroidota</i>,</p>   | <p>- Ausência do duplo-cego e controle com placebo, afetando a validade dos resultados.</p> <p>- Menor número de bebês no</p>   | BELLOMO, A. R. <i>et al.</i> Effect of <i>Bifidobacterium Bifidum</i> Supplementation in Newborns Born from Cesarean Section on Atopy, Respiratory Tract   |

|   |  |   |  |  |
|---|--|---|--|--|
| de atopia, infecções do trato respiratório e síndromes dispépticas  | <p>Período de intervenção: 6 meses</p> <p>Probiótico/composição: <i>B. bifidum</i></p>   | <p><i>Actinomycetota</i>, <i>Bacteroides</i>, <i>Bifidobacterium</i>).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Redução de <i>Escherichia/Shigella</i> e <i>Haemophilus</i>.</li> <li>- Suplementação com <i>B. bifidum</i> por 6 meses reduziu o risco de disbiose intestinal em crianças nascidas por cesárea, com benefícios observados até 6 meses após.</li> </ul>   | <p>grupo tratado, prejudicando a comparação.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Análise limitada da microbiota em poucos bebês e em apenas dois momentos.</li> <li>- Ausência de amostras fecais do grupo controle no início, limitando a análise comparativa.</li> </ul>  | <p>Infections, and Dyspeptic Syndromes: A Multicenter, Randomized, and Controlled Clinical Trial. <b>Microorganisms</b>, v. 12, n. 6, p. 1093, 2024.</p>   |
| Avaliar o impacto da suplementação do probiótico nos níveis plasmáticos de IGFBP-2 em indivíduos com sobrepeso submetidos a uma intervenção para perda de peso. | <p>Ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Quantificação das concentrações plasmáticas da proteína de ligação do fator de crescimento semelhante a Insulina tipo 2 (IGFBP-2) em 100 adultos com sobrepeso/obesidade.</li> <li>- Programa de redução de peso (-500 kcal/dia) combinado com <i>L. rhamnosus</i> HA-114 ou placebo.</li> </ul> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição: <i>L.rhamnosus HA-114</i></p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- O estudo confirmou que a IGFBP-2 é modulada pela restrição energética e perda de peso.</li> <li>- Mudanças nos níveis de IGFBP-2 não foram suficientes para melhorar parâmetros cardiometabólicos após 12 semanas, mesmo com suplementação probiótica.</li> <li>- Aumento na IGFBP-2 foi associado a maior perda de peso, mas não a melhorias cardiometabólicas ou comportamentais.</li> <li>- Falta de dados sobre mudanças na microbiota e a curta duração do estudo limitam a análise.</li> <li>- Mais estudos são necessários para investigar a relação de longo prazo entre a microbiota intestinal e IGFBP-2.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- A intervenção de 12 semanas pode ser muito curta para observar efeitos nos níveis de IGFBP-2.</li> <li>- Outras cepas probióticas poderiam ser mais eficazes.</li> <li>- A restrição energética pode ter mascarado os efeitos da suplementação com <i>L. rhamnosus</i> HA-114.</li> </ul> | <p>FARAMIA, J. <i>et al.</i> Effects of <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> HA-114 probiotic supplementation on circulating IGFBP-2 levels during a calorie-restricted diet in overweight humans. <b>Journal of Clinical &amp; Translational Endocrinology</b>, p. 100357, 2024.</p> |
| Avaliar a eficácia do probiótico na melhora do peso corporal, resultados relacionados à obesidade e perfis lipídicos de pessoas com sobrepeso.                  | <p>Ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo.</p> <p>36 participantes com sobrepeso foram aleatoriamente designados para um grupo probiótico ou placebo.</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- A suplementação com <i>Lactobacillus bulgaricus</i> não afetou peso, gordura ou IMC, mas reduziu significativamente os níveis de triglicerídeos no sangue.</li> <li>- A redução foi observada nas frações de triglicerídeos nas lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) e de alta densidade (HDL).</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estudo piloto com amostra pequena, o que pode afetar a significância estatística.</li> <li>- Duração curta (12 semanas) que limita a análise de efeitos a longo prazo.</li> <li>- Falta de análise da microbiota e ácidos graxos.</li> </ul>  | <p>CHU, P. Y. <i>et al.</i> The Efficacy of <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Supplementation in Managing Body Weight and Blood Lipids of People with Overweight: A Randomized Pilot Trial. <b>Metabolites</b>, v. 14, n. 2, p. 129, 2024.</p>                 |

|  |  |  |   |   |
|--|--|--|---|---|
|  | Probiótico/composição:<br><i>L. bulgaricus</i>   |  |   |   |
| Determinar a eficácia do probiótico e do pós-biótico tratado termicamente e na melhora da gravidade dos sintomas em adultos com síndrome do intestino irritável (SII). | Um estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo.<br><br>200 participantes divididos em três grupos. Duas cápsulas de ES1, HT-ES1 ou placebo foram administradas oralmente, uma vez ao dia.<br><br>Período de intervenção: 12 semanas<br><br>Probiótico/composição: <i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7347 (ES1) e <i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7347 pós-biótico tratado termicamente (HT-ES1).                      | - ES1 e HT-ES1 reduziram significativamente a gravidade dos sintomas da SII-D (diarreia), medidos por escalas de gravidade, qualidade de vida e dor abdominal, em comparação ao placebo.<br><br>- Primeiros resultados positivos para probióticos/pós-bióticos dessa cepa na população estudada. | - Multicêntrico, mas com centros apenas no mesmo país, limitando a generalização.<br><br>- Dieta não padronizada, podendo ter influenciado sintomas da SII devido a variáveis como fibras, lactose, parasitoses e diferenças entre populações.                                      | SRIVASTAVA, S. <i>et al.</i> A randomized double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety and efficacy of live <i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7347 (ES1) and heat-treated <i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7347 (HT-ES1) in participants with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. <b>Gut Microbes</b> , v. 16, n. 1, p. 2338322, 2024. |
| Avaliar a segurança e os efeitos anti-infecciosos do probiótico em um estudo piloto envolvendo bebês de 3 meses de idade.  | Estudo controlado, duplo-cego e randomizado com dois grupos.<br><br>Os bebês foram aleatoriamente designados para os grupos probiótico (PG) ou controle (GC). Todos os bebês consumiram a mesma fórmula, embora tenha sido suplementada com a cepa no PG. No geral, 160 bebês (80 por grupo) terminaram a intervenção.<br><br>Período de intervenção: 12 semanas<br><br>Probiótico/composição: <i>Bifidobacterium breve</i> DSM32583 | A fórmula com <i>B. breve</i> DSM32583 reduziu infecções que afetam os tratores gastrointestinais e respiratórios, aumentou bifidobactérias e ácidos graxos de cadeia curta nos bebês, sem eventos adversos, mostrando benefícios para a saúde intestinal.                                       | - Dados incompletos sobre características das fezes.<br><br>- Recrutamento de bebês aos 3 meses, limitando generalização para bebês mais jovens.<br><br>- Comparação com estudos anteriores que iniciaram a intervenção mais cedo, o que pode influenciar a colonização intestinal. | ALBA, C. <i>et al.</i> Evaluation of Safety and Beneficial Health Effects of the Human-Milk Strain <i>Bifidobacterium breve</i> DSM32583: An Infant Pilot Trial. <b>Nutrients</b> , v. 16, n. 8, p. 1134, 2024.   |
| Avaliar a eficácia e a segurança do probiótico na redução da gordura corporal.   | Ensaio clínico randomizado, duplo-cego e controlado por placebo<br><br>Foram incluídos 100 participantes randomizados em grupos SKO-001 ou placebo (1:1).  | Após 12 semanas, o SKO-001 reduziu significativamente gordura corporal, lipídios e adiponectina, sem causar reações adversas graves. É seguro e eficaz, com potencial para mais testes clínicos.   | O estudo foi limitado por ser de centro único, não incluir análise do microbioma, usar um teste fecal impreciso e ter duração curta. Estudos  | SHIN, S. M. <i>et al.</i> A 12-Week, Single-Centre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Design Clinical Trial for the Evaluation of the  |

|  |   |  |   |  |
|--|---|--|---|--|
|  | <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição:<br/><i>Lactiplantibacillus plantarum</i> SKO-001</p>  |  | maiores e mais longos são necessários para melhores resultados.   | Efficacy and Safety of <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> SKO-001 in Reducing Body Fat. <b>Nutrients</b> , v. 16, n. 8, p. 1137, 2024.   |
| Investigar os efeitos de probióticos na composição corporal, incluindo gordura visceral. | <p>Estudo randomizado, de grupos paralelos e controlado por placebo.</p> <p>100 participantes, com IMC entre 23 e 30, foram aleatoriamente designados para os grupos probiótico ou placebo, recebendo cápsulas correspondentes.</p> <p>Período de intervenção: 16 semanas</p> <p>Probiótico/composição:<br/><i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> (<i>B. longum</i>) BB536 e <i>Bifidobacterium breve</i> (<i>B. breve</i>) MCC1274</p>  | O grupo probiótico apresentou redução significativa na gordura visceral abdominal, gordura total e triglicerídeos, além de uma menor elevação no IMC em comparação ao grupo placebo. <i>B. longum</i> BB536 e <i>B. breve</i> MCC1274 demonstraram benefícios na composição corporal de adultos saudáveis e com sobrepeso. | O estudo incluiu apenas adultos saudáveis com sobrepeso e não permite generalização para outras populações. A duração de apenas 16 semanas revelou efeitos, mas mais pesquisas são necessárias para diferentes grupos e períodos maiores. | SATO, S. <i>et al.</i> Effects of <i>Bifidobacterium longum</i> BB536 and <i>Bifidobacterium breve</i> MCC1274 on Body Composition in Normal and Overweight Adults in Randomized Placebo-Controlled Study. <b>Nutrients</b> , v. 16, n. 6, p. 815, 2024. |
| Avaliar o papel dos probióticos no tratamento da hiperlipidemia                          | <p>Ensaio randomizado, duplo-cego, controlado por placebo e de grupos paralelos (RCT).</p> <p>Trinta e três pacientes com hiperlipidemia foram divididos em grupos probiótico e controle, recebendo atorvastatina e tratamento adicional com probióticos ou placebo, com amostras coletadas para análise.</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição:<br/>(<i>Lactobacillus casei</i> - Zhang, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. - <i>lactis</i> V9 e <i>Lactobacillus plantarum</i> - P -8)</p> | Após 3 meses de tratamento, os probióticos aumentaram a abundância microbiana intestinal, alteraram a composição de algumas bactérias e reduziram os níveis de colesterol total, triglicerídeos e lipoproteína de baixa densidade (LDL-C).   | A epidemia de coronavírus reduziu o número de pacientes e dificultou a coleta de amostras, resultando em um tamanho de amostra menor do que o esperado.   | TIAN, Y. <i>et al.</i> Probiotics combined with atorvastatin administration in the treatment of hyperlipidemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. <b>Medicine</b> , v. 103, n. 21, p. e37883, 2024.                         |
| Comparar as alterações na microbiota, níveis de  | Ensaio clínico randomizado controlado.  | A intervenção com LP N1115 aumentou a diversidade microbiana intestinal, melhorou a  | O estudo teve um tamanho de amostra pequeno, foi  | HU, Y.C. <i>et al.</i> Effects of <i>Lactobacillus paracasei</i> N1115 on  |

|   |  |   |  |  |
|---|--|---|--|--|
| <p>fatores inflamatórios e função hepática antes e depois do tratamento probiótico em pacientes com cirrose da hepatite b (HBC).</p>  | <p>160 pacientes com HBC foram divididos aleatoriamente em dois grupos: intervenção (suplementação de LP N1115 + tratamento de rotina) e controle (apenas tratamento de rotina).</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição: <i>Lactobacillus paracasei</i> (LP N1115)</p>   | <p>função hepática e reduziu fatores inflamatórios em pacientes com HBC, sugerindo um tratamento promissor para desequilíbrios microbianos.</p>   | <p>realizado em um único centro e careceu de grupo de controle com tratamento, limitando a comparação e a generalização dos resultados. Faltou estratificação para diferentes condições, e são necessários mais estudos multicêntricos.</p>  | <p>gut microbial imbalance and liver function in patients with hepatitis B-related cirrhosis. <b>World Journal of Gastroenterology</b>, v. 30, n. 11, p. 1556, 2024.</p>   |
| <p>Investigar os efeitos da suplementação de 3 meses com probióticos orais na qualidade de vida e marcadores inflamatórios em mulheres com dismenorreia primária.</p>           | <p>Ensaio randomizado controlado por placebo.</p> <p>Um total de 72 pacientes (36 pacientes em cada braço) foram randomizados para receber sachês orais contendo <i>probióticos</i> ou placebo duas vezes ao dia por 3 meses.</p> <p>Período de intervenção: 12 semanas</p> <p>Probiótico/composição: <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus casei</i>, <i>Lactobacillus lactis</i>, <i>Bifidobacterium bifidum</i>, <i>Bifidobacterium longum</i> e <i>Bifidobacterium infantis</i></p> | <p>Probióticos orais testados melhoraram a saúde mental e potencialmente reduziram o uso de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs); no entanto, não houve mudança significativa nos marcadores inflamatórios.</p>  | <p>O estudo teve um tamanho de amostra pequeno, não avaliou o impacto na microbiota intestinal e não considerou os efeitos confusos dos AINEs. A adesão foi relatada de forma tendenciosa, e a avaliação da qualidade de vida foi limitada. Além disso, o questionário usado pode não ter capturado bem a dor dismenorreica.</p> | <p>ZAKARIA, I. A. <i>et al.</i> The role of probiotics in improving menstrual health in women with primary dysmenorrhoea: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial (the PERIOD study). <b>Women's Health</b>, v. 20, p. 17455057241234524, 2024.</p>   |
| <p>Avaliar a Eficácia de suplementos probióticos no fator neurotrófico derivado do cérebro, biomarcadores inflamatórios, estresse oxidativo e função cognitiva em pacientes</p> | <p>Ensaio randomizado, duplo-cego e controlado por ativo.</p> <p>O estudo envolveu 40 participantes, divididos aleatoriamente em dois grupos, cada um tomando uma cápsula diária contendo uma combinação de cinco cepas probióticas. Avaliações de adesão foram feitas duas vezes durante o estudo.</p>  | <p>O estudo sugere que probióticos podem aumentar o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), reduzir o estresse oxidativo e aumentar antioxidantes, oferecendo benefícios potenciais para retardar o declínio cognitivo em pacientes com Alzheimer.</p> | <p>O diagnóstico de Alzheimer foi feito sem biomarcadores atualizados, e não houve acompanhamento pós-tratamento, limitando a compreensão dos efeitos a longo prazo.</p>   | <p>HSU, Y.C. <i>et al.</i> Efficacy of probiotic supplements on brain-derived neurotrophic factor, inflammatory biomarkers, oxidative stress and cognitive function in patients with Alzheimer's dementia: A 12-week randomized, double-blind active-controlled study. <b>Nutrients</b>, v. 16, n. 1, p. 16, 2023.</p> |

|                                 |  |  |  |  |
|---------------------------------|--|--|--|--|
| com demência de Alzheimer (DA). | Período de intervenção: 12 semanas<br><br>Probiótico/composição: <i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> BLI-02, <i>B. breve</i> Bv-889 e <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> CP-9, <i>B. bifidum</i> VDD088 e <i>L. plantarum</i> PL-02 |  |  |  |
|---------------------------------|--|--|--|--|

Fonte: A autoria própria, 2024.

Dos dezenove artigos analisados, dois (10,52%) eram ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos e controlados por ativo, conforme descrito por Hsu *et al.* (2024) e Hu *et al.* (2024). Outros três (15,78%) eram ensaios clínicos randomizados controlados por placebo, de acordo com Zakaria *et al.* (2024), Zhou *et al.* (2024) e Bai *et al.* (2024). Além disso, um estudo (5,26%) era randomizado, com grupos paralelos e controlado por placebo, como indicado por Sato *et al.* (2024). Dois artigos (10,52%) foram ensaios clínicos randomizados, duplo-cegos, controlados por placebo e com grupos paralelos, conforme Tian *et al.* (2024) e Zarqawi *et al.* (2024). Outro estudo (5,26%) era duplo-cego, randomizado e controlado com dois grupos, como relatado por Alba *et al.* (2024). Um estudo era randomizado duplo-cego, de acordo com Shen *et al.* (2024). Também houve um ensaio multicêntrico (5,26%) que foi randomizado, prospectivo e controlado, segundo Bellomo *et al.* (2024). Outro estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo, como indicado por Glogowska-Szelag *et al.* (2024). Finalmente, sete (34,84%) dos ensaios clínicos foram randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo, conforme Chu *et al.* (2024), Xu *et al.* (2024), Faramia *et al.* (2024), Srivastava *et al.* (2024), Shin *et al.* (2024), Wanitsuwan *et al.* (2024) e Spasova *et al.* (2024)

Apenas cinco estudos (26,31%) excederam o período de 12 semanas de intervenção: Dois com duração de 16 semanas (Sato *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2024), dois com 6 meses (Bellomo *et al.*, 2024; Wanitsuwan *et al.*, 2024) e um com 12 meses (Glogowska-Szelag *et al.*, 2024). O número de participantes nos estudos variou de 30 (Spasova *et al.*, 2024; Wanitsuwan *et al.*, 2024) a 200 (Xu *et al.*, 2024; Srivastava *et al.*, 2024). Os estudos objetivaram investigar os efeitos da suplementação com probióticos em diversas condições e populações. As intervenções foram realizadas em contextos variados, incluindo: doença de Alzheimer (Hsu *et al.*, 2024); dismenorreia primária (Zakaria *et al.*, 2024); cirrose hepática associada à hepatite B (Hu *et al.*, 2024); hiperlipidemia (Tian *et al.*, 2024); adultos saudáveis e com sobrepeso

ou obesidade (Sato *et al.*, 2024; Shin *et al.*, 2024; Bai *et al.*, 2024); bebês saudáveis (Alba *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2024); adultos com síndrome do intestino irritável (Srivastava *et al.*, 2024); adultos com sobrepeso (Chu *et al.*, 2024); indivíduos com sobrepeso em intervenção para perda de peso (Faramia *et al.*, 2024); crianças nascidas por cesárea (Bellomo *et al.*, 2024); adultos com síndrome do intestino irritável com humor normal e depressão leve (Zarqawi *et al.*, 2024); adultos saudáveis (Xu *et al.*, 2024); pacientes com câncer de ovário (Zhou *et al.*, 2024); doença mineral óssea (DMO) em mulheres na pós-menopausa (Glogowska-Szelag *et al.*, 2024); pacientes com histórico de doença cardiovascular aterosclerótica (Spasova *et al.*, 2024) e pacientes com câncer colorretal prévio de grau II e III em um ensaio clínico (Wanitsuwan *et al.*, 2024).

Nove estudos (47,36%) avaliaram os resultados da suplementação com mais de uma cepa de probiótico (Hsu *et al.*, 2024; Zakaria *et al.*, 2024; Tian *et al.*, 2024; Sato *et al.*, 2024; Srivastava *et al.*, 2024; Sarqawi *et al.*, 2024; Wanitsuwan *et al.*, 2024; Glogowska-Szelag *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2024). O gênero de probiótico mais investigado foi o *Bifidobacterium* presente 57,89% dos trabalhos incluídos (Hsu *et al.*, 2024; Zakaria *et al.*, 2024; Tian *et al.*, 2024; Sato *et al.*, 2024; Alba *et al.*, 2024; Srivastava *et al.*, 2024; Bellomo *et al.*, 2024; Zhou *et al.*, 2024; Xu *et al.*, 2024; Bai *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2024). Apenas um estudo utilizou a combinação de um probiótico com um pós-biótico (Srivastava *et al.*, 2024). Dezesesseis trabalhos (84,21%), apresentaram resultados benéficos após a intervenção com probióticos no ponto investigado no experimento. Em contraste, três estudos (15,78%) não encontraram diferenças significativas entre o grupo experimental e o grupo controle após a intervenção (Faramia *et al.*, 2024; Zakaria *et al.*, 2024; Shen *et al.*, 2024). Entre os estudos analisados, foram observados alguns resultados positivos comuns: Três estudos (Chu *et al.*, 2024; Sato *et al.*, 2024; Tian *et al.*, 2024), que representam 15,78% dos estudos, relataram efeitos positivos na redução dos níveis de triglicérides. Cinco estudos (Bellomo *et al.*, 2024; Alba *et al.*, 2024; Tian *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2024; Wanitsuwan *et al.*, 2024), correspondendo a 26,31% dos estudos, observaram aumentos na diversidade ou no reequilíbrio microbiano intestinal, resultado que converge com o que foi relatado em outros ensaios (Gan *et al.*, 2024; Mullish *et al.*, 2024). Três trabalhos (Shin *et al.*, 2024; Sato *et al.*, 2024; Bai *et al.*, 2024), encontraram efeitos positivos na redução da gordura corporal. Dois estudos (Sarkawi *et al.*, 2024; Srivastava *et al.*, 2024), correspondendo a 10,52% dos

trabalhos, relataram uma redução na gravidade dos sintomas da síndrome do intestino irritável ou de síndromes dispépticas, Mullish *et al.*, (2024) confirmam os mesmos efeitos, relatando a capacidade dos probióticos de desempenhar um papel benéfico no tratamento da SII por meio de melhorias no estado gastrointestinal e hábitos intestinais. Esses resultados indicam áreas comuns de eficácia nas situações investigadas e refletem tendências gerais observadas nos estudos.

A maioria das limitações citadas nos trabalhos está associada a três aspectos principais: seis artigos (31,57%) destacam a limitação ou falta de uma análise detalhada da microbiota (Bellomo *et al.*, 2024; Faramia *et al.*, 2024; Chu *et al.*, 2024; Shin *et al.*, 2024; Zakaria *et al.*, 2024; Glogowska-Szelag *et al.*, 2024) essa é uma limitação encontrada em outros artigos que possuem microrganismos probióticos como objeto de estudo (Noori *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2024); seis artigos (31,57%) mencionam a curta duração do estudo como uma limitação (Faramia *et al.*, 2024; Chu *et al.*, 2024; Shin *et al.*, 2024; Sato *et al.*, 2024; Glogowska-Szelag *et al.*, 2024; Bai *et al.*, 2024) fator que também foi observado no estudo de Hashemi-Mohammadabad *et al.*, (2024) e seis estudos (31,57%) identificam o tamanho pequeno da amostra como uma limitação (Chu *et al.*, 2024; Hu *et al.*, 2024; Zakaria *et al.*, 2024; Bai *et al.*, 2024; Spasova *et al.*, 2024; Wanitsuwan *et al.*, 2024). Essas limitações refletem desafios significativos na interpretação e generalização dos resultados. Considerar essas questões é crucial para futuras pesquisas, visando melhorar a validade e a aplicabilidade dos achados.

## **2.4 Conclusão**

A compilação dos dados sobre os efeitos terapêuticos dos probióticos presentes no kefir revelou avanços significativos. Embora 84,21% dos estudos indiquem benefícios claros, como melhorias na microbiota intestinal, redução de gordura corporal e triglicerídeos, algumas limitações merecem destaque. A análise detalhada da microbiota, a duração das intervenções e o tamanho reduzido das amostras foram apontados como desafios que comprometem a generalização dos resultados.

Para superar essas limitações, estudos futuros devem priorizar intervenções de maior duração e amostras mais robustas, além de aprofundar a análise das cepas probióticas e suas interações específicas com o microbioma. É essencial também controlar rigorosamente fatores de confusão, como dieta e estilo de vida, e empregar

metodologias mais rigorosas, como ensaios clínicos randomizados duplo-cegos com controle por placebo. Adicionalmente, a avaliação de variações nos efeitos terapêuticos em diferentes populações e condições de saúde é crucial para delinear melhor as aplicações práticas dos probióticos.

Portanto, a continuidade das pesquisas sobre o kefir e das cepas probióticas presentes em sua composição, são indispensáveis para consolidar o conhecimento sobre seus benefícios, fornecendo uma base sólida para aplicações clínicas e ampliando a compreensão de seu impacto na saúde humana.

## 2.5 Referências

ALBA, C. *et al.* Evaluation of Safety and Beneficial Health Effects of the Human-Milk Strain *Bifidobacterium breve* DSM32583: An Infant Pilot Trial. **Nutrients**, v. 16, n. 8, p. 1134, 2024.

BAI, Z. *et al.* Gut microbiome and metabolome alterations in overweight or obese adult population after weight-loss *Bifidobacterium breve* BBr60 intervention: a randomized controlled trial. **International journal of molecular sciences**, v. 25, n. 20, p. 10871, 2024.

BELLOMO, A. R. *et al.* Effect of *Bifidobacterium Bifidum* Supplementation in Newborns Born from Cesarean Section on Atopy, Respiratory Tract Infections, and Dyspeptic Syndromes: A Multicenter, Randomized, and Controlled Clinical Trial. **Microorganisms**, v. 12, n. 6, p. 1093, 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. 2007. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-leite-e-seus-derivados>. Acesso em: 23 jul 2024.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999**, aprova o Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999a. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398\\_30\\_04\\_1999.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html). Acesso em: 23 jul 2024.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999**, aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999b. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398\\_30\\_04\\_1999.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html). Acesso em: 23 jul 2024.

CHU, P. Y. *et al.* The Efficacy of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* Supplementation in Managing Body Weight and Blood Lipids of People with Overweight: A Randomized Pilot Trial. **Metabolites**, v. 14, n. 2, p. 129, 2024.

FARAMIA, J. *et al.* Effects of *Lacticaseibacillus rhamnosus* HA-114 probiotic supplementation on circulating IGFBP-2 levels during a calorie-restricted diet in overweight humans. **Journal of Clinical & Translational Endocrinology**, p. 100357, 2024.

GAN, L. *et al.* Therapeutic Evaluation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* MH-02 as an Adjunctive Treatment in Patients with Reflux Esophagitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Nutrients**, v. 16, n. 3, p. 342, 2024.

GIUFFRÈ, D; GIUFFRÈ, A.M. Fermentation Technology and Functional Foods. **Frontiers in Bioscience-Elite**, v. 16, n. 1, p. 8, 2024.

GŁOGOWSKA-SZELAĞ, J. *et al.* The Effect of *Lacticaseibacillus paracasei* LPC100 and *Lactiplantibacillus plantarum* LP140 on Bone Mineral Density in Postmenopausal Women: A Multicenter, Randomized, Placebo-Controlled Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 19, p. 5977, 2024.

HASHEMI-MOHAMMADABAD, N. *et al.* Adjuvant administration of probiotic effects on sexual function in depressant women undergoing SSRIs treatment: a double-blinded randomized controlled trial. **BMC psychiatry**, v. 24, n. 1, p. 44, 2024.

HSU, Y.C. *et al.* Efficacy of probiotic supplements on brain-derived neurotrophic factor, inflammatory biomarkers, oxidative stress and cognitive function in patients with Alzheimer's dementia: A 12-week randomized, double-blind active-controlled study. **Nutrients**, v. 16, n. 1, p. 16, 2023.

HU, Y.C. *et al.* Effects of *Lactobacillus paracasei* N1115 on gut microbial imbalance and liver function in patients with hepatitis B-related cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 11, p. 1556, 2024.

MULLISH, B. H. *et al.* A double-blind, randomized, placebo-controlled study assessing the impact of probiotic supplementation on the symptoms of irritable bowel syndrome in females. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 36, n. 4, p. e14751, 2024.

NOORI, M. *et al.* The effect of probiotic-fortified kefir on cardiovascular risk factors in elderly population: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. **BMC nutrition**, v. 10, n. 1, p. 74, 2024.

PAJE, M. *et al.* PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. **BMJ**, 2021, v.372, n. 160, p. 1-36, 2021. Disponível em: <http://www.bmj.com/lookup/pmidlookup?view=long&pmid=33781993>. Acesso em: 15 jul. 2024

SARKAWI, M. *et al.* A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial on *Lactobacillus*-containing cultured milk drink as adjuvant therapy for depression in irritable bowel syndrome. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9478, 2024.

SATO, S. *et al.* Effects of *Bifidobacterium longum* BB536 and *Bifidobacterium breve* MCC1274 on Body Composition in Normal and Overweight Adults in Randomized Placebo-Controlled Study. **Nutrients**, v. 16, n. 6, p. 815, 2024.

SHEN, S.P. *et al.* Assessment of the safety and gut microbiota modulation ability of an infant formula containing *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CP-9 or *Lactobacillus salivarius* AP-32 and the effects of the formula on infant growth outcomes: insights

from a four-month clinical study in infants under two months old. **BMC pediatrics**, v. 24, n. 1, p. 840, 2024.

SHIN, S. M. *et al.* A 12-Week, Single-Centre, Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Parallel-Design Clinical Trial for the Evaluation of the Efficacy and Safety of *Lactiplantibacillus plantarum* SKO-001 in Reducing Body Fat. **Nutrients**, v. 16, n. 8, p. 1137, 2024.

SOUZA, M.T. de; SILVA, M.D. da; CARVALHO, R. de. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein (São Paulo)**, v. 8, p. 102-106, 2010.

SPASOVA, N. *et al.* Effect of *Lactobacillus plantarum* supplementation on trimethylamine-N-oxide levels in 30 patients with atherosclerotic cardiovascular disease: A double-blind randomized controlled trial. **Folia Medica**, v. 66, n. 5, p. 682-691, 2024.

SRIVASTAVA, S. *et al.* A randomized double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety and efficacy of live *Bifidobacterium longum* CECT 7347 (ES1) and heat-treated *Bifidobacterium longum* CECT 7347 (HT-ES1) in participants with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. **Gut Microbes**, v. 16, n. 1, p. 2338322, 2024.

TIAN, Y. *et al.* Probiotics combined with atorvastatin administration in the treatment of hyperlipidemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Medicine**, v. 103, n. 21, p. e37883, 2024.

WANITSUWAN, W. *et al.* Comparison of the effects of postbiotics and live probiotics containing *Lactocaseibacillus paracasei* SD1 and *Lactocaseibacillus rhamnosus* SD11 in patients with previous colorectal cancer: A randomized controlled trial. **Journal of Functional Foods**, v. 123, p. 106576, 2024.

XU, C. *et al.* Probiotic *Bifidobacterium longum* BB536 and its impact on subjective symptoms of physical conditions associated with common cold-like symptoms in healthy adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Journal of Functional Foods**, v. 115, p. 106113, 2024.

ZAKARIA, I. A. *et al.* The role of probiotics in improving menstrual health in women with primary dysmenorrhoea: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial (the PERIOD study). **Women's Health**, v. 20, p. 17455057241234524, 2024.

ZHANG, Q. *et al.* Efficacy of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BL-99 in the treatment of functional dyspepsia: a randomized placebo-controlled clinical trial. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 227, 2024.

ZHOU, X. *et al.* Probiotics alleviate paraneoplastic thrombocytopenia of ovarian cancer: A randomized placebo-controlled trial. **Journal of Functional Foods**, v. 119, p. 106316, 2024.

## REVISÃO DE LITERATURA - CAPÍTULO 2

### 3 Artigo 2 - Métodos de produção e regulamentação do kefir

#### RESUMO

**Objetivo:** Analisar os métodos de produção/fermentação do kefir, com foco na perspectiva industrial e nas implicações para a qualidade diante da legislação do produto. **Revisão Bibliográfica:** Foram encontrados dois métodos principais para a produção de kefir: o tradicional, que envolve a fermentação dos grãos com substrato a temperatura ambiente e a posterior separação por filtração, e o industrial, que inclui métodos como o russo e o backslopping, que utilizam parte da bebida fermentada como cultura iniciadora para novos lotes. Esses métodos enfrentam desafios na padronização e na preservação da microbiota do produto final, o que não é aceito pela legislação brasileira. Em contraste, processos de secagem, como *spray dryer* e liofilização ou ainda técnicas de microencapsulação e o uso de culturas starter padronizadas, surgem como alternativas inovadoras e promissoras para resolver esses problemas. A liofilização destaca-se por preservar melhor as propriedades microbiológicas do kefir, embora apresente desvantagens, por ter custos elevados e exigir mais tempo para realizar o processo. **Considerações finais:** É essencial adotar tecnologias avançadas e promover pesquisas contínuas, com colaboração entre produtores, pesquisadores e reguladores, para aprimorar a produção industrial do produto e garantir conformidade com as normas regulatórias.

**Descritores:** Kefir; Produção de alimentos; Liofilização; Fermentação.

#### ABSTRACT

**Objective:** Analyze kefir production/fermentation methods, focusing on the industrial perspective and the implications for quality in light of product legislation. **Bibliographical Review:** Two main methods were found for the production of kefir: the traditional one, which involves the fermentation of grains with substrate at room temperature and subsequent separation by filtration, and the industrial one, which includes methods such as Russian and backslopping, which they use part of the fermented drink as a starter culture for new batches. These methods face challenges in standardizing and preserving the microbiota of the final product, which is not accepted by Brazilian legislation. In contrast, drying processes, such as spray drying and freeze-drying or even microencapsulation techniques and the use of standardized starter cultures, emerge as innovative and promising alternatives to solve these problems. Freeze-drying stands out for better preserving the microbiological properties of kefir, although it has disadvantages, as it has high costs and requires more time to carry out the process. **Final considerations:** It is essential to adopt advanced technologies and promote continuous research, with collaboration between producers, researchers and regulators, to improve the industrial production of the product and ensure compliance with regulatory standards.

**Descriptors:** Kefir; Food production; Freeze drying; Fermentation.

### 3.1 Introdução

A crescente preocupação com a saúde e o estilo de vida saudável tem levado muitas pessoas a buscarem uma constante atualização sobre os alimentos que consomem, visando a transformação de seus padrões de vida (Pimentel *et al.*, 2021). Esta mudança de paradigma reflete uma conscientização cada vez maior sobre a relação entre nutrição e bem-estar, o que impulsiona uma valorização significativa da importância de alimentos que promovam benefícios adicionais à saúde, além de fornecerem nutrientes essenciais (Giuffrè, 2024).

Nesse contexto, os alimentos funcionais têm conquistado um destaque cada vez maior, não apenas no consumo cotidiano, mas também como objeto central de diversas pesquisas científicas e iniciativas da indústria alimentícia. Esses alimentos, desempenham um papel relevante na prevenção de doenças e na promoção de uma melhor qualidade de vida. Dentro desse amplo universo de alimentos funcionais, os probióticos se destacam como um dos grupos mais estudados, devido ao impacto positivo que exercem na microbiota intestinal e, conseqüentemente, na saúde geral do organismo, sendo frequentemente investigados por seu potencial em auxiliar na superação de diversos desafios atrelados à saúde (Tavares *et al.*, 2022).

O kefir, que se enquadra como um alimento funcional probiótico, tem sido tradicionalmente produzido pela fermentação de leite ou água utilizando grãos simbióticos formados por uma complexa comunidade de bactérias ácido-láticas e leveduras. Este alimento se destaca por ter microrganismos probióticos e não probióticos em sua composição, além da sua capacidade de beneficiar a saúde intestinal. Tal relevância é reforçada pela regulamentação brasileira vigente, como a do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que, desde 2007, estabelecem exigências rigorosas quanto à contagem mínima de microrganismos vivos presentes no produto final (Brasil, 2007). Estudos científicos apontam que o consumo regular de kefir pode trazer uma série de benefícios à saúde, incluindo o fortalecimento do sistema imunológico, o equilíbrio da microbiota intestinal e a prevenção de doenças metabólicas, corroborando seu valor funcional (Rosa, 2017).

Entretanto, apesar de sua popularidade e reconhecidos benefícios, a produção de kefir em larga escala apresenta desafios significativos que demandam atenção e inovação. Entre as principais dificuldades estão a irregularidade nos processos de fermentação, que pode comprometer a uniformidade do produto, e o controle de

qualidade, especialmente no que se refere à preservação das espécies-chave de microrganismos ao longo do processo fermentativo. Esses desafios técnicos, ressaltam a necessidade urgente de aprimoramentos metodológicos e soluções tecnológicas que possam garantir maior eficiência, estabilidade do produto e plena conformidade com a regulamentação brasileira, visando atender às exigências do mercado e às expectativas dos consumidores (Nielsen *et al.*, 2014).

Diante do exposto, esta revisão narrativa tem como objetivo aprofundar e ampliar o debate acerca dos métodos utilizados para a produção de kefir em escala industrial no contexto nacional, um tema que ganha relevância à medida que a demanda por alimentos funcionais cresce de forma expressiva. A análise proposta abrange os desafios específicos associados a essas metodologias, que incluem questões técnicas, econômicas e regulatórias, ao mesmo tempo em que explora alternativas tecnológicas inovadoras e promissoras que possam contribuir para a superação dessas barreiras. Ademais, a revisão busca evidenciar os aspectos que ainda necessitam de aprimoramentos, seja no âmbito dos processos produtivos, na qualidade e na adaptação às normas estabelecidas.

## **3.2 Metodologia**

Este estudo trata-se de uma revisão narrativa. A revisão narrativa caracteriza-se por sua abordagem ampla, descritiva e discursiva, voltada para a análise e interpretação de produções científicas existentes sobre um tema específico, seja em termos teóricos ou contextuais. Esse tipo de revisão facilita a identificação de lacunas no conhecimento e serve como base para futuras pesquisas, permitindo ao leitor atualizar-se sobre uma temática de forma objetiva e em curto prazo (Atallah; Castro *et al.*, 1997).

### **3.2.1 Pergunta norteadora**

Neste trabalho, pretendeu elucidar o seguinte questionamento: “Qual é o impacto dos métodos predominantes de produção do kefir na sua complexidade microbiana, considerando a perspectiva industrial, e quais são as alternativas propostas para mitigar os desafios associados a esses métodos?”.

### **3.2.2 Material de estudo**

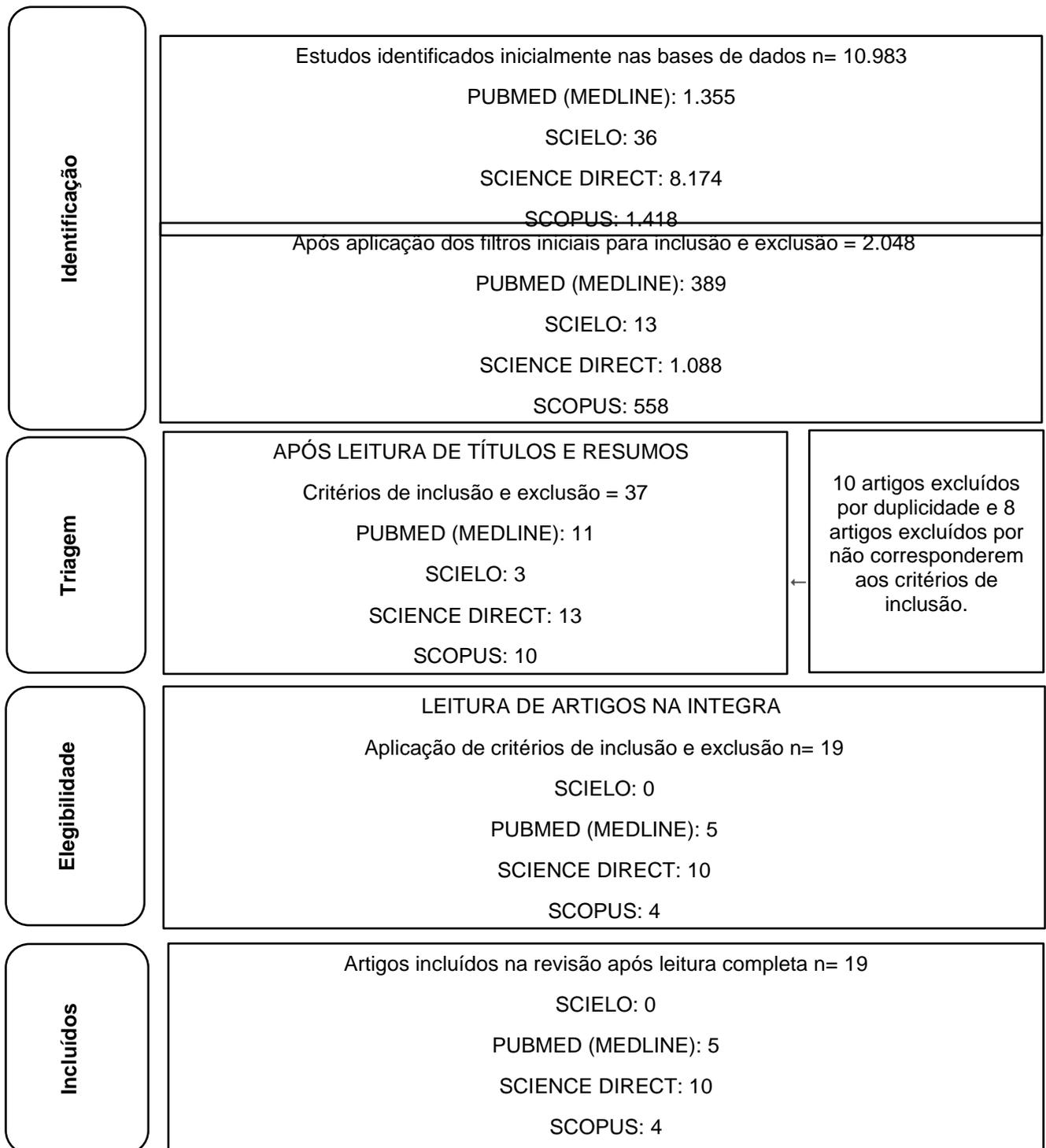
Para realização desta revisão, foram utilizados artigos, publicados entre 2004 e 2024, retirados das seguintes bases de dados: Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed (MEDLINE), Science Direct e Scopus através da plataforma Periódicos CAPES. Para pesquisa eletrônica nas bases de dados foram utilizados descritores selecionados a partir dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e incluem publicações em inglês, português e espanhol.

Os descritores utilizados foram “Kefir”, “Food production”, “Freeze drying”; “Fermentation”, utilizando o operador booleano “AND” entre as palavras. Quando combinados dois a dois, utilizando “Kefir” como descritor fixo, revelaram um número inicial total de artigos disponíveis e este foi coletado a cada busca e a cada combinação. A partir deste momento foram aplicados os critérios de inclusão (período de publicação, artigos de pesquisa, artigos de revisão e acesso livre) para filtragem inicial, coletando-se o número de artigos disponíveis. Posteriormente foi utilizado o Fluxograma PRISMA - 2020 (Paje *et al*, 2021) a fim de eleger os trabalhos que compõem esta revisão.

Após a seleção inicial, através da leitura do título e resumo, e nesta triagem excluídos do número inicial os artigos duplicados e que não atendiam aos critérios de inclusão, seguiu-se para a leitura completa dos trabalhos aplicando-se os demais critérios de inclusão: Artigos que descrevessem o método de produção utilizado; artigos que utilizassem métodos tradicionais ou industriais para produção do kefir; artigos que trouxessem inovações referentes a métodos de produção em escala industrial do kefir e exclusão: Carta ao editor; capítulos de livros; trabalhos de conclusão de curso; resumos de congresso; editoriais e congêneres. Para obtenção dos estudos que atendessem aos objetivos desta revisão. Foram eleitos ao final, os estudos que após aplicação de critérios de inclusão e exclusão respondessem à questão norteadora. Foram coletados dados sobre o número de trabalhos inicialmente relacionados em cada base de dados e o número de exclusões a cada etapa do processo de seleção.

A partir do cruzamento dos descritores, inicialmente, obteve-se 10.983 artigos inicialmente, e com aplicação dos filtros iniciais foram considerados 2.048 trabalhos para análise inicial nesta revisão. Para o refinamento seguiu-se as etapas do fluxograma (Fluxograma 1) e após leitura criteriosa foram eleitos 19 trabalhos para elaboração desta revisão de literatura.

Fluxograma 1 - Fluxograma do processo de seleção eletrônica nas bases de dados para obtenção de artigos para revisão narrativa.



Fonte: Autoria própria, 2024.

### 3.3 Revisão de literatura

#### **Importância da qualidade microbiológica do kefir segundo a legislação brasileira**

No que tange a relevância da qualidade microbiológica diante da legislação sobre kefir, a composição microbiana dos grãos pode variar de acordo com diversos fatores, incluindo a origem geográfica, o tempo de fermentação, o substrato utilizado para a multiplicação, os métodos de incubação e crescimento dos grãos, assim como os procedimentos empregados em sua manipulação (Altlay *et al.*, 2013). Os grãos de kefir consistem em três grupos de microrganismos que coexistem em uma relação simbiótica. A diversidade desses microrganismos inclui bactérias ácido-láticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras, os quais coexistem em uma matriz composta por um polissacarídeo natural conhecido como kefiran (Puerari *et al.*, 2012).

As propriedades funcionais do kefir derivam dos microrganismos probióticos que o compõem e da interação desses microrganismos com o microbioma humano, além das suas propriedades nutricionais reconhecidas (Giuffrè, 2024), conseqüentemente, uma parte significativa das diretrizes estabelecidas pelo regulamento técnico de identidade e qualidade para leites fermentados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, destinado também ao kefir, enfoca as características microbiológicas essenciais. Entre essas especificações, inclui-se a exigência de uma contagem mínima de  $10^7$  unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g) de bactérias lácticas totais e uma contagem mínima de  $10^4$  (UFC/g) de leveduras específicas. Adicionalmente, o regulamento requer a pesquisa por microrganismos do grupo de Coliformes/g (30°C), Coliformes/g (45°C) e Bolores e leveduras/g não específicos, com o intuito de fiscalizar o controle higiênico sanitário (Brasil, 2007).

No que diz respeito à identidade, a mesma define kefir como o produto cuja fermentação é realizada com cultivos ácido-láticos elaborados a partir de grãos de kefir, envolvendo espécies bacterianas como *Lactobacillus kefir*, bem como variedades dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, responsáveis pela produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir, por sua vez, consistem em uma complexa comunidade microbiana que engloba leveduras fermentadoras de lactose, como *Kluyveromyces marxianus*, e leveduras não fermentadoras de lactose, como *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces*

*cerevisae* e *Saccharomyces exiguus*, além de bactérias como *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (Brasil, 2007).

Além dos parâmetros microbiológicos, a legislação brasileira também busca promover a padronização e a qualidade sensorial do kefir. Características como sabor, aroma e textura estão intrinsecamente ligadas ao equilíbrio entre os microrganismos que compõem os grãos e o substrato utilizado para a fermentação, podendo ser influenciadas por variações no processo de fabricação. Esta regulamentação, portanto, visa não apenas garantir a segurança alimentar, mas também preservar a identidade do kefir como um produto tradicional e funcional, reconhecido por suas propriedades probióticas e benefícios à saúde. Este enfoque é essencial para assegurar a confiança dos consumidores e fomentar o crescimento sustentável do mercado de produtos fermentados no Brasil (Dodo *et al.*, 2023).

Logo, é evidente que a legislação brasileira destaca fortemente as características microbiológicas do kefir, expondo que sua importância está relacionada às propriedades funcionais do produto. Assim, é essencial escolher com cuidado o método de produção, pois ele pode afetar a quantidade e a identidade microbiológica do produto final.

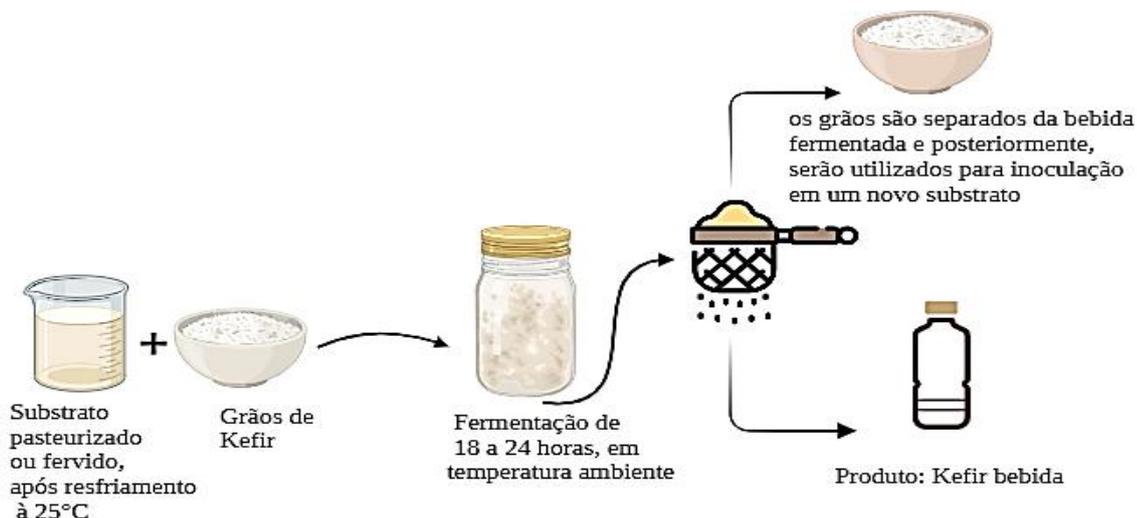
### **Comparação dos métodos de produção de kefir: tradicional, russo e backslopping**

Foram encontradas duas abordagens principais para a produção de kefir: o método tradicional e o industrial (Kim *et al.*, 2018). No método tradicional, os grãos de kefir são incubados juntamente com o substrato, que foi previamente pasteurizado ou fervido, e resfriado em temperatura ambiente. A fermentação pode se estender por 24 horas até atingir um pH ácido, momento em que os grãos são retirados por meio de filtração. O produto final é o kefir, que deve ser armazenado refrigerado. Os grãos removidos podem ser reutilizados para iniciar novas produções de kefir (Rosa *et al.*, 2017; Farag *et al.*, 2020), esse processo é demonstrado na Figura 1.

Os grãos de kefir têm a capacidade de se reproduzir à medida que são cultivados. Inicialmente, observa-se um aumento de tamanho, seguido pela subdivisão em novos grãos que mantêm o equilíbrio microbiológico presente nos grãos originais. Normalmente, o crescimento médio diário dos grãos é de aproximadamente 5% para os grãos de leite e cerca de 45% para os grãos de água. Contudo, é importante notar que esse crescimento pode ser influenciado por diversos fatores, como a não lavagem

dos grãos, a ausência de pressão na peneira e a agitação periódica do frasco de fermentação durante o processo (Azizi, 2021).

Figura 1 - Processo de produção do Kefir pelo método tradicional, a partir de grãos.

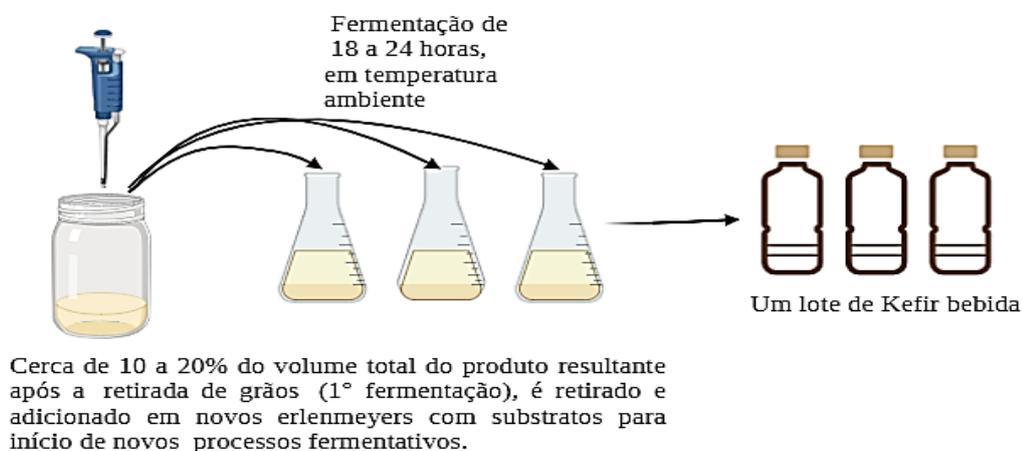


Fonte: Autoria Própria, criado com BioRender.com (2024)

A presença de fermentação láctica e alcoólica no kefir contribui para aumentar sua bioacessibilidade, tornando-o mais nutritivo. Durante a fermentação à temperatura ambiente, ocorre a proteólise das proteínas do leite, que são quebradas em peptídeos menores, resultando no acúmulo de aminoácidos o que torna a bebida mais facilmente digestível em comparação com o leite original. Na fase de maturação, enquanto o álcool e o CO<sub>2</sub> são produzidos, ocorre também o acúmulo de vitaminas do complexo B. Essas vitaminas são características do metabolismo das leveduras presentes no processo de fermentação, adicionando ainda mais valor nutricional ao kefir (Leite *et al.*, 2013).

Uma alternativa ao método de produção no âmbito industrial é o conhecido "método russo". Nesse método, utiliza-se o produto resultante da retirada dos grãos de kefir após a primeira fermentação como cultura iniciadora, possibilitando fermentações em sequência (Nielsen *et al.*, 2014) Esse processo é demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Processo de produção do kefir pelo método industrial a partir do método Russo.



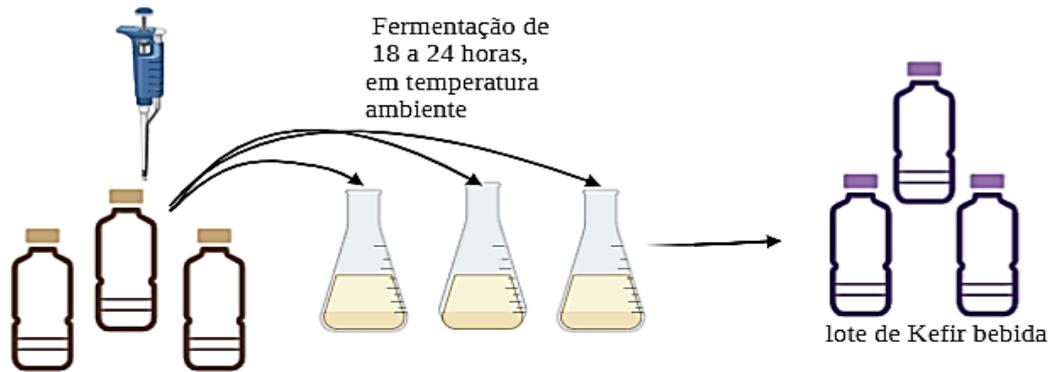
Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com (2024)

Além dos métodos tradicional e russo, destaca-se também o método backslopping como uma alternativa amplamente utilizada em pequenas produções e indústrias artesanais de kefir. No backslopping, parte do kefir produzido (sem a presença dos grãos) é utilizada como inóculo para novas fermentações. Este processo é demonstrado na Figura 3. O backslopping se assemelha ao método russo em termos de reutilização de culturas, mas possui uma diferença crucial: enquanto o método russo se baseia na retirada dos grãos para a obtenção do inóculo, o backslopping usa o produto fermentado como um todo, o que pode influenciar na composição microbiana e na consistência do produto final ao longo de ciclos consecutivos (Frag *et al.*, 2020). Embora seja uma técnica prática e de menor custo, sua desvantagem está na redução gradual da diversidade microbiana, podendo comprometer as propriedades probióticas ao longo do tempo (Azizi, 2021).

Os métodos russos e backslopping são frequentemente preferidos em contextos em que há necessidade de escalonamento da produção sem uma dependência direta dos grãos de kefir. No entanto, ambos apresentam desafios em relação à padronização microbiológica e sensorial do produto final. A ausência dos grãos durante fermentações subsequentes pode alterar o perfil simbiótico original, resultando em mudanças na produção de metabólitos secundários, como ácidos orgânicos e vitaminas do complexo B. Por outro lado, o método tradicional, apesar de ser mais laborioso e passível de contaminação cruzada, preserva a biodiversidade

dos microrganismos e mantém as características sensoriais e nutricionais originais do kefir, sendo amplamente adotado em produções domésticas e artesanais onde a autenticidade do produto é priorizada (Kim *et al.*, 2018).

Figura 3 - Processo de produção do kefir pelo método industrial a partir do método backslopping.



Cerca de 10 a 20% do volume total de garrafas advindas de um lote da bebida fermentada, é retirado e adicionado em novos erlenmeyers com substratos para início de novos processos fermentativos, resultando num lote derivado de outro.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com (2024)

Todos os métodos citados compartilham de adversidades que prejudicam a qualidade do produto final, tornando sua utilização arriscada. O Quadro 1 evidencia os desafios encontrados nesses métodos de produção.

Quadro 1- Métodos de produção do kefir e os desafios encontrados no processo.

| MÉTODOS  | DESAFIOS  | AUTORES (ANO)  |
|--|---|--|
| Método tradicional a partir de grãos de kefir com substrato. | Do ponto de vista industrial, a prática não é atrativa, pois a recuperação dos grãos no final do processo é laboriosa e pouco viável em termos práticos. Além disso, a diversidade da microbiota presente nos grãos de kefir dificulta sua utilização, resultando em fermentações que são lentas, irregulares e afetam negativamente a padronização do produto final. | Nielsen <i>et al.</i> , 2014<br>Nambou <i>et al.</i> , 2014<br>Bozkir <i>et al.</i> , 2024 |
| Método industrial: método russo.                             | O processo pode gerar alterações microbianas no produto final e algumas espécies-chave da fermentação podem ser perdidas ao longo do tempo, como <i>Lentilactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> e <i>Lentilactobacillus parakefiri</i>  | Nielsen <i>et al.</i> , 2014   |
| Método industrial: Técnica de backslopping.                  | O método também pode ocasionar mudanças na composição microbiana do produto final, levando à perda de certas espécies fundamentais para a fermentação ao longo do tempo.  | Nielsen <i>et al.</i> , 2014<br>Fernandes <i>et al.</i> , 2022                             |

Fonte: Autoria própria (2024)

Em síntese, a análise dos métodos de produção de kefir — tradicional, russo e backslopping — revela que cada abordagem enfrenta desafios significativos que comprometem sua viabilidade industrial. O método tradicional, embora eficiente em escala pequena, apresenta limitações na recuperação e reutilização dos grãos, além de dificuldades na uniformização do produto final devido à variedade microbiana. O método russo, embora permita fermentações em sequência, pode resultar em alterações microbianas indesejadas, tendo como consequência a perda de espécies essenciais para a caracterização e qualidade do kefir. Por sua vez, a técnica de backslopping, amplamente utilizada na indústria, também enfrenta problemas relacionados à variação na composição microbiana e na consistência do produto final, que vão sendo afetados aos poucos. Esses desafios evidenciam que, apesar dos méritos individuais de cada método, a adaptação e a implementação desses processos em uma escala industrial ampla ainda são problemáticas. A complexidade e as dificuldades associadas à manutenção da identidade e qualidade do kefir demonstram que esses métodos, na prática, não se mostram viáveis para atender às demandas da produção industrial moderna.

Portanto, a produção de kefir em larga escala exige inovações que combinem os benefícios das abordagens tradicionais com a eficiência requerida pela indústria moderna. A pesquisa por métodos híbridos, que unam a preservação da diversidade microbiana dos grãos de kefir com a praticidade dos sistemas contínuos, é uma das principais áreas de desenvolvimento. Alternativas como o uso de culturas starter padronizadas, replicando a composição simbiótica dos grãos originais, têm sido propostas para superar as limitações de consistência e padronização. Além disso, o avanço em tecnologias de encapsulamento de microrganismos promete maior controle sobre a diversidade microbiológica e a viabilidade das culturas durante o processo industrial (Nielsen *et al.*, 2014; Azizi, 2021).

Outro ponto relevante a ser considerado é o desenvolvimento de regulamentações específicas que sejam adequadas às particularidades e especificidades envolvidas no processo de produção industrial do kefir. Essas regulamentações devem garantir, de maneira integral, não apenas a segurança microbiológica dos produtos, mas também a preservação e a manutenção de suas propriedades funcionais e probióticas, que constituem seus principais benefícios para a saúde.

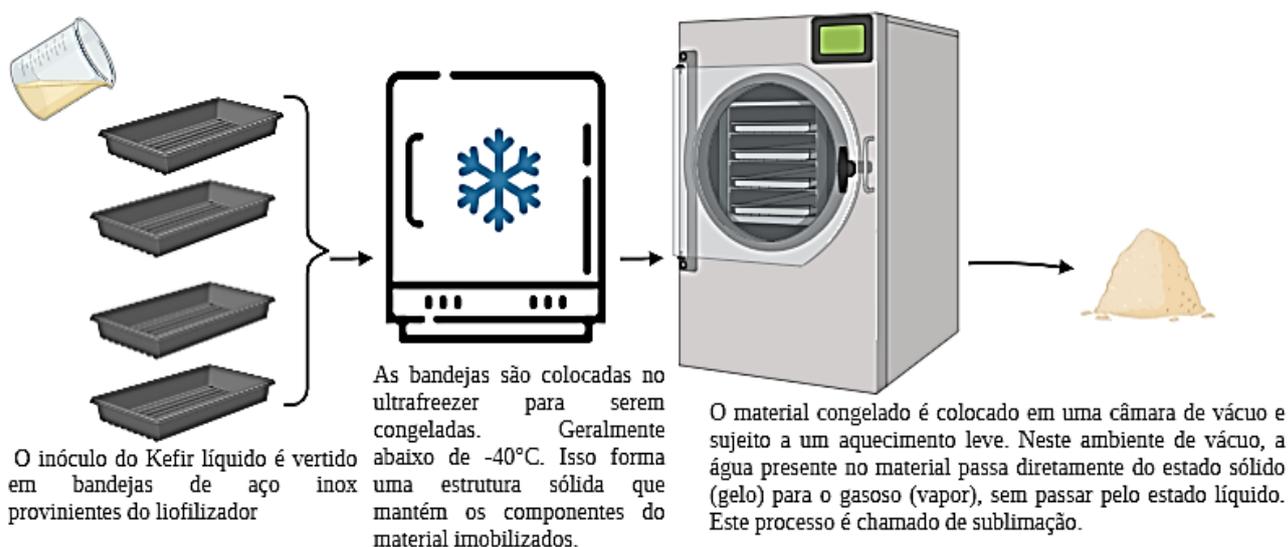
A combinação estratégica entre os avanços tecnológicos mais recentes e a implementação de legislações bem estruturadas pode representar uma solução viável para expandir a produção de kefir em escala industrial. Esse cenário permitiria atender à crescente demanda do mercado sem, no entanto, comprometer a autenticidade e as características nutricionais que tornam o kefir um alimento diferenciado e único. Logo, ao alinhar inovação, tecnologia e diretrizes regulatórias eficientes, seria possível criar um ambiente favorável para a produção em larga escala, assegurando qualidade, segurança e eficácia dos benefícios oferecidos por esse alimento funcional.

### **Abordagens inovadoras como substitutos a esses métodos**

Alguns trabalhos indicam que a produção industrial de kefir em países como Alemanha e França apresenta perspectivas promissoras. Nestes locais, a produção não envolve diretamente os grãos de kefir ou uma porção do lote anterior, em vez disso, é realizada a partir de uma cultura inicial que contém as bactérias e leveduras presentes nos grãos, geralmente liofilizada antes de ser utilizada (Rosa *et al.*, 2017; Kourkoutas *et al.*, 2006).

A liofilização é um processo de secagem que envolve congelar o produto e, em seguida, remover a umidade por sublimação sob vácuo, o que minimiza a exposição das células microbianas a altas temperaturas. Como resultado, os microrganismos do kefir são preservados de forma mais eficaz, mantendo sua capacidade de sobrevivência e atividade metabólica (Chen *et al.*, 2006) esse processo é demonstrado na Figura 4.

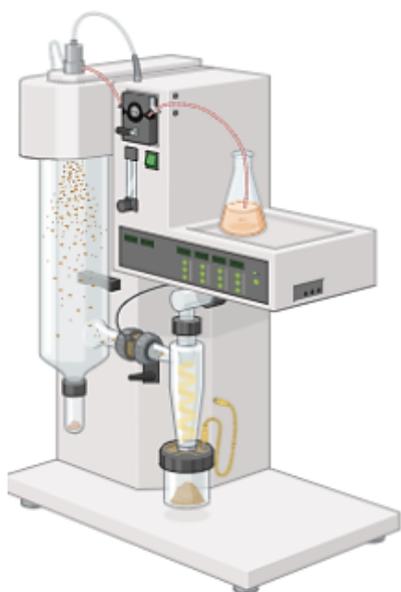
Figura 4 - Processo de liofilização do kefir.



Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com (2024).

Outro método que vem sendo estudado é o de secagem por *spray dryer*, que já é amplamente utilizado na indústria de laticínios devido ao seu custo relativamente baixo e eficiência na remoção de umidade (Favilla, 2022). No entanto, estudos indicam que esse método quando aplicado a produção de kefir, pode resultar em perda de aroma, sabor e viabilidade de microrganismos. Isso ocorre devido à exposição prolongada das células microbianas a altas temperaturas durante o processo de secagem (De Almeida, 2024) Esse processo é demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Processo de secagem do kefir por spray dryer.



**Atomização:** O inóculo líquido do Kefir é pulverizado em pequenas gotas usando um dispositivo chamado atomizador. Isso cria uma grande superfície de exposição ao ar.

**Secagem:** As gotículas são introduzidas em uma câmara de secagem quente, onde encontram um fluxo de ar a temperaturas elevadas, geralmente entre 150°C e 200°C (ou 300°F a 400°F).

**Evaporação:** O calor do ar faz com que a água presente nas gotículas evapore rapidamente.

**Formação do Pó:** À medida que a água evapora, as partículas sólidas que estavam dissolvidas ou suspensas no líquido se aglomeram e formam partículas secas.

**Coleta:** O pó seco é coletado na parte inferior do secador.

Fonte: Autoria própria, criado com BioRender.com (2024).

Embora a liofilização preserve melhor a qualidade microbiológica do kefir, seus altos custos e tempo prolongado de processamento limitam seu uso. No entanto, dada a importância da qualidade microbiológica para a saúde do consumidor, especialmente devido às propriedades probióticas do kefir, garantir a viabilidade das bactérias e leveduras durante o processo é crucial (Conde-Islas, 2019). Assim, os benefícios da liofilização na preservação das propriedades do kefir justificam seu uso, especialmente para produtos de alta qualidade destinados a consumidores que valorizam os benefícios probióticos (Kourkoutas *et al.*, 2007).

Além da liofilização, outras abordagens inovadoras têm sido exploradas como alternativas para superar as limitações dos métodos tradicionais de produção de kefir. Uma dessas alternativas é o uso de microencapsulação, uma tecnologia que protege as células microbianas em uma matriz polimérica, como alginato ou quitosana, garantindo maior estabilidade e viabilidade durante o processamento, armazenamento e consumo. A microencapsulação não só preserva as características funcionais das bactérias e leveduras, como também permite sua liberação controlada no ambiente intestinal, potencializando os benefícios probióticos do kefir (Heidebach *et al.*, 2012). Essa técnica tem sido amplamente estudada como uma solução para manter a qualidade microbiológica dos probióticos, especialmente em mercados onde a demanda por alimentos funcionais está em constante crescimento.

Outra abordagem promissora é o desenvolvimento de culturas starter padronizadas, que replicam a composição simbiótica dos grãos de kefir sem depender diretamente deles. Essas culturas são formuladas com base em análises detalhadas da microbiota dos grãos originais, permitindo maior controle sobre a qualidade microbiológica e sensorial do produto final. Além disso, o uso de biorreatores automatizados, combinados com sensores avançados para monitoramento em tempo real, tem sido implementado em indústrias de alimentos para otimizar os processos de fermentação. Esses sistemas permitem ajustes precisos nas condições de fermentação, como pH, temperatura e oxigênio, garantindo a consistência do kefir produzido em larga escala (Kourkoutas *et al.*, 2006). Combinadas, essas inovações têm o potencial de transformar a produção industrial de kefir, mantendo seus benefícios tradicionais enquanto atendem às demandas do mercado moderno.

### **3.4 Considerações finais**

Esta revisão de literatura teve como foco a análise dos métodos de produção do kefir, abordando tanto os aspectos microbiológicos regulados pela legislação brasileira quanto os desafios associados à implementação e à padronização desses processos. Foram discutidas diferentes abordagens de produção, incluindo métodos tradicionais, industriais e inovações tecnológicas, avaliando sua escalabilidade e vantagens dentro de um contexto industrial.

A legislação brasileira estabelece padrões rigorosos para a contagem viável de microrganismos no produto final, destacando a importância da qualidade microbiológica não apenas para a segurança alimentar, mas também para assegurar os benefícios funcionais do kefir. Essa conformidade regulatória é essencial para garantir que o produto final atenda às expectativas de qualidade e funcionalidade do consumidor. O cumprimento dessas normas também contribui para fortalecer a confiança no mercado de alimentos fermentados, que tem apresentado um crescimento significativo.

Durante a análise, foram enfatizadas tecnologias emergentes, como a liofilização, a microencapsulação e o uso de culturas starter padronizadas. Essas abordagens oferecem soluções promissoras para superar limitações relacionadas aos métodos tradicionais, como a dificuldade de padronização dos processos e a manutenção da viabilidade microbiológica durante o armazenamento. Além disso, essas tecnologias promovem a escalabilidade e a eficiência, fatores essenciais para atender à crescente

demanda por produtos funcionais no mercado global. A integração de práticas inovadoras aos processos de produção também pode melhorar a padronização sensorial do produto, garantindo consistência em aspectos como sabor, aroma e textura. Além disso, a adoção de soluções tecnológicas possibilita um melhor aproveitamento dos recursos naturais e aumenta a competitividade da indústria de kefir, alinhando-a com as tendências globais de sustentabilidade e eficiência produtiva.

Por fim, reforça-se a importância de fomentar mais pesquisas voltadas para a otimização dos métodos de produção e preservação do kefir. A colaboração entre produtores, pesquisadores e órgãos reguladores é crucial para superar os desafios existentes e garantir a evolução sustentável dessa indústria. Essa sinergia é necessária para equilibrar a tradição e a inovação, assegurando não apenas a qualidade microbiológica do kefir, mas também a sua identidade como um alimento funcional, valorizado tanto por seus atributos sensoriais quanto pelos seus benefícios à saúde. Dessa forma, avança-se rumo a um futuro promissor para a indústria de alimentos funcionais, especificamente os fermentados, atendendo às demandas de um mercado cada vez mais exigente e diversificado.

### 3.5 Referências

ALTAY, F. *et al.* Review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. **International Journal of Food Microbiology**, 2013; 167(1): 44-56.

ATALLAH, N.A.; CASTRO A.A. Revisões sistemáticas da literatura e metanálise: a melhor forma de evidência para tomada de decisão em saúde e a maneira mais rápida de atualização terapêutica. **Diagnóstico & Tratamento**. v.2, n.2, p.12-15, 1997.

AZIZI, N.F. *et al.* Kefir and its biological activities. **Alimentos**, 2021; 10(6): 1210.

BOZKIR, E. *et al.* Challenges in water kefir production and limitations in human consumption: A comprehensive review of current knowledge. **Heliyon**, 2024.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. 2007. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/defesa-agropecuaria/suasa/regulamentos-tecnicos-de-identidade-e-qualidade-de-produtos-de-origem-animal-1/rtiq-leite-e-seus-derivados>. Acesso em 01 jul 2024.

CHEN, H.C. *et al.* The effects of freeze-drying and rehydration on survival of microorganisms in kefir. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 2006; 19(1): 126-130.

CONDE-ISLAS, Á.A. *et al.* Effect of the freeze-drying process on the physicochemical and microbiological properties of Mexican kefir grains. **Processes**, 2019; 7(3): 127.

DE ALMEIDA, K.V. *et al.* Powdered water kefir: Effect of spray drying and lyophilization on physical, physicochemical, and microbiological properties. **Food Chemistry Advances**, 2024; 100759.

DODO, S.J. *et al.* O desenvolvimento de bebida fermentada de kefir sabor cajá - caracterização físico-química, microbiológica e avaliação sensorial. **Revista Panorâmica online**, v. 38, n. 1, 2023.

FARAG, M.A. *et al.* The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. **Nutrients** [Internet], 2020.

FAVILLA, A.L.C. *et al.* Microbial and physicochemical properties of spray dried kefir microcapsules during storage. **LWT**, 2022; 154: 112710.

FERNANDES, M.L.P. *et al.* Sugary kefir grains as the inoculum for developing a low sodium isotonic beverage. **Food Research International**, 2022; 157: 111257.

GIUFFRÈ, D e GIUFFRÈ, A.M. Fermentation technology and functional foods. **Frontiers in Bioscience-Elite**, 2024; 16(1): 8.

HEIDEBACH, T. *et al.* Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 2012;52(4):291-311.

KIM, D.H. *et al.* Comparison of traditional and backslopping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. **Short Communication LWT - Food Science and Technology**, 2018.

KOURKOUTAS, Y. *et al.* Evaluation of freeze-dried kefir coculture as starter in feta-type cheese production. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006; 72(9): 6124-6135.

KOURKOUTAS, Y. *et al.* An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. **Journal of Dairy Science**, 2007; 90(5): 2175-2180.

LEITE, A.M.O. *et al.* Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, 2013; 96(7): 4149-4159.

NAMBOU, K. *et al.* A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, 2014; 34(2): 237-246.

NIELSEN, B. *et al.* Kefir: a multifaceted fermented dairy product. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2014; 6: 123-135.

PIMENTEL, T.C. *et al.* Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, 2021; 140: 110033.

PUERARI, C. *et al.* New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition, and sensory analysis. **Food Research International**, 2012; 48(2): 634-640.

ROSA, D.D. *et al.* Milk kefir: nutritional, microbiological, and health benefits. **Nutritional Research Reviews** [Internet], 2017.

## REVISÃO DE LITERATURA - CAPÍTULO 3

### 4 Artigo 3 - Impactos da utilização de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos no kefir

#### RESUMO

O kefir, uma bebida fermentada rica em microrganismos, é amplamente reconhecido por seus benefícios à saúde. Este estudo integrativo analisou literatura recente (2020-2024) sobre o uso de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos na produção de kefir, com foco nas propriedades físico-químicas, microbiológicas e nas condições de fermentação. Dados extraídos de bases como PubMed (Medline), SciELO, ScienceDirect, Scopus e Web of Science mostram que substratos e condições de fermentação influenciam diretamente a viabilidade e diversidade microbiana, bem como as características físico-químicas e funcionais do produto. Contudo, há carência de estudos abrangentes sobre controle de qualidade microbiológico e físico-químico, como análises de pH, sólidos solúveis, ácidos, proteínas, carboidratos e atividade antioxidante, cruciais para avaliar o perfil funcional e a estabilidade do kefir. No contexto brasileiro, é essencial investigar o uso de frutas tropicais regionais com alto potencial funcional, além do reaproveitamento de seus resíduos como substratos, promovendo a sustentabilidade e a economia circular. Esses estudos devem incluir a avaliação da bioacessibilidade de compostos bioativos, no desenvolvimento de produtos com benefícios à saúde, como propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Para a implementação comercial, são indispensáveis ensaios clínicos que validem os benefícios à saúde, análises de estabilidade ao longo do armazenamento e o desenvolvimento de padrões de controle de qualidade específicos. Esses esforços podem viabilizar um produto inovador, sustentável e de impacto social, valorizando a agricultura familiar e agregando valor a recursos locais, atendendo às expectativas do mercado consumidor global.

**Descritores:** Kefir; Sucos de frutas e vegetais; Extratos de plantas.

#### ABSTRACT

Kefir, a fermented beverage rich in microorganisms, is widely recognized for its health benefits. This integrative study analyzed recent literature (2020-2024) on the use of fruit juices and plant extracts as substrates in kefir production, focusing on physicochemical, microbiological properties, and fermentation conditions. Data extracted from databases such as PubMed (Medline), SciELO, ScienceDirect, Scopus, and Web of Science show that substrates and fermentation conditions directly influence microbial viability and diversity, as well as the physicochemical and functional characteristics of the product. However, there is a lack of comprehensive studies on microbiological and physicochemical quality control, such as analyses of pH, soluble solids, acids, proteins, carbohydrates, and antioxidant activity, which are crucial to assess the functional profile and stability of kefir. In the Brazilian context, it is essential to investigate the use of regional tropical fruits with high functional potential, in addition to the reuse of their waste as substrates, promoting sustainability and the circular economy. These studies should include the assessment of the bioaccessibility of

bioactive compounds in the development of products with health benefits, such as antioxidant and anti-inflammatory properties. For commercial implementation, clinical trials that validate the health benefits, stability analyses during storage and the development of specific quality control standards are essential. These efforts can enable an innovative, sustainable and socially impactful product, valuing family farming and adding value to local resources, meeting the expectations of the global consumer market.

**Descriptors:** Kefir; Fruit and Vegetable Juices; Plant Extracts.

#### 4.1 Introdução

Atualmente, o mercado de alimentos funcionais é vasto, com destaque para os produtos lácteos, que desempenham um papel relevante na indústria alimentícia (Lagouri *et al.*, 2019). Os grãos de kefir, com uma microflora adaptável a diferentes substratos açucarados, se destacam em relação às culturas iniciadoras de uma única espécie, proporcionando maior flexibilidade na produção (Noberto *et al.*, 2018). Essa capacidade de adaptação resulta em uma rica diversidade metabólica e biossintética das cepas microbianas, favorecendo a produção de substâncias benéficas à saúde (Azizi, 2021). Os grãos de kefir são utilizados tanto em produtos lácteos fermentados quanto em bebidas vegetais à base de frutas e cereais, apresentando grande potencial na criação de alimentos funcionais (Dong *et al.*, 2018). A busca constante por aprimorar seus benefícios nutricionais tem levado ao desenvolvimento de estratégias que buscam incorporar componentes específicos para conferir propriedades únicas às bebidas (Lagouri *et al.*, 2019). Nesse contexto, a fermentação com diferentes substratos surge como uma alternativa promissora. Para explorar plenamente o potencial de diversas matrizes na produção de bebidas fermentadas, é fundamental investigar a composição físico-química (como pH, sólidos solúveis, ácidos, proteínas, carboidratos, compostos fenólicos e atividade antioxidante), sensorial e microbiológica desses produtos (Kizzie-Hayford *et al.*, 2016). Noberto *et al.* (2018) enfatizam a importância de compreender o impacto das modificações no substrato sobre as culturas microbianas do kefir, visto que esse conhecimento é crucial para entender como os grãos de kefir, originários do leite ou da água, interagem com outras matrizes e como as condições de produção e fermentação influenciam a diversidade e a viabilidade microbiana no produto final.

Os extratos hidrossolúveis vegetais têm se mostrado uma alternativa crescente no desenvolvimento de bebidas funcionais (Governa *et al.*, 2019), atendendo à tendência de consumidores que substituem produtos lácteos por opções vegetais, seja por intolerância à lactose, alergias, dietas veganas ou preocupações ambientais e éticas (Pimentel, 2021). Além disso, substratos a partir de sucos de frutas e extratos vegetais são acessíveis, devido à ampla disponibilidade de matéria-prima em regiões tropicais e à simplicidade no processamento. Isso representa uma oportunidade viável para melhorar a nutrição de populações de baixa renda, ao permitir a produção de alimentos funcionais e ricos em nutrientes de forma economicamente sustentável (Panghal *et al.*, 2018).

Silva e Santos (2015) afirmam que essas bebidas são não apenas funcionais, mas também de fácil preparo, permitindo que os grãos de kefir se adaptem a diferentes substratos vegetais, gerando produtos fermentados de elevado valor nutricional, ampliando o acesso a alimentos saudáveis em comunidades vulneráveis. Ademais, no contexto brasileiro, é essencial explorar o uso de frutas tropicais regionais de alto potencial funcional, além de resíduos como substratos, incluindo sementes de abóbora (ricas em proteínas e lipídios) e subprodutos da indústria alimentícia, como farelo e grãos quebrados de arroz. Esses ingredientes podem promover a sustentabilidade e agregar valor aos produtos locais (Naves *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2016).

Portanto, é evidente a importância de investigar o kefir em matrizes alternativas, como extratos vegetais e sucos de frutas. Essa abordagem não só amplia a versatilidade do kefir, oferecendo uma alternativa saudável aos produtos comerciais, mas também fortalece a agricultura familiar e promove a sustentabilidade ao incentivar o reaproveitamento de resíduos e o uso de recursos locais (Pimentel, 2021; Jaime, Ramos e Sancho, 2022).

Esta revisão integrativa tem como objetivo analisar os impactos do uso de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos no kefir, abrangendo a avaliação das propriedades físico-químicas e microbiológicas do produto e a exploração das condições de fermentação com essas alternativas.

## 4.2 Metodologia

Este trabalho foi realizado através de uma revisão integrativa, a abordagem metodológica mais ampla para revisões, que possibilita a inclusão de estudos experimentais e não-experimentais, proporcionando uma compreensão completa do tema em análise. Além disso, considera variáveis como dados da literatura teórica e empírica e abrange vários objetivos, como a definição de conceitos, a revisão de teorias e evidências, e a análise de questões metodológicas relacionadas ao assunto (Souza; Silva; Carvalho, 2010).

### 4.2.1 Pergunta norteadora

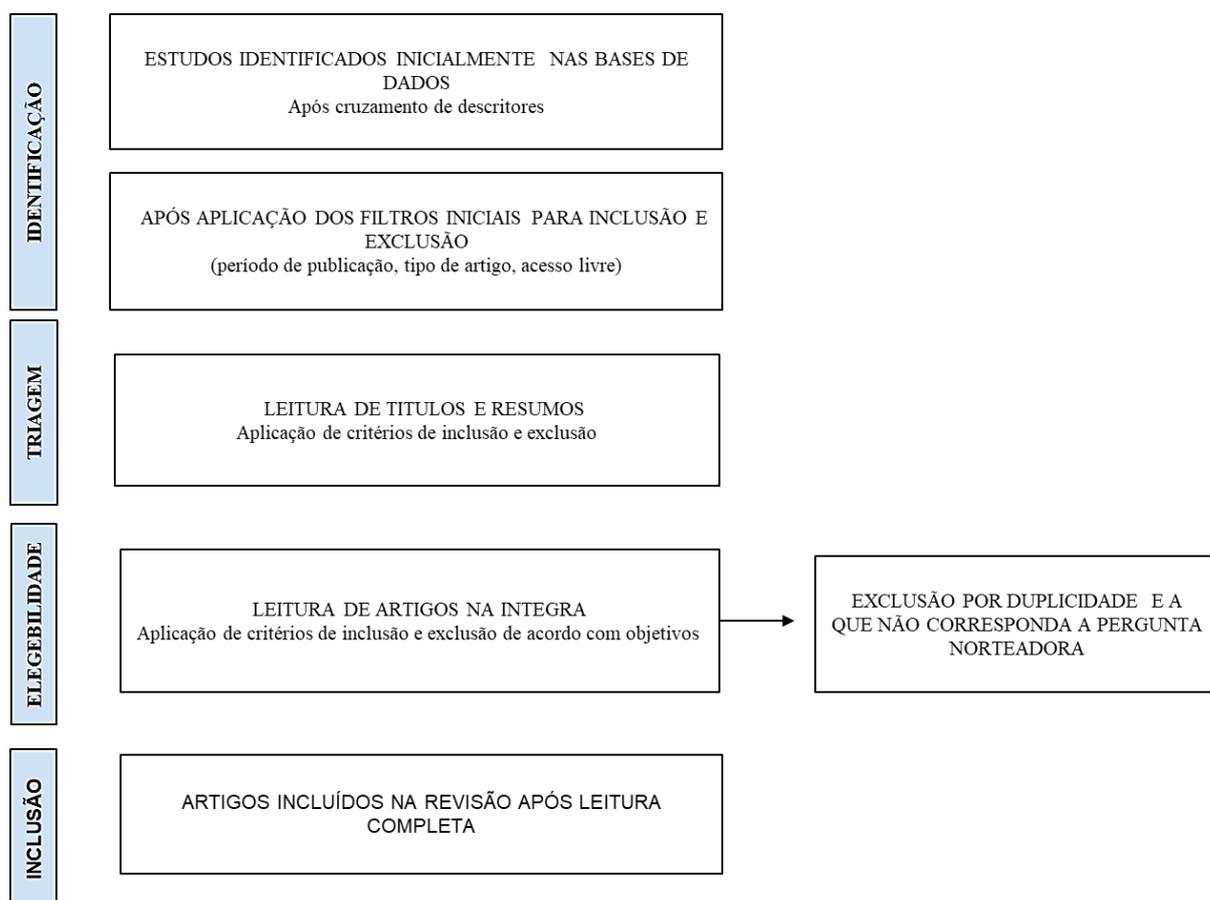
Neste trabalho, pretendeu elucidar o seguinte questionamento: “Quais são os impactos decorrentes da utilização de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos nas características físico-químicas e microbiológicas no kefir?”

### 4.2.2 Material de estudo

Para realização desta revisão, foram utilizados artigos, publicados entre 2020 e 2024, retirados das seguintes bases de dados: Scientific Electronic Library Online (SciELO), PubMed (MEDLINE), ScienceDirect, Scopus e Web of Science através da plataforma Periódicos CAPES. Para pesquisa eletrônica nas bases de dados foram utilizados descritores selecionados a partir dos Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e incluem publicações em inglês, português e espanhol. Os descritores utilizados foram “Kefir”, “Fruit and Vegetable Juices”; “Plant Extracts”, utilizando o operador booleano “AND” entre as palavras.

A pesquisa foi realizada no período de janeiro de 2020 a dezembro de 2024. Quando combinados dois a dois, utilizando kefir como descritor fixo, revelaram um número inicial total de artigos disponíveis e este foi coletado a cada busca e a cada combinação. A partir deste momento foram aplicados os critérios de inclusão (período de publicação, artigo de pesquisa e acesso livre) para filtragem inicial, coletando-se o número de artigos disponíveis. Posteriormente foi utilizado o Fluxograma PRISMA - 2020 para revisões sistemáticas (Paje *et al*, 2021) a fim de eleger os trabalhos que compõem esta revisão (Fluxograma 1).

Fluxograma 1 - Fluxograma PRISMA adaptado para esta revisão integrativa da literatura.



Fonte: adaptado de Paje *et al.*, (2021).

Após a seleção inicial, através da leitura do título e resumo, e nesta triagem excluídos do número inicial os artigos duplicados e que não atendiam aos critérios de inclusão, seguiu-se para a leitura completa dos trabalhos aplicando-se os demais critérios de inclusão e exclusão (Quadro 1) para a obtenção dos estudos que atendessem aos objetivos desta revisão.

Quadro 1 – Critérios de inclusão e exclusão aplicados na seleção e elegibilidade de artigos em bases de dados eletrônicas.

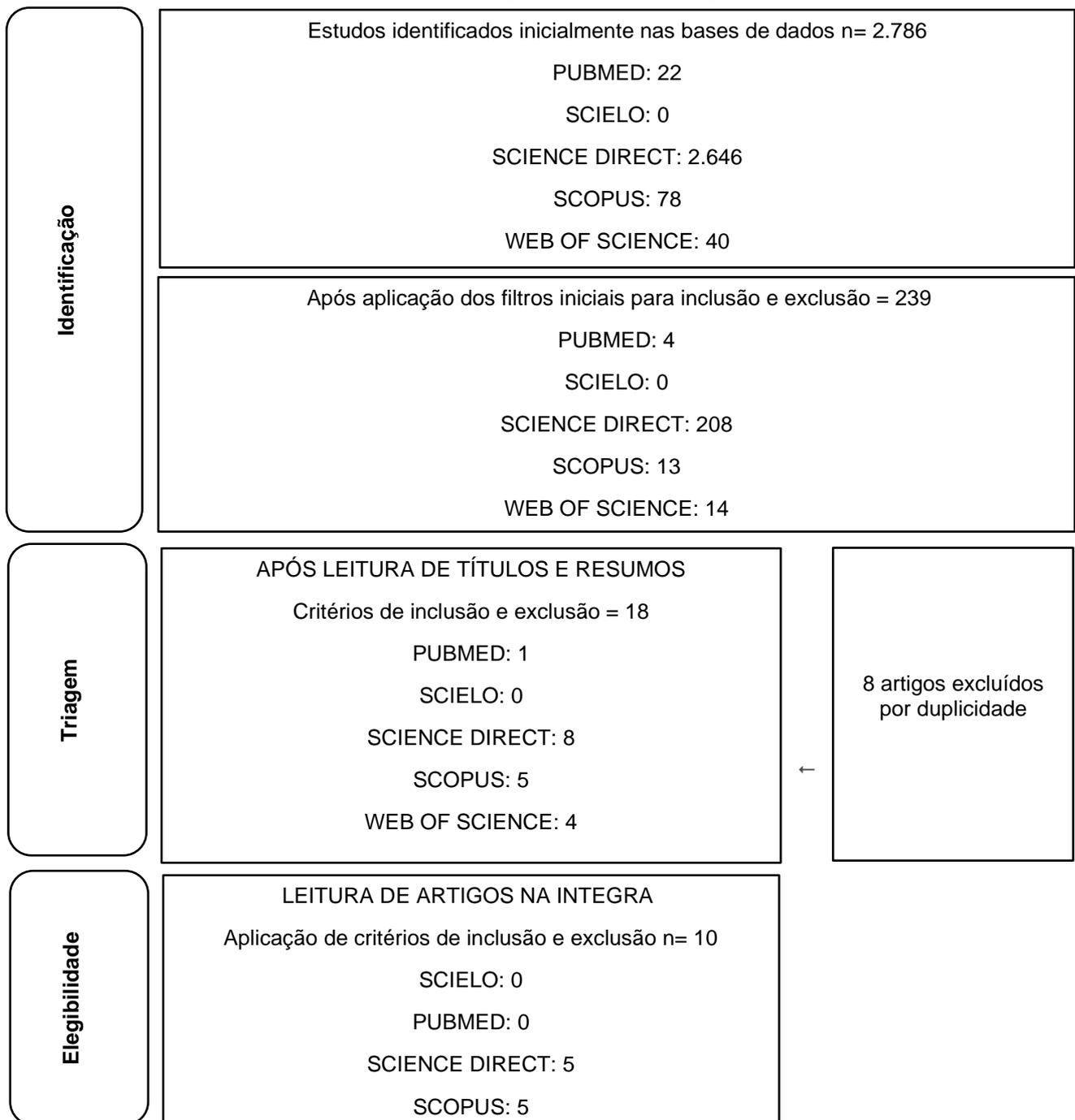
| CRITÉRIOS DE INCLUSÃO                     | CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO  |
|---|--|
| Artigos publicados a partir de 2020.      | Artigos que abordam fermentações distintas do kefir                        |
| Disponibilidade na íntegra gratuitamente. | Artigos que trouxessem fermentações a partir de substrato de origem animal |

|   |   |
|---|---|
| Publicações das línguas: inglês, português, espanhol. | Mini reviews, Carta ao editor, Capítulos de livros, Trabalhos de conclusão de curso, Resumos de congresso, Editoriais e congêneres. |
|---|---|

Fonte: Autoria própria, 2024.

O cruzamento dos descritores resultou em 2.786 artigos inicialmente. Após a aplicação dos filtros iniciais, foram considerados 239 trabalhos para análise inicial desta revisão. Seguindo as etapas do fluxograma (Fluxograma 1), e após leitura criteriosa, foram selecionados 10 estudos para a elaboração desta revisão de literatura.

Fluxograma 1 - Fluxograma do processo de seleção eletrônica nas bases de dados para obtenção de artigos para revisão integrativa;



|                  |  |
|------------------|--|
| <b>Incluídos</b> | Artigos incluídos na revisão após leitura completa n= 10 |
|                  | SCIELO: 0  |
|                  | PUBMED: 0  |
|                  | SCIENCE DIRECT: 5  |
|                  | SCOPUS: 5  |
|                  | WEB OF SCIENCE: 0  |

Fonte: Autoria própria, 2024.

### 4.3 Resultados e Discussão

A seleção dos artigos resultou em 10 artigos nos últimos 4 anos nas bases de dados analisadas. O Quadro 2 compila e resume essas publicações, detalhando o substrato estudado, substrato de origem, condições de fermentação, principais parâmetros comuns avaliados/resultados e referências.

Quadro 2 - Descrição detalhada dos ensaios randomizados.

| SUBSTRATO ESTUDADO E DE ORIGEM  | CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO  | PRINCIPAIS PARÂMETROS COMUNS AVALIADOS/RESULTADOS   | REFERÊNCIAS   |
|---|---|---|---|
| <p>Suco de chokeberry. (<i>Aronia melanocarpa</i>)</p> <p>Origem: kefir de leite</p>              | <p>Os chokeberries foram lavados com água da torneira e os caules foram removidos após descongelamento a 4 °C por aproximadamente 12 h. Os frutos e a água foram espremidos por 3 min em uma proporção de 1:3 (p/v) usando um espremedor. O bagaço foi removido usando um separador de suco-resíduo. O suco tratado foi pasteurizado em garrafas de vidro estéreis a 65 °C por 30 min após a adição de 10% de sacarose. Em seguida, 5% de grãos de kefir de leite (MKG) ativado foi adicionado ao suco pasteurizado e fermentado a 25 °C por 48h.</p> | <p><u>Determinação do pH:</u> 3,11 ± 0,01</p> <p><u>Concentração de sólidos solúveis:</u> 9,83 ± 0,29%</p> <p><u>Análise/identidade microbiana:</u> Os gêneros principais de bactérias encontradas foram <i>Acetobacter</i> e <i>Lactobacillus</i>.</p> | <p>SUN, M.C. <i>et al.</i> Exploring the mechanism of milk kefir grain fermentation to improve the palatability of chokeberry juice. <b>LWT</b>, v. 213, p. 117074, 2024.</p>   |
| <p>Uma bebida de semente de cânhamo (<i>Cannabis sativa</i> L.)</p> <p>Origem: kefir de leite</p> | <p>A semente de cânhamo fresca foi lavada para remover impurezas e misturada com água (1:9, p/p), suplementada com xarope de milho de frutose (5%, p/p) e homogeneizada a 20 MPa por 5 minutos. A suspensão resultante foi esterilizada a 102°C por 25 minutos e, após resfriar a 25°C, foram adicionados grãos de kefir (3%, p/p). A mistura foi fermentada a 28°C por 24 horas, depois homogeneizada e esterilizada a 102°C por 10 minutos para produzir a bebida fermentada de semente de cânhamo com kefir.</p>                                   | <p><u>Determinação do pH:</u> 3,92 ± 0,04</p> <p><u>Teor de proteínas (g/100 g):</u> 3,06 ± 0,07</p> <p><u>Teor de gorduras (g/100 g):</u> 2,50 ± 0,04</p>  | <p>LI, X. <i>et al.</i> Effects of fermentation with kefir grains on nutrient composition, flavor volatiles, and product physical stability of a hemp seed (<i>Cannabis sativa</i> L.) beverage. <b>LWT</b>, v. 183, p. 114934, 2023.</p> |

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| <p>Duas variedades de leite de chufa (<i>Cyperus esculentus</i> L.)</p> <p>Origem: kefir de água</p> | <p>Os tubérculos secos de <i>Cyperus esculentus</i> L. foram inicialmente limpos com água da torneira e, em seguida, imersos em água morna por 24 horas. Após esse período, os tubérculos foram moídos de forma úmida a 1800 rpm durante 8-10 minutos, utilizando uma proporção de água de 1:5 (p/p). A mistura resultante foi então filtrada com gaze. O filtrado recebeu um tratamento térmico a 75°C por 15 minutos e, após o tratamento, foi resfriado a 25°C. Em seguida, foram adicionados grãos de kefir de água na proporção de 2% (v/p). A mistura foi fermentada até atingir um pH de 4,6 e, por fim, foi resfriada a 4°C.</p> | <p><u>Determinação do pH</u></p> <p>marrom: 4,64±0,02<br/>amarela: 4,52±0,00</p> <p><u>Concentração de sólidos solúveis (Brix)</u></p> <p>marrom: 7,56±1,23<br/>amarela: 7,38±1,19</p> <p><u>Teor de gorduras (g/100g)</u></p> <p>marrom: 2,93±0,21<br/>amarela: 3,09±0,07</p> <p><u>Teor de proteína (g/100g)</u></p> <p>marrom: 1,73±0,14<br/>amarela: 2,29±0,09</p> <p><u>Teor de carboidratos (g/100g)</u></p> <p>marrom: 2,69±0,87<br/>amarela: 1,84±0,82</p> <p><u>Teor de ácidos (mg/L)</u></p> <p>- ácido acético<br/>marrom: 702.05±30.92<br/>amarela: 1138.10±49.08</p> <p>- ácido cítrico<br/>marrom: 1589.90±76.09<br/>amarela: 1126.37±54.95</p> <p>- ácido láctico<br/>marrom: 2439.58±78.14<br/>amarela: 2958.54±30.54</p> <p>- ácido málico<br/>marrom: 191.53±12.01<br/>amarela: 309.25±21.86</p> <p>- ácido succínico<br/>marrom: 965.95±25.12<br/>amarela: 965.95±25.12</p> <p><u>Análise/identidade microbiana:</u> As contagens de <i>Lactococcus</i> e <i>Lactobacilos</i> para kefir de tigernut foram medidas de 8,71 a 8,78 log UFC/ml e de 6,94 a 8,14 log UFC/ml, respectivamente.</p> | <p>SATIR, G. The effects of fermentation with water Kefir grains on two varieties of tigernut (<i>Cyperus esculentus</i> L.) milk. <b>LWT</b>, v. 171, p. 114164, 2022.</p> |
|--|--|---|---|

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
| <p>Suco e bagaço de <i>Aronia melanocarpa</i></p> <p>Origem: kefir de água</p>                               | <p>O bagaço de <i>aronia</i> (300 g) foi fervido com 3 L de água por 10 minutos, filtrado e resfriado a 35°C. Para produzir kefir de água com bagaço, 600 ml desse substrato foram fervidos com 10 g de passas e 20 g de açúcar, filtrando as passas e resfriando o substrato a 35°C. Após medir os valores de Brix e pH, 51,1 g de açúcar foram adicionados ao substrato, que foi então misturado com 30 g de grãos de kefir de água e fermentado a 35°C por 72 horas.</p> <p>Para o kefir de água com suco, 300 ml de suco de <i>Aronia</i> foram fervidos com 300 ml de água, 10 g de passas e 20 g de açúcar. Após a filtragem das passas e resfriamento a 35°C, os grãos de kefir de água foram adicionados e a mistura fermentada a 35°C por 72 horas. Após a fermentação, a mistura foi peneirada para remover os grãos.</p> <p>Finalmente, os kefirs aquosos fermentados foram transferidos para frascos pasteurizados e pasteurizados a 85°C por 30 minutos em um forno de convecção.</p> | <p><u>Determinação do pH</u></p> <p>kefir do bagaço: <math>3,39 \pm 0,01</math></p> <p>kefir do suco: <math>3,59 \pm 0,01</math></p> <p><u>Concentração de sólidos solúveis (Brix)</u></p> <p>kefir do bagaço: <math>6,10 \pm 0,28</math></p> <p>kefir do suco: <math>7,65 \pm 0,92</math></p>  | <p>ESATBEYOGLU, T. <i>et al.</i> Physical, chemical, and sensory properties of water kefir produced from <i>Aronia melanocarpa</i> juice and pomace. <b>Food Chemistry</b>: X, v. 18, p. 100683</p>                           |
| <p>Suco de frutas e vegetais (Cenouras pretas, maçãs, uvas e repolho verde)</p> <p>Origem: kefir de água</p> | <p>Cenouras pretas, maçãs, uvas e repolho verde foram lavados e seus sucos extraídos com um extrator centrífugo. Os sucos foram pasteurizados a 75°C por 5 minutos. Os grãos de kefir de água (WKG) foram reativados por retrolavagem com água esterilizada contendo 10% de sacarose e dois figos cortados, realizando o processo três vezes a 25°C por 48 horas. Após a retrolavagem, os grãos foram filtrados e enxaguados com água destilada estéril. Para a fermentação, 3 g de WKG fresco ativado foram adicionados a 3 L de cada suco (na proporção 1:1000 p/v). A fermentação foi realizada estaticamente a 25°C por 48 horas em garrafas de vidro esterilizadas.</p>   | <p><u>Determinação do pH</u></p> <p>kefir de uva (<math>3,87 \pm 0,00</math>)</p> <p>kefir de cenoura preta (<math>4,03 \pm 0,00</math>)</p> <p>kefir de maçã (<math>3,99 \pm 0,01</math>)</p> <p>kefir de repolho verde (<math>3,59 \pm 0,05</math>)</p> <p><u>Concentração de sólidos solúveis (Brix)</u></p> <p>kefir de uva (<math>6,85 \pm 1,48</math>)</p> <p>kefir de cenoura preta (<math>6,95 \pm 0,07</math>)</p> <p>kefir de maçã (<math>4,90 \pm 0,14</math>)</p> <p>kefir de repolho verde (<math>5,00 \pm 0,28</math>)</p> <p><u>Análises/identidade microbiana</u></p> <p>(número de bactérias lácticas em forma de cocos)</p> <p>kefir de uva (<math>7,44 \pm 0,18 \log \text{ UFC/ml}</math>)</p> <p>kefir de cenoura preta (<math>8,03 \pm 0,18 \log \text{ UFC/ml}</math>)</p> | <p>AGIRMAN, B. <i>et al.</i> The evaluation of black carrot, green cabbage, grape, and apple juices as substrates for the production of functional water kefir-like beverages. <b>Food Science &amp; Nutrition</b>, 2024.</p> |

|   |   |  |  |
|---|---|--|--|
|   |   | kefir de maçã ( $7,23 \pm 0,22$ log UFC/ml)  |  |
|   |   | kefir de repolho verde ( $5,22 \pm 0,19$ log UFC/ml)   |  |
| <p>Suco de frutas e vegetais</p> <p>(Um suco comercial da marca Veggie, feito de extrato de maçã (70%), cenoura (12%), beterraba (9%) e morango (9%), foi usado como bebida base)</p> <p>Origem: kefir de leite</p> | <p>O suco selecionado para a fermentação foi um produto industrial da marca Veggie, feito de extrato de maçã (70%), cenoura (12%), beterraba (9%) e morango (9%) (Lote-120738). A escolha do suco foi devido à presença de beterraba, que contém betaina, um composto com alegações de saúde autorizadas.</p> <p>Os grãos de kefir foram obtidos de um doador e preservados em leite esterilizado, trocado diariamente por dois meses. Após serem lavados com água destilada estéril, os grãos foram usados para inocular o suco comercial.</p> <p>Foram testadas duas variáveis: a concentração dos grãos de kefir (1%, 2%, 3%, e 4% p/v) e o tempo de fermentação (12, 24, e 48 horas), resultando em 12 amostras diferentes, preparadas em triplicata. A fermentação foi realizada a 26°C. As bebidas fermentadas foram avaliadas quanto aos parâmetros físico-químicos e mantidas refrigeradas (4°C) em atmosfera modificada (com nitrogênio) para preservação das propriedades organolépticas. O suco comercial foi usado como controle.</p> | <p><u>Determinação do pH</u></p> <p>Com 12 horas de fermentação: de <math>3,53 \pm 0,03</math> a <math>3,65 \pm 0,01</math></p> <p>Com 24 horas de fermentação: de <math>3,64 \pm 0,01</math> a <math>3,70 \pm 0,03</math></p> <p>Com 48 horas de fermentação: de <math>3,39 \pm 0,02</math> a <math>3,48 \pm 0,02</math></p> <p><u>Concentração de sólidos solúveis (Brix)</u></p> <p>Com 12 horas de fermentação: de <math>9,79 \pm 0,11</math> a <math>10,27 \pm 0,13</math></p> <p>Com 24 horas de fermentação: de <math>8,69 \pm 0,04</math> a <math>9,93 \pm 0,04</math></p> <p>Com 48 horas de fermentação: de <math>3,62 \pm 0,04</math> a <math>4,13 \pm 0,18</math></p> <p><u>Teor de ácidos (mg/L)</u></p> <p>ácido láctico</p> <p>Com 12 horas de fermentação: de <math>289,61 \pm 15,68</math> a <math>1479,92 \pm 22,85</math></p> <p>Com 24 horas de fermentação: de <math>515,45 \pm 20,72</math> a <math>2042,28 \pm 9,75</math></p> <p>Com 48 horas de fermentação: de <math>559,11 \pm 60,65</math> a <math>3250,47 \pm 76,87</math></p> <p>ácido acético</p> <p>Com 12 horas de fermentação: de <math>62,07 \pm 6,65</math> a <math>85,40 \pm 20,24</math></p> <p>Com 24 horas de fermentação: de <math>37,01 \pm 3,79</math> a <math>98,32 \pm 15,66</math></p> <p>Com 48 horas de fermentação: de <math>60,73 \pm 4,52</math> a <math>266,81 \pm 16,79</math></p> <p>ácido cítrico</p> <p>Com 12 horas de fermentação: de <math>498,22 \pm 18,64</math> a <math>682,86 \pm 12,34</math></p> <p>Com 24 horas de fermentação: de <math>496,54 \pm 27,85</math> a <math>607,55 \pm 23,45</math></p> <p>Com 48 horas de fermentação: de <math>532,80 \pm 27,21</math> a <math>601,42 \pm 36,45</math></p> <p>ácido málico</p> <p>Com 12 horas de fermentação: de <math>201,32 \pm 22,73</math> a <math>352,99 \pm 16,44</math></p> | <p>PAREDES, J. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; VICARIO, I. M. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. <b>L wt</b>, v. 154, p. 112728, 2022.</p> |

|   |  |  |   |
|---|--|--|---|
|   |  | <p>Com 24 horas de fermentação: de 267,54 ± 30,90 a 364,73 ± 21,33</p> <p>Com 48 horas de fermentação: de 264,34 ± 12,82 a 380,75 ± 24,26</p> <p>ácido succínico</p> <p>Com 12 horas de fermentação: de 871,86 ± 17,76 a 1190,39 ± 39,91</p> <p>Com 24 horas de fermentação: de 1105,66 ± 47,48 a 1449,03 ± 33,99</p> <p>Com 48 horas de fermentação: de 1552,87 ± 63,45 a 2244,70 ± 64,14</p>   |   |
| <p>Extrato aquoso de licuri.<br/>Origem: kefir de água</p>                            | <p>Os grãos de kefir de água foram armazenados a -20°C. Os grãos de licuri foram higienizados com água clorada e armazenados a -20°C. O açúcar demerara foi adquirido em comércio local.</p> <p>O extrato aquoso de licuri foi preparado imersando os grãos em água a 100°C (1:3) por 20 minutos, batendo a mistura, filtrando-a e adicionando 10% de açúcar demerara. O extrato foi pasteurizado a 85°C por 30 minutos e resfriado a 25°C.</p> <p>Os grãos de kefir foram reativados em solução de sacarose (10% de açúcar demerara) por 48 horas a 25°C. Após 15 ciclos de fermentação e lavagem com solução salina estéril, os grãos foram adaptados ao extrato de licuri em mais 15 ciclos.</p> <p>O extrato aquoso de licuri foi fermentado a 25°C, variando o tempo (24 e 48 horas) e a quantidade de grãos de kefir (1%, 2,5%, e 5%). Após a fermentação, as bebidas foram armazenadas a 4°C. O crescimento dos grãos de kefir foi avaliado pela diferença entre o peso final e inicial dos grãos após a fermentação.</p> | <p><u>Determinação do pH:</u> 3,52 ± 0,01 a 4,29 ± 0,04</p> <p><u>Teor de carboidratos (g/100 g):</u> 5,86 ± 0,19 a 11,51 ± 1,26</p> <p><u>Teor de proteínas (g/100g):</u> 1,46 ± 0,24 a 2,16 ± 0,84</p> <p><u>Análise/identidade microbiana:</u> entre 9,40 ± 0,08 e 9,24 ± 0,03 Log UFC/ml bactérias e 4,65 ± 0,02 e 5,34 ± 0,02 Log UFC/ml para leveduras. A diversidade microbiana dos grãos de kefir cultivados em extrato aquoso de licuri é composta principalmente por bactérias do ácido láctico (58,27%) e bactérias do ácido acético (0,24%).</p> | <p>DE CARVALHO ALVES, J. <i>et al.</i> Licuri Kernel (<i>Syagrus coronata</i> (Martius) Beccari): A Promising Matrix for the Development of Fermented Plant-Based kefir Beverages. <b>Foods</b>, v. 13, n. 13, p. 2056, 2024.</p> |
| <p>Extrato de coco solúvel em água (WSCE), com inulina.<br/>Origem: kefir de água</p> | <p>Os grãos de kefir de água foram doados por um produtor local em Guarapuava, e o coco seco e o açúcar de coco foram adquiridos de fornecedores em Erechim. A inulina e a goma xantana foram compradas do Gastronomy Lab®. Os grãos de kefir foram ativados por sete dias em solução de sacarose a 25 ± 1 °C, com troca diária de nutrientes. Para preparar o extrato de coco, 100 g de polpa</p>   | <p><u>Determinação do pH:</u> 4,80 ± 0,01 e 4,51 ± 0,07</p> <p><u>Concentração de sólidos solúveis (Brix):</u> 6,79 ± 0,18 e 7,40 ± 0,20</p> <p><u>Teor de proteínas (g/100g):</u> 0,95 ± 0,03 e 0,84 ± 0,12</p> <p><u>Teor de carboidratos (g/100g):</u> 4,46 ± 0,13 e 12,41 ± 0,34</p>   | <p>ALVES, V. <i>et al.</i> Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (<i>Cocos nucifera</i> L.) with inulin addition. <b>Lwt</b>, v. 145, p. 111364, 2021.</p>                          |

|  |  |   |   |
|--|--|---|---|
|  | seca foram misturados com 1000 ml de água, desintegrados, filtrados e pasteurizados a $90 \pm 1$ °C por 3 min. A fermentação foi realizada com 5% de grãos de kefir em extrato de coco a $25 \pm 1$ °C, com filtragem e armazenamento da bebida fermentada a $4 \pm 1$ °C por 72 h.  | Identidade microbiana: Quanto às espécies bacterianas identificadas, houve predomínio mais significativo de bactérias ácido-láticas (BAL). Entretanto, foi possível observar a presença de espécies de bactérias ácido-acéticas.  |   |
| Extratos vegetais de arroz, amêndoa e grão-de-bico.<br>Origem: kefir de água | Os grãos-de-bico, arroz e amêndoas cruas foram comprados em mercados locais em Isparta, Turquia. Cada um foi imerso em 1 L de água estéril (200 g de vegetal) a 25 °C por 8 h, seguido por tratamento térmico a 85 °C por 10 min. Depois, a água foi drenada e a mistura foi transformada em purê com 1L de água estéril. O purê foi peneirado para obter o extrato vegetal, ao qual foi adicionado 1% de açúcar refinado e pasteurizado a 85 °C por 15 min. Assim, os extratos de grão-de-bico, arroz e amêndoa foram preparados. Grãos de Kefir de água foram adicionados a extratos vegetais a uma taxa de inoculação de 2%, e a fermentação ocorreu a 25 °C por 17 horas. Os extratos vegetais fermentados foram armazenados na geladeira (4 °C) após a fermentação. | <u>Determinação do pH</u><br>kefir de arroz: $4,70 \pm 0,18$<br>kefir de amêndoa: $4,52 \pm 0,27$ b<br>kefir de grão-de-bico: $4,68 \pm 0,18$<br><br>Análise/identidade microbiana<br>kefir de amêndoa: 8,3 log UFC/ml de <i>Lactobacillus spp.</i> e 7,73 log UFC/ml de <i>Lactococcus spp.</i> Para leveduras 5,36 log UFC/ml.<br>kefir de arroz: 5,64 log UFC/ml de <i>Lactobacillus spp.</i> e 8,5 log UFC/ml de <i>Lactococcus spp.</i> Para leveduras 3,62 log UFC/ml.<br>kefir de grão-de-bico: 7,3 log UFC/ml de <i>Lactobacillus spp.</i> e 7,73 log UFC/ml de <i>Lactococcus spp.</i> Para leveduras 4,38 log UFC/ml. | USTAOĞLU-GENÇGÖNÜL, M. <i>et al.</i> Chemical, microbial, and volatile compounds of water kefir beverages made from chickpea, almond, and rice extracts. <b>European Food Research and Technology</b> , p. 1-12, 2024.  |
| Suco de Morango<br>Origem: kefir de água                                     | Os morangos foram selecionados, lavados e desinfetados com cloro (200 ppm/10 min). O suco foi extraído em centrífuga doméstica e posteriormente misturado com água (1:1 p/p). O °Brix do suco foi ajustado para 8,5 °Brix pela adição de açúcar mascavo, e a mistura foi então pasteurizada (72 °C/15 min). Em seguida, grãos de kefir (10%, p/p) foram adicionados ao suco e deixados fermentar em uma incubadora com temperatura controlada (25 °C) durante 36h. O tempo final de fermentação foi definido de acordo com testes preliminares, onde foi verificado que após 36h não houve alteração significativa nos valores de pH e acidez titulável total das bebidas.   | <u>Determinação do pH:</u> $3,5 \pm 0,01$<br><u>Concentração de sólidos solúveis:</u> $4,70 \pm 0,04$   | DA SILVA AÚJO, C.A; MACEDO, L. L; TEIXEIRA, L. J. Q. Evaluation of mid-infrared spectra associated with chemometrics for the determination of physicochemical properties during fermentation of a new strawberry-based beverage with water kefir grains. <b>Journal of Food Composition and Analysis</b> , v. 123, p. 105490, 2023. |

Legenda: MPa: Megapascal, p/p: Peso por peso, v/p: Volume por peso, p/v: Peso por volume, °C:

Graus Celsius, pH: Potencial hidrogeniônico, g/100g: Gramas por 100 gramas, mg/L: Miligramas por litro, UFC/ml: Unidades formadoras de colônias por mililitro, °Bx: Grau Brix, WSCE: Water Soluble

Coconut Extract (Extrato de Coco Solúvel em Água) Fonte: Autoria própria, 2024.

Dos dez artigos analisados, 40% abordaram extratos vegetais (Satir, 2022; De Carvalho *et al.*, 2024; Alves *et al.*, 2021; Ustaoglu-Gençgönül *et al.*, 2024), 10% discutiram suco de vegetais e frutas juntos numa única matriz (Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022), 10% tratavam de matrizes independentes com suco de frutas e vegetais (Agirman *et al.*, 2024). Outros 10% focaram no bagaço e suco da fruta (Esatbeyoglu *et al.*, 2023), 10% eram sobre sementes (Li *et al.*, 2023) e 20% sobre sucos de frutas (Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira 2023; Sun *et al.*, 2024).

Em relação ao substrato de origem, 30% dos estudos utilizaram kefir de leite (Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022; Li *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2024). Enquanto 70% utilizaram kefir de água como substratos de origem (Satir, 2022; De Carvalho *et al.*, 2024; Alves *et al.*, 2021; Ustaoglu-Gençgönül *et al.*, 2024; Agirman *et al.*, 2024; Esatbeyoglu *et al.*, 2023; Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira, 2023). Araújo *et al.* (2019) avaliaram as características físico-químicas do kefir de leite e de água em diferentes substratos (leite integral, leite de coco, arroz ou soja) usando um esquema fatorial. O estudo mostrou que o tipo de kefir influenciou propriedades como pH, sinérese, acidez e ganho de peso. O kefir de leite teve pH mais ácido e maior acidez nos substratos de leite integral e arroz. O kefir de água apresentou maior sinérese, pois sua composição mais líquida e menor formação de gel facilitam a separação do líquido, ao contrário do kefir de leite, que, sendo mais viscoso, retém mais o líquido. O ganho de peso variou conforme os substratos, com interação significativa entre o tipo de kefir e o meio. No entanto, a densidade não foi afetada, indicando estabilidade nas características estruturais.

As variedades de extratos vegetais e sucos de frutas investigados incluíram arroz, amêndoa e grão-de-bico (Ustaoglu-Gençgönül *et al.*, 2024), coco (Alves *et al.*, 2021), licuri (de Carvalho *et al.*, 2024), extrato de maçã, cenoura, beterraba e morango (Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022), cenouras pretas, maçãs, uvas e repolho verde (Agirman *et al.*, 2024), *Aronia melanocarpa* (Esatbeyoglu *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2023), *Cyperus esculentus* L. (Satir, 2022), semente de cânhamo (Li *et al.*, 2023) e morango (Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira, 2023). Entre os estudos, o de Agirman *et al.* (2024) foi o que apresentou a maior variedade de substratos investigados, com quatro diferentes tipos. Estabeyoglu *et al.* (2023) utilizaram o suco do bagaço de *Aronia melanocarpa* como substrato, enquanto Li *et al.* (2023) empregaram sementes de cânhamo (*Cannabis sativa* L.). Esses estudos evidenciam que, por meio de esforços de reaproveitamento, é possível viabilizar produtos inovadores e

sustentáveis, que atendem às expectativas dos consumidores, além de promover o aproveitamento de materiais que, de outra forma, seriam descartados pela indústria, alinhando-se à política de destinação zero para resíduos.

Quando avaliada às condições de fermentação, os estudos analisados utilizaram períodos que variaram de 12 horas (Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022) a 72 horas (Esatbeyoglu *et al.*, 2023). O estudo de Satir (2022) foi o único que não especificou o tempo de fermentação, considerando a diminuição do pH como o ponto final da fermentação. Quanto às temperaturas de fermentação, 80% dos estudos utilizaram  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  (Alves *et al.*, 2021; Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022; Satir, 2022; Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira, 2023; De Carvalho *et al.*, 2024; Ustaoglu-Gençgönül *et al.*, 2024; Agirman *et al.*, 2024; Sun *et al.*, 2024). 10% dos estudos utilizaram  $28^\circ\text{C}$  (Li *et al.*, 2023), e 10% utilizaram  $35^\circ\text{C}$  (Esatbeyoglu *et al.*, 2023). No que tange à quantidade de grãos de kefir utilizada para fermentação, a faixa variou de 1% (De Carvalho *et al.*, 2024; Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022) a 10% (Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira, 2023). Lima; Do Nascimento; De Farias (2019) realizaram um estudo sobre a influência do tempo de fermentação nas características físico-químicas e microbiológicas de kefir e observaram que o aumento do tempo de fermentação resulta em alterações significativas, como redução do pH, aumento da acidez total, intensificação do sabor ácido e mudanças na textura, com maior firmeza ou turbidez no kefir. Além disso, o consumo prolongado de açúcares pelos microrganismos reduz a doçura e altera o equilíbrio microbiano, favorecendo o desenvolvimento de cepas específicas e impactando as propriedades probióticas do kefir.

Quanto aos parâmetros físico-químicos analisados, todos os trabalhos avaliados determinaram o pH. O pH do kefir influencia diversos aspectos do produto, como a fermentação, a estabilidade microbiana, o sabor, a textura e as propriedades probióticas, podendo um pH mais baixo, ser resultante da produção de ácidos orgânicos, e atuar favorecendo o crescimento de bactérias lácticas benéficas, aumentando a acidez e intensificando o sabor ácido, além de afetar a separação do soro no kefir de leite (Kok-tas *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2013). Dessa forma, o pH desempenha um papel crucial na qualidade sensorial, na segurança microbiológica e nos benefícios à saúde do kefir. Os resultados do pH do kefir em diferentes substratos foram ácidos, variando de 3,39 (Esatbeyoglu *et al.*, 2023) a 4,80 (Alves *et al.*, 2021). 70% dos trabalhos (Alves *et al.*, 2021; Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022;

Agirman *et al.*, 2024; Esatbeyoglu *et al.*, 2023; Satir, 2022; Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira, 2023; Sun *et al.*, 2024) analisaram a concentração de sólidos solúveis (Brix), com resultados variando de 3,62 °Bx a 10,27 °Bx (Paredes; Escudero-Gilete; Vicario, 2022) A diminuição dos sólidos solúveis totais (SST) no kefir indica o progresso da fermentação, com os microrganismos metabolizando carboidratos e produzindo ácidos orgânicos, o que contribui para a redução do pH. Além disso, a diminuição dos SST pode afetar a textura e viscosidade do produto, influenciando suas propriedades sensoriais e estabilidade (Destro *et al.*, 2019; Jaime, Ramos e Sancho, 2022).

No tocante ao teor de proteínas (g/100g), 40% dos estudos (Alves *et al.*, 2021; De Carvalho *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2023; Satir, 2022) realizaram essa análise, os resultados mostraram uma variação de 0,84 (De Carvalho *et al.*, 2024) a 3,06 (Li *et al.*, 2023). Quanto ao teor de carboidratos (g/100g), 30% dos estudos (Alves *et al.*, 2021; De Carvalho *et al.*, 2024; Satir, 2022) apresentaram valores que variaram de 1,84 (Satir, 2022) a 12,41 (Alves *et al.*, 2021). A análise do teor de gorduras (g/100g) foi realizada em 20% dos estudos (Li *et al.*, 2023; Satir, 2022), com valores situando-se entre 2,50 e 3,09. As análises do teor de proteínas e carboidratos no kefir são fundamentais para avaliar seu perfil nutricional e funcional. O teor de proteínas é importante para garantir a qualidade proteica do produto, determinando sua contribuição para a saúde, como fornecimento de aminoácidos essenciais e propriedades bioativas. Já a análise dos carboidratos permite monitorar a fermentação e a redução da lactose, além de fornecer informações sobre o processo de conversão dos açúcares em ácidos e compostos bioativos, essenciais para o sabor, acidez e propriedades probióticas do kefir (Rios, Braga e Silva, 2019).

A concentração e a presença de ácidos orgânicos no kefir influenciam significativamente suas propriedades sensoriais, nutricionais e funcionais (Martins, 2006). O ácido láctico, principal ácido produzido durante a fermentação do kefir, e o ácido acético, ambos originados do catabolismo dos carboidratos pelas bactérias ácido-láticas e acéticas, contribuem para o sabor ácido do kefir, possuem propriedades antimicrobianas e auxiliam na conservação do produto. Além disso, ambos reduzem o pH, o que pode afetar a textura e viscosidade do produto (Bosch *et al.*, 2006; Magalhães *et al.*, 2010).

O teor de ácidos (mg/L) foi realizado em dois estudos, e cinco ácidos foram investigados em ambos. O ácido acético foi encontrado em quantidades significativamente maiores no estudo de Satir (2022), variando de 702,05 a 1138,10

mg/L, comparado ao estudo de Paredes; Escudero-Gilete; Vicario (2022), onde variou de 37,01 a 266,81 mg/L. O ácido cítrico também foi mais abundante no estudo de Satir (2022), com valores de 1126,37 a 1589,90 mg/L, em contraste com o estudo de Paredes; Escudero-Gilete; Vicario (2022), que apresentou variações de 498,22 a 682,86 mg/L. O ácido láctico apareceu em quantidades elevadas em ambos os estudos, mas o estudo de Satir (2022) revelou valores mais altos, variando de 2439,58 a 2958,54 mg/L, enquanto o estudo de Paredes; Escudero-Gilete; Vicario (2022) apresentou valores de 289,61 a 3250,47 mg/L. O ácido málico foi encontrado em níveis comparáveis em ambos os estudos, com o estudo de Paredes; Escudero-Gilete; Vicario (2022) mostrando variações de 201,32 a 380,75 mg/L, e o estudo de Satir (2022) variando de 191,53 a 309,25 mg/L. O ácido succínico foi encontrado em maior concentração no estudo de Paredes; Escudero-Gilete; Vicario (2022), com valores de 1552,87 a 2244,70 mg/L, comparado ao estudo de Satir (2022), onde os níveis foram 965,95 mg/L para ambas as amostras. Garrote *et al.* (2006) observaram que o efeito bacteriostático do kefir sobre a *Escherichia coli* é atribuído principalmente aos ácidos orgânicos gerados durante a fermentação.

A discussão sobre as concentrações de microrganismos probióticos nos diferentes tipos de kefir deveria ser contextualizada conforme as especificações das normas regulatórias brasileiras, além das variações observadas nos estudos. Contudo, a regulamentação brasileira vigente não contempla kefir produzido a partir de substratos vegetais ou frutas, limitando-se ao kefir de leite animal. O regulamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2007) para leites fermentados, incluindo o kefir, estabelece requisitos microbiológicos rigorosos, como a exigência de contagem mínima de  $10^7$  UFC/g para bactérias lácticas totais e  $10^4$  UFC/g para leveduras específicas, além da pesquisa de microrganismos patogênicos como coliformes e bolores. Em relação à identidade, o kefir é descrito como um produto resultante da fermentação realizada com cultivos de bactérias ácido-láticas originados a partir de grãos de kefir, incluindo espécies como *Lactobacillus kefir*, bem como diferentes gêneros como *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, responsáveis pela produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são compostos por uma comunidade microbiana complexa, que inclui leveduras que fermentam lactose, como *Kluyveromyces marxianus*, e leveduras não fermentadoras de lactose, como *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces*

*cerevisae* e *Saccharomyces exiguus*, além de bactérias como *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* (Brasil, 2007).

Nos seis estudos analisados, foram observadas variações nas contagens de *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, e leveduras, com diferentes níveis de concentração para cada microrganismo. No estudo de Satir (2022), as contagens de *Lactococcus spp.* para kefir de tigernut variaram de 8,71 a 8,78 log UFC/ml, enquanto *Lactobacillus spp.* apresentou valores de 6,94 a 8,14 log UFC/mL. Agirman *et al.* (2024) reportaram contagens de bactérias lácticas em kefir de fontes vegetais, como uva, cenoura preta, maçã e repolho verde, com a maior contagem observada no kefir de cenoura preta ( $8,03 \pm 0,18$  log UFC/ml). Esses resultados indicam que as concentrações de bactérias lácticas variam conforme o substrato utilizado na fermentação, mas geralmente atendem às exigências mínimas de  $10^7$  UFC/g, conforme estipulado pelo regulamento técnico (Brasil, 2007). O estudo de De Carvalho *et al.* (2024) apresentou as maiores contagens de microrganismos entre os estudos, com bactérias lácticas variando entre  $9,40 \pm 0,08$  e  $9,24 \pm 0,03$  log UFC/ml, e leveduras entre  $4,65 \pm 0,02$  e  $5,34 \pm 0,02$  log UFC/ml. Este estudo também observou a predominância de bactérias ácido-láticas (58,27%) e a presença de uma pequena quantidade de bactérias ácido-acéticas (0,24%), evidenciando a eficiência da fermentação na obtenção de microrganismos probióticos benéficos.

Adicionalmente, Alves *et al.* (2021) e Da Silva Araújo, Macedo e Teixeira (2023) relataram um predomínio de bactérias ácido-láticas em kefir de diferentes fontes vegetais, embora sem especificar as contagens exatas. Ustaoglu-Gençgönül *et al.* (2024) forneceram dados detalhados sobre diferentes tipos de kefir, como os de amêndoa, arroz e grão-de-bico, observando variações nas contagens de *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, e leveduras. No kefir de amêndoa, por exemplo, as contagens foram 8,3 log UFC/ml para *Lactobacillus spp.* e 7,73 log UFC/ml para *Lactococcus spp.*, com leveduras em 5,36 log UFC/ml. O kefir de arroz, por sua vez, apresentou 5,64 log UFC/ml para *Lactobacillus spp.* e 8,5 log UFC/ml para *Lactococcus spp.*, com leveduras em 3,62 log UFC/ml. A presença de leveduras foi observada em todos os estudos que relataram suas contagens, com as maiores concentrações encontradas no estudo de De Carvalho *et al.* (2024), refletindo a complexidade microbiana do kefir, que inclui tanto bactérias ácido-láticas quanto leveduras. Comparando os estudos, as contagens de *Lactococcus spp.* foram mais altas nos estudos de Satir (2022) e

Ustaoğlu-Gençgönül *et al.* (2024), enquanto *Lactobacillus spp.* teve as maiores contagens no estudo de De Carvalho *et al.* (2024).

Maria *et al.* (2021) avaliaram a fermentação de extratos vegetais (amêndoas, arroz, aveia, castanha do Brasil, coco e soja) fermentados com kefir de água e relataram uma concentração final de sólidos solúveis variando entre 4,0 e 5,1 °Bx e pH entre 4,53 e 6,10, além de contagem de bactérias lácticas superior a  $10^6$  UFC/mL, sendo a maior concentração observada na bebida de castanha do Brasil com sacarose ( $10^8$  UFC/mL), corroborando os resultados desta revisão. Outro estudo, que produziu uma bebida a partir do extrato hidrossolúvel de soja suplementado com polpa de bocaiúva e inulina, apresentou contagem microbiológica superior a  $10^7$  UFC/mL para *Lactococcus*, *Lactobacillus* e leveduras (Silva, 2019), mais uma evidência que reforça os achados.

#### 4.4 Conclusão

A análise dos impactos do uso de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos para a produção de kefir revelou variações significativas nas características do produto. Os estudos revisados demonstram que tanto a viabilidade microbiana quanto as propriedades químicas do kefir podem variar consideravelmente dependendo do substrato utilizado. Esses avanços são importantes, pois fornecem uma visão mais detalhada sobre as características de diferentes tipos de produtos, permitindo um maior entendimento sobre o comportamento do kefir em diferentes contextos geográficos e ambientais.

Contudo, é importante destacar que esses estudos são provenientes de diversas regiões do mundo, o que implica variações nas condições climáticas, nos locais de coleta dos vegetais e em outros fatores bióticos e abióticos, que influenciam diretamente esses tipos de substratos e, por consequência, o kefir produzido. Apesar dos progressos, é evidente que mais estudos são necessários para aprofundar a compreensão das interações entre os substratos vegetais e as propriedades físico-químicas e microbiológicas do kefir.

Essas investigações são cruciais para promover o desenvolvimento de novas formulações, que atendam às demandas de uma dieta diversificada e saudável, além de possibilitar o reaproveitamento de resíduos vegetais, alinhando-se aos princípios da sustentabilidade. Para avançar nesse sentido, é fundamental avaliar não apenas a composição microbiológica e as propriedades físico-químicas, mas também a

bioacessibilidade de compostos bioativos. Além disso, a realização de ensaios clínicos será indispensável para validar os benefícios à saúde e estabelecer padrões de controle de qualidade específicos, viabilizando a implementação comercial desses produtos inovadores, sustentáveis e com impacto social, valorizando a agricultura familiar e agregando valor a recursos locais. Dessa forma, esses esforços podem atender às expectativas do mercado consumidor global, promovendo benefícios tanto para a saúde quanto para a sustentabilidade ambiental.

#### 4.5 Referências

AGIRMAN, B. *et al.* The evaluation of black carrot, green cabbage, grape, and apple juices as substrates for the production of functional water kefir-like beverages. **Food Science & Nutrition**, 2024.

ALVES, V. *et al.* Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. **LWT**, v. 145, p. 111364, 2021.

ARAÚJO, M.F. *et al.* Kefir de água e leite: composição físico-química em diferentes substratos. **RBONE-Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 13, n. 80, p. 645-651, 2019.

AZIZI, N. F. *et al.* Kefir and its biological activities. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1210, 2021.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Brasília, DF, 2007.

COSTA, K.K.F.D. *et al.* Rheological properties of fermented rice extract with probiotic bacteria and different concentrations of waxy maize starch. **LWT - Food Science and Technology**, 72, 71-77, 2016

DA SILVA AÚJO, C.A; MACEDO, L. L; TEIXEIRA, L. J. Q. Evaluation of mid-infrared spectra associated with chemometrics for the determination of physicochemical properties during fermentation of a new strawberry-based beverage with water kefir grains. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 123, p. 105490, 2023.

DE CARVALHO ALVES, J. *et al.* Licuri Kernel (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari): A Promising Matrix for the Development of Fermented Plant-Based kefir beverages. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 2056, 2024.

DESTRO, T. M. *et al.* Organic brown sugar and jaboricaba pulp influence on water kefir fermentation. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 43, p. 1-17, 2019.

DONG, J. *et al.* The biofilm hypothesis: The formation mechanism of Tibetan kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 44-50, 2018.

ESATBEYOGLU, T. *et al.* Physical, chemical, and sensory properties of water kefir produced from *Aronia melanocarpa* juice and pomace. **Food Chemistry: X**, v. 18, p. 100683, 2023.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 364-369, 2000.

GOVERNA, P. *et al.* Evaluation of the in vitro wound-healing activity of Calabrian honeys. **Antioxidants**, v. 8, n. 2, p. 36, 2019.

JAIME, C.E. F; RAMOS, G.G; SANCHO, R. A.S. Propriedades do fermentado kefir de água em diferentes substratos alimentares. **Revista Perspectiva**, v. 46, n. 6, p. 69-83, 2022.

KIZZIE-HAYFORD, N. *et al.* Effects of protein enrichment on the microbiological, physicochemical and sensory properties of fermented tiger nut milk. **LWT - FoodScience and Technology**, 74, 319-324, 2016.

KÖK-TAŞ, T. *et al.* Efeitos de diferentes parâmetros de fermentação nas características de qualidade do kefir. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 2, p. 780-789, 2013.

LAGOURI, V.; DIMITRELI, G.; KOUVATSI, A. Effects of Greek pomegranate extracts in the antioxidant properties and storage stability of kefir. **Current Bioactive Compounds**, v. 15, n. 4, p. 437-441, 2019.

LEITE, A.M.O. *et al.* Características microbiológicas e químicas do kefir brasileiro durante os processos de fermentação e armazenamento. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 7, p. 4149-4159, 2013.

LIMA, R. M. R.; DO NASCIMENTO, K. K. B.; DE FARIAS, V. L. Influência do tempo de fermentação nas características físico-químicas e microbiológicas de kefir. **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 6, p. 2364-2373, 2019.

LI, X. *et al.* Effects of fermentation with kefir grains on nutrient composition, flavor volatiles, and product physical stability of a hemp seed (*Cannabis sativa* L.) beverage. **LWT**, v. 183, p. 114934, 2023.

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, p. 1241-1250, 2010.

MARIA,T.C. *et al.* Estudo da Fermentação de Extratos Vegetais Utilizando kefir de água. **FOCO: Caderno de estudos e pesquisas**. n. 20.2021.

MARTINS, L. S. **Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentado pelos grãos de kefir e do Tibet utilizando técnicas voltamétricas e HPLC**. 2006. Tese (Doutorado em Ciências) – Química analítica - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

NAVES, L.P; CORRÊA, A.D; SANTOS, C.D; ABREU, C.M.P. Componentes antinutricionais e digestibilidade proteica em sementes de abóbora (*Cucurbita maxima*) submetidas a diferentes processamentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(1). 180-184, 2010.

- NOBERTO, A.P. *et al.* Impact of partial and total replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, 93, 491–498, 2018
- PAJE, M. *et al.* PRISMA 2020 explanation and elaboration: updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. **BMJ**. v.372, n. 160, p. 1-36, 2021.
- PANGHAL, A. *et al.* Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, 21, 80–89, 2018.
- PAREDES, J. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; VICARIO, I. M. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. **LWT**, v. 154, p. 112728, 2022.
- PIMENTEL, T.C. *et al.* Vegan probiotic products: A modern tendency or the newest challenge in functional foods. **Food Research International**, v. 140, p. 110033, 2021.
- RIOS, D. A. da S.; BRAGA, A. R. C.; SILVA, E. M. C. da. Avaliação dos parâmetros físico-químicos de extratos vegetais pré e pós fermentação por kefir. **Hig. aliment**, p. 1304-1308, 2019.
- SATIR, G. The effects of fermentation with water kefir grains on two varieties of tigernut (*Cyperus esculentus* L.) milk. **LWT**, v. 171, p. 114164, 2022.
- SILVA, E.O; SANTOS, F.L. **Estratégias de popularização do kefir**. Cruz das Almas, Bahia: UFRB, In: SANTOS, FL (Org.) 2015. p. 53-64.
- SILVA, J.C.M. **Bebida à base de soja fermentada com kefir suplementada com polpa de bocaiúva (*Acrocomia aculeata*) e inulina**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia. Rio Verde, 2019.
- SOUSA, M.T. de; SILVA, M.D. da; CARVALHO, R. de. Revisão integrativa: o que é e como fazer. **Einstein** (São Paulo), v. 8, p. 102-106, 2010.
- SUN, M.C. *et al.* Exploring the mechanism of milk kefir grain fermentation to improve the palatability of chokeberry juice. **LWT**, v. 213, p. 117074, 2024.
- USTAOĞLU-GENÇGÖNÜL, M. *et al.* Chemical, microbial, and volatile compounds of water kefir beverages made from chickpea, almond, and rice extracts. **European Food Research and Technology**, p. 1-12, 2024.

## **DESENVOLVIMENTO DO ESTUDO – CAPÍTULO 4**

### **5 HIPÓTESE**

A liofilização do kefir de castanhas mantém a viabilidade das bactérias e leveduras presentes no produto, permitindo sua utilização na produção em larga escala de bebidas vegetais fermentadas?

### **6 OBJETIVOS**

#### **6.1 Objetivo geral**

Avaliar a viabilidade dos microrganismos do kefir de castanhas após o processo de liofilização, averiguar seu potencial para a elaboração de uma bebida vegetal fermentada estável e executar uma análise sensorial em ambos os produtos.

#### **6.2 Objetivos específicos**

- Investigar as características organolépticas e físico-químicas do inóculo líquido do kefir de castanhas e comparar com o exigido na legislação brasileira para kefir;
- Examinar a viabilidade do inóculo líquido do kefir de castanhas, especificamente, a contagem de bactérias ácido lácticas totais e leveduras, obter o kefir liofilizado de castanhas a partir dele, analisar o kefir liofilizado de castanhas em termos da viabilidade celular e comparar com as análises microbiológicas iniciais e finais do inóculo líquido do kefir de castanhas;
- Determinar a taxa de sobrevivência dos microrganismos no kefir liofilizado durante 1 ano e 6 meses de armazenamento em temperatura de geladeira ( $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ );
- Desenvolver uma bebida vegetal fermentada com açaí, suco de uva e suco de cranberry utilizando o kefir liofilizado como cultura iniciadora;
- Estudar a estabilidade e viabilidade da bebida através de testes como: determinação de pH, acidez total, sólidos solúveis totais e contagem de bactérias ácido lácticas totais e leveduras durante 5 meses de armazenamento, sob refrigeração ( $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ );
- Realizar uma análise sensorial do kefir liofilizado de castanhas e da bebida vegetal fermentada.

## **7 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **7.1 Materiais**

#### **7.1.1 Reagentes e meios de cultura**

As soluções tampões de pH 4,00 e 10,00, fenolftaleína 1% alcoólica (Neon), hidróxido de sódio P.A - ACS micropérolas (Dinâmica), solução de azul de metileno 1% (Êxodo), cloreto de sódio P.A - ACS (Dinâmica), ágar Man, Rogosa e Sharpe (Merck), ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi), 3M™ Petrifilm™ EC/CT e 3M™ Petrifilm™ CC termotolerantes foram adquiridos na Casa do Laboratório ou em sites de compra especializados nesse segmento.

#### **7.1.2 Equipamentos**

Todos os equipamentos utilizados para a realização dessa pesquisa pertencem ao setor de produção ou ao controle de qualidade da BioLogicus: Termohigrômetros (Incoterm); Liofilizador (Liotop); Balança semi analítica (Marte); Vórtex homogeneizador (BiomiXer); Câmara fria; Capela de fluxo laminar (Telstar); Estufa bacteriológica de 35°C (Caltech); Estufa bacteriológica de 40°C (Medclave); Incubadora BOD (Marte); Contador de colônias (Phoenix); Peneira (Bestfer); pHmetro digital (Gehaka); Bureta (Uniglas) e suporte; Refratômetro de Brix (7lab); Autoclave (Quimis) e Destilador de água (Marte).

### **7.2 Métodos**

#### **7.2.1 Obtenção da amostra do inóculo líquido de kefir de castanhas**

As amostras do inóculo líquido de kefir de castanhas (IL) foram obtidas no setor de Pesquisa e Desenvolvimento da empresa de Biotecnologia Probiótica Indústria e Comércio LTDA - BioLogicus. Para a adaptação dos grãos de kefir de leite bovino à bebida vegetal de castanhas, foi utilizada a bebida vegetal de castanha-de-caju e castanha-do-pará da marca “A Tal da Castanha”, adquirida no mercado local, esse processo foi realizado conforme planejamento experimental pré-determinado (patente BR 10 2014 002784-0). Os grãos utilizados no estudo são provenientes da empresa BioLogicus e seguem padronização, controle e garantia de qualidade, possuindo em sua composição 20 principais cepas de microrganismos, dentre eles: *Bifidobacterium*

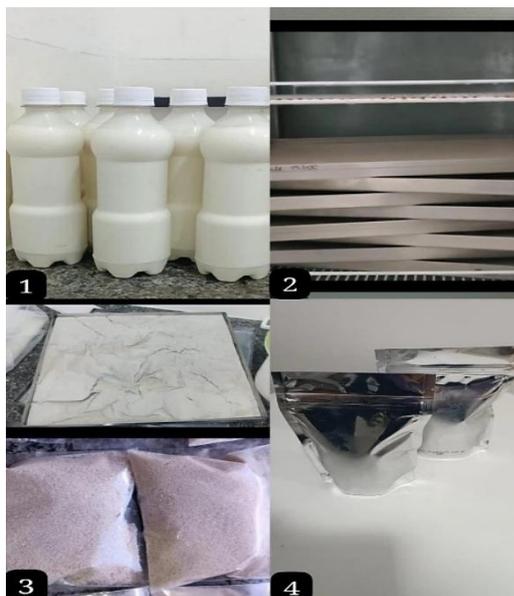
*bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Kazachstania servazzii*, *Kazachstania unispora*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pichia fermentans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Streptococcus thermophilus*.

No laboratório de Controle de Qualidade da BioLogicus, as amostras do inóculo foram armazenadas em temperatura  $5 \pm 2$  °C. Preliminarmente, foi realizada uma contagem total de bactérias ácido lácticas totais e leveduras com o intuito comparativo posteriormente. As amostras seguiram para o setor de produção da empresa para dar início ao processo de liofilização.

### **7.2.2 Obtenção do kefir liofilizado de castanhas**

Os pós foram obtidos por meio de liofilização, seguindo as diretrizes estabelecidas no Procedimento Operacional Padrão da BioLogicus. Inicialmente, um litro das amostras do inóculo foi distribuído em cada uma das oito bandejas de aço inox, totalizando oito litros em oito bandejas. Estas foram então submetidas a um congelamento prévio de 48 horas a -40°C. Posteriormente, no liofilizador, o processo de liofilização teve uma duração de aproximadamente 24 horas, a uma temperatura de -25°C, com um vácuo mantido abaixo de 1000µHg. Ao término do processo, as bandejas foram retiradas com uma temperatura de 27°C, indicando o término da liofilização. O kefir liofilizado (KL) resultante foram então peneirados e armazenados em sachês de alumínio estéreis (Figura 1).

Figura 1 - Etapas do processo de liofilização



Legenda: 1: Garrafas do inóculo líquido do kefir de castanhas; 2- Bandejas com o inóculo no ultrafreezer; 3- Bandeja com produto após a liofilização e em saco plástico após passar por peneiramento; 4- Kefir liofilizado na embalagem final de armazenamento. Fonte: Autoria própria (2024)

## 7.2.3 Elaboração da bebida vegetal fermentada

### 7.2.3.1 Inóculo para produção da bebida

Foram utilizados 75 g de açaí puro obtidos na Casa do Pará, 750 ml de água, 60 g de açúcar demerara da marca Petribu e 20 g de kefir liofilizado (cultura-mãe). Inicialmente, as matérias-primas foram pesadas, e o açaí foi misturado com a água em um liquidificador. Após essa etapa, realizou-se a primeira medição do teor de sólidos solúveis ( $^{\circ}\text{Bx}$ ), que apresentou valor de  $1,0^{\circ}\text{Bx}$ . Em seguida, adicionou-se o kefir liofilizado e mediu-se novamente o teor de sólidos solúveis, obtendo-se  $1,9^{\circ}\text{Bx}$ . Posteriormente, 5 ml de suco de limão foram adicionados e o açúcar demerara foi incorporado gradualmente até que a mistura atingisse  $10,0^{\circ}\text{Bx}$ .

O inóculo, nessa etapa, apresentou pH inicial de 3,98 e foi transferido para um Erlenmeyer de 1 litro, o qual foi fechado utilizando um tampão composto por algodão e filme plástico. A fermentação foi conduzida à temperatura controlada de  $25^{\circ}\text{C}$  por um período de 24 horas em Incubadora BOD da marca Marte. Ao final do processo fermentativo, o teor de sólidos solúveis reduziu-se para  $8,0^{\circ}\text{Bx}$ , e o pH diminuiu para 3,05. O processo de fermentação foi então interrompido, e o inóculo foi armazenado sob refrigeração a uma temperatura de  $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

### **7.2.3.2 Bebida vegetal fermentada**

Foram utilizados 1% (10 ml) do inóculo, 400 ml de suco de uva integral da marca OQ, 400 ml de suco de cranberry da marca Juxx e 200 ml de água. Inicialmente, os sucos de uva e cranberry foram misturados em um béquer, e o teor de sólidos solúveis (°Brix) foi medido, apresentando valor de 15 °Bx. Em seguida, adicionaram-se a água, 5 ml de suco de limão e o inóculo, sendo realizada nova medição, que resultou em 10 °Bx e pH 4,07.

A mistura foi transferida para recipientes de 1 litro, que foram fechados com tampões compostos por algodão e filme plástico. A fermentação foi iniciada à temperatura controlada de 25 °C em incubadora BOD da marca Marte, e o °Brix e o pH foram monitorados a cada 12 horas. Após as primeiras 12 horas, observou-se uma redução do pH para 3,50 e do teor de sólidos solúveis para 9,5 °Bx. Após 24 horas, o pH atingiu 3,23 e o teor de sólidos solúveis reduziu-se para 9,0 °Bx. Nesse ponto, o processo fermentativo foi interrompido.

O produto final foi acondicionado em garrafas plásticas previamente higienizadas e sanitizadas e, posteriormente, armazenado em câmara fria a uma temperatura de 5 °C.

### **7.2.4 Determinação dos parâmetros físico-químicos e organolépticos**

As análises físico-químicas para o inóculo líquido do kefir de castanhas e bebida vegetal fermentada (sólidos solúveis totais, potencial hidrogeniônico e determinação de acidez total) foram executadas em triplicata, segundo as metodologias propostas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008). A análise dos teores de sólidos solúveis foi realizada utilizando um refratômetro digital portátil, e os resultados foram expressos em graus Brix (°Bx). As análises organolépticas investigadas (aspecto, cor, odor e sabor) foram avaliadas e estabelecidas conforme avaliação visual, olfativa e gustativa do pesquisador

O potencial de hidrogênio (pH) das amostras da bebida vegetal fermentada foi medido com um potenciômetro digital devidamente calibrado, utilizando soluções tampões comerciais pH 4,00 e 10,00. A determinação da acidez total foi conduzida através da titulação da amostra com NaOH 0,1M, e os resultados foram apresentados em g/100 ml.

### 7.2.5 Caracterização microbiológica

O inóculo líquido do kefir de castanhas, o kefir liofilizado de castanhas e a bebida vegetal fermentada, foram submetidos às análises de contagem de microrganismos totais (bactérias ácido-lácticas e leveduras) utilizando a metodologia empregada no Procedimento Operacional Padrão do laboratório de controle de qualidade da BioLogicus que obteve como referência métodos tradicionais (AOAC, 2002); (APHA, 2001) e (Da Silva *et al.*, 2007). Os resultados foram expressos em Unidade Formadora de Colônias por grama de amostra (UFC/g) ou (UFC/ml). As amostras também foram submetidas a pesquisa de coliformes totais e termotolerantes.

Para realizar as diluições seriadas, 1 ml (quando a amostra foi líquida) ou 1g (quando a amostra foi em pó) foram introduzidos de maneira asséptica em tubos de ensaio, contendo 9 ml de cloreto de sódio 0,85% previamente esterilizado. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vórtex por cerca de 1 minuto, resultando na obtenção da primeira diluição ( $10^{-1}$ ).

A partir da diluição  $10^{-1}$ , uma alíquota de 1 ml foi transferida asepticamente para um tubo de ensaio contendo 9 ml de cloreto de sódio 0,85%, ambos estéreis, resultando na diluição  $10^{-2}$ . A mistura foi homogeneizada em um vórtex. As diluições subsequentes seguiram um processo semelhante, até alcançar a diluição  $10^{-6}$ , e foram então inoculadas nos meios de cultura descritos posteriormente.

A avaliação da contagem de bactérias ácido lácticas foi conduzida utilizando o meio de cultura Ágar Man, Rogosa e Sharpe (MRS), que é seletiva para bactérias ácido lácticas. O procedimento de plaqueamento foi realizado em triplicata. No caso da contagem, 1 ml das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foi inoculado em placas de Petri descartáveis. Em seguida, aproximadamente 25 ml do meio MRS previamente esterilizado a  $121^{\circ}\text{C}/15$  minutos foram adicionados. Após a adição do meio de cultura, as placas foram homogeneizadas. Em seguida, com a solidificação dos meios, as placas foram invertidas e colocadas em Jarra anaeróbica, sendo incubadas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 3 dias.

A quantificação de leveduras foi conduzida utilizando o mesmo procedimento empregado na contagem de bactérias. Em triplicata, 1 ml das diluições  $10^{-4}$  e  $10^{-6}$  foi plaqueado em placas de Petri descartáveis. Posteriormente, aproximadamente 25 ml

do meio Ágar Sabouraud Dextrose, previamente esterilizado a 121°C/15 minutos, foi adicionado às placas e homogeneizado. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram viradas de cabeça para baixo e incubadas a 30°C por 5 dias em condições aeróbias.

Para a investigação e quantificação de coliformes totais e termotolerantes, uma alíquota de 1 ml da diluição  $10^{-2}$  das amostras foi inoculada em placas Petrifilm 3M destinadas aos coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (Ec) e coliformes termotolerantes (CTT). Subsequentemente, as placas foram incubadas em uma estufa a 35°C por 24 horas para coliformes totais e *Escherichia coli*. Para coliformes termotolerantes, foram incubadas em estufa a 45°C por 24 horas.

### **7.2.6 Análise sensorial**

A análise sensorial do kefir liofilizado de castanhas e da bebida vegetal foi aprovada pelo comitê de ética, CAAE: 81614524.7.0000.5208, sob número do parecer: 7.021.458, de acordo com as Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde. Seu objetivo foi avaliar a aceitabilidade do kefir liofilizado de castanhas e da bebida vegetal fermentada.

O estudo contou com a participação de 30 provadores não treinados, recrutados entre os clientes regulares da BioLogicus, consumidores de kefir, homens e mulheres a partir dos 18 anos, atendendo aos seguintes critérios de inclusão: ser maior de 18 anos, consumidores habituais de kefir. Foram excluídos bebês, crianças, gestantes e participantes intolerantes ou alérgicos a qualquer componente das formulações. Um convite foi realizado para os interessados, explicando os objetivos do estudo, os critérios de inclusão e exclusão e os procedimentos da análise sensorial. Os interessados passaram por uma triagem para garantir que atendiam aos critérios de inclusão. Após a triagem, os voluntários elegíveis foram agendados para as sessões de análise sensorial, realizadas no local da empresa, na Avenida Afonso Olindense, 72, Várzea, Recife-PE, em horários que respeitavam a disponibilidade dos participantes e dos pesquisadores.

Antes do início das sessões, os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, no qual foram detalhados os objetivos, procedimentos, riscos e benefícios do estudo. Os participantes tiveram a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas antes de consentir em participar da pesquisa. Durante as sessões, foi utilizada uma escala hedônica de 7 pontos, variando de 7

(gostei extremamente) a 1 (desgostei extremamente). As amostras foram apresentadas aleatoriamente, e, entre as degustações, os participantes consumiram água para neutralizar os sabores. Após a degustação, preencheram um formulário de análise sensorial de ambos os produtos.

### **7.2.7 Análise estatística**

Foi utilizado a linguagem de programação Python e bibliotecas específicas para ciência de dados. O desenvolvimento prático ocorreu em etapas, começando pela estruturação e verificação da consistência das bases de dados, seguida pela análise exploratória dos dados. Posteriormente, foram realizados testes de normalidade (Shapiro-Wilk, Anderson-Darling e Lilliefors), testes de Friedman, o pós-hoc de Dunn e, por fim, uma análise temporal.

As análises físico-químicas (pH, sólidos solúveis e acidez total), do inóculo líquido e da bebida vegetal fermentada realizadas em triplicata, foram avaliadas com base na comparação entre médias e variâncias, além da aplicação dos testes de normalidade para verificar a distribuição dos dados.

No experimento de viabilidade (contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras totais), também realizado em triplicata, os resultados foram analisados comparando as médias e variâncias utilizando os testes de Friedman e pós-hoc de Dunn, com um nível de significância de 5%, por meio das bibliotecas Python "scipy.stats" e "scikit\_posthocs".

As análises sensoriais (kefir liofilizado e bebida vegetal fermentada) foram conduzidas com 30 provadores não treinados, e os resultados foram avaliados pela comparação entre médias e variâncias, com ênfase na análise de distribuição por meio dos testes de normalidade e visualização em gráficos de coluna. Todos os gráficos foram gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

## 8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 8.1 Características organolépticas e físico-químicas do inóculo líquido do kefir de castanhas

Os resultados obtidos referentes às características organolépticas e físico-químicas do inóculo líquido do kefir de castanhas comparados com o exigido na legislação, estão dispostos no Quadro 1.

**Quadro 1** - Análises organolépticas e físico-químicas do Inóculo líquido do kefir de castanhas

|                                    | Características organolépticas                      |   |   | Características físico-químicas |                  |            |
|------------------------------------|---|---|---|---------------------------------|------------------|------------|
|                                    | Aspecto   | Cor   | Odor/Sabor  | pH                              | Acidez total (%) | SS         |
| Inóculo líquido                    | Líquido pastoso                                     | Branco amarelado  | Característico de fermentado  | 4,10 ± 0,005                    | 0,90% ± 0,015    | 6,2 ± 0,00 |
| Legislação IN N. 46 de 2007 - MAPA | Consistência firme, pastosa, semissólida ou líquida | Branca ou de acordo com a substância(s) alimentícia(s) e/ou corante(s) adicionado(s). | Característico ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou substância(s) aromatizante(s)/saborizante(s) adicionada(s) | -                               | <1%              | -          |

Legenda: SS- Sólidos solúveis; pH-potencial hidrogeniônico Fonte: Autoria própria (2024).

De acordo com Caetano e Montanhini (2014) o kefir é um alimento caseiro fermentado à temperatura ambiente, o que dificulta o controle da temperatura e a padronização do pH. Em dias mais quentes, o kefir torna-se mais ácido, o que contribui para um efeito antimicrobiano contra patógenos. No entanto, um pH muito baixo pode afetar negativamente a aceitação do consumidor.

Na análise físico-química, o pH do inóculo líquido do kefir de castanhas foi de 4,1, valor esperado para produtos fermentados e próximo ao do iogurte (4,6), considerado mais agradável ao paladar (Wulansari *et al.*, 2023). A acidez total, medida em 0,90%, está dentro dos padrões exigidos para o kefir pela legislação, alinhando-se a resultados relatados por Araújo *et al.* (2017). Já os sólidos solúveis, com valor de 6,2, confirmam a presença esperada de componentes solúveis no inóculo, como destacado por Costa *et al.* (2018).

## 8.2 Avaliação da viabilidade do inóculo líquido do kefir de castanhas em comparação ao kefir liofilizado inicialmente (24 horas)

Os resultados médios obtidos da contagem inicial de bactérias ácido-láticas totais e leveduras totais das amostras do inóculo líquido do kefir de castanhas e do kefir liofilizado de castanhas, comparados com o exigido na legislação, estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Contagem inicial de bactérias ácido-láticas e leveduras nas amostras do inóculo líquido do kefir de castanhas e do kefir liofilizado.

| Amostras<br>(24 horas) | Bactérias ácido láticas<br>totais | Leveduras totais UFC/g | Coliformes totais/<br><i>Escherichia coli</i> | Coliformes<br>termotolerantes |
|------------------------|-----------------------------------|------------------------|---|-------------------------------|
| IL (UFC/ml)            | 8,53x10 <sup>7</sup>              | 6,30x10 <sup>7</sup>   | AUS   | AUS                           |
| KL (UFC/g)             | 1,17x10 <sup>8</sup>              | 7,63x10 <sup>7</sup>   | AUS   | AUS                           |
| Legislação<br>(UCF/ml) | Mínimo 10 <sup>7</sup>            | Mínimo 10 <sup>4</sup> | <10 (NMP/g)                                   | <3 (NMP/g)                    |

Legenda: IL: inóculo líquido; KL: Kefir liofilizado. AUS: ausente; UFC/g: Unidade formadora de colônia por grama; UFC/ml: Unidade formadora de colônia por ml; NMP/g: Número mais provável por grama.

Fonte: Autoria própria (2024)

A avaliação da quantidade de microrganismos após o processo de liofilização revelou que apesar de estarem em formas distintas, a viabilidade inicial permaneceu alta, com a quantificação dos microrganismos presentes no pó apresentando uma quantificação maior do que o encontrado no inóculo líquido.

Infere-se que a disparidade entre o aumento da contagem de bactérias ácido láticas e leveduras após a liofilização pode ser atribuída, em parte, à concentração de microrganismos no processo. A liofilização envolve a remoção da água presente no inóculo, o que resulta em uma maior concentração de microrganismos por peso. Esse aumento na concentração pode levar a uma contagem total mais elevada de bactérias ácido-láticas e leveduras em comparação com a forma líquida, onde os microrganismos estão mais dispersos.

Ademais, a parede celular das leveduras é estruturalmente mais complexa do que a das bactérias, possuindo uma combinação de polissacarídeos, glicoproteínas e quitina, enquanto as bactérias geralmente apresentam uma parede composta principalmente por peptidoglicano (Kuhn, 2019; Brown; Esher; Alspaugh, 2019). Durante a liofilização, diversas mudanças estruturais ocorrem nas células dos microrganismos devido à desidratação extrema e ao congelamento. Esse processo pode causar o colapso estrutural da parede celular e da membrana plasmática, além de reduzir a fluidez da membrana, criando fissuras e danos causados pela formação de cristais de gelo (Rockinger; Funk; Winter, 2021). Se o inóculo tivesse passado por uma temperatura mais baixa (-80°C) antes do processo de liofilização como em outros estudos que utilizam esse padrão para liofilização com leveduras (Has *et al.*, 2020; Freitas *et al.*, 2020), ao invés de -40°C, é provável que as leveduras passariam por menos danos causados pelos cristais de gelo. Isso ocorreria porque, como relata por Mazur (1984) em temperaturas mais baixas, a formação de cristais de gelo seria mais controlada e menos agressiva à estrutura celular, reduzindo os danos mecânicos à parede celular e à membrana, com um congelamento mais lento e controlado, as leveduras teriam mais tempo para formar uma estrutura vitrificada e, conseqüentemente, melhor preservação de sua integridade celular.

Em relação aos padrões microbiológicos regulatórios estabelecidos, a princípio tanto o inóculo líquido quanto no kefir liofilizado apresentaram níveis acima do mínimo exigido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Além disso, no que diz respeito à pesquisa de coliformes totais e fecais, ambas as amostras registraram ausência desses microrganismos. Esse resultado atesta a conformidade sanitária das amostras analisadas. Ghedini *et al.* (2020) analisaram a qualidade microbiológica do kefir e verificaram ausência de coliformes termotolerantes em todas as amostras. No entanto, algumas amostras apresentaram coliformes totais (35°C) em quantidades de 43 NMP/g. De acordo com a legislação, os níveis aceitáveis de contagem para coliformes a 35°C e 40°C variam de 10 a 100 NMP/g, respectivamente.

### **8.3 Avaliação da viabilidade do inóculo líquido do kefir de castanhas em comparação ao kefir liofilizado após 60 dias.**

É possível constatar que a contagem total de bactérias ácido lácticas totais e leveduras totais no inóculo líquido apresentou uma significativa redução na contagem

dos microrganismos após 60 dias ( $p < 0,05$ ). Ademais, a quantidade total de bactérias ácido lácticas situou-se abaixo do limiar estabelecido pela legislação vigente, resultando na amostra sendo considerada fora dos padrões de qualidade preconizados. Em contrapartida, verificou-se que a amostra de kefir liofilizado manteve-se consistentemente dentro dos parâmetros referidos. Esses achados estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2 - Comparação da contagem de microrganismos totais do inóculo líquido e do kefir liofilizado após 60 dias.

| Amostras (60 dias) | Bactérias ácido lácticas totais | Leveduras totais   | Coliformes totais/<br><i>Escherichia coli</i> | Coliformes termotolerantes |
|--------------------|---------------------------------|--------------------|---|----------------------------|
| IL (UFC/ml)        | $5,13 \times 10^4$              | $1,23 \times 10^4$ | AUS   | AUS                        |
| KL (UFC/g)         | $9,43 \times 10^7$              | $6,53 \times 10^7$ | AUS   | AUS                        |
| Legislação         | Mínimo $10^7$                   | Mínimo $10^4$      | <10 (NMP/g)                                   | <3 (NMP/g)                 |

IL: inóculo líquido; KL: Kefir liofilizado. AUS: ausente; UFC/g: Unidade formadora de colônia por grama; UFC/ml: Unidade formadora de colônia por ml; NMP/g: Número mais provável por grama. Fonte: Autoria própria (2024).

Kefir líquido é mais suscetível a alterações ambientais, como flutuações de temperatura, que, associadas à atividade metabólica contínua, podem acelerar sua degradação e esgotar os nutrientes com maior rapidez. Isso torna o ambiente mais ácido e inóspito para os microrganismos. Já a liofilização, uma técnica eficaz para preservar a viabilidade dos microrganismos probióticos, cria uma matriz de gelo que reduz a água disponível, mantendo os microrganismos em estado de dormência e inibindo sua atividade metabólica durante o armazenamento (Costa, 2019; Conde, 2020). A multiplicação significativa desses microrganismos no kefir liofilizado (KL), em comparação ao kefir líquido (IL), evidencia a capacidade da liofilização de preservar sua viabilidade durante o armazenamento prolongado. Além disso, a ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* em ambas as amostras destaca a segurança microbiológica dos produtos. Ghedini *et al.* (2020) ressaltam a importância da detecção e controle desses microrganismos patogênicos, pois sua presença em níveis elevados pode representar riscos à saúde do consumidor. Os resultados obtidos

indicam que o kefir liofilizado mantém uma alta contagem de microrganismos viáveis após dois meses de armazenamento, o que é essencial para sua utilização como probiótico.

#### 8.4 Avaliação de características organolépticas e viabilidade do kefir liofilizado

A tabela 3 mostra os resultados médios obtidos das contagens de microrganismos totais, pesquisa de coliformes totais e termotolerantes e características organolépticas do kefir liofilizado ao longo de 1 ano e seis meses.

Tabela 3 - Viabilidade do kefir liofilizado de castanhas durante 18 meses.

| Tempo    | Características organolépticas |     |                | Características microbiológicas |     |  |                                      |
|----------|--------------------------------|-----|----------------|---------------------------------|-----|--|--------------------------------------|
|          | Aspecto                        | Cor | Odor/<br>Sabor | CT/EC                           | CTT | Contagem de Bactérias ácido lácticas (UFC/g) | Contagem de Leveduras totais (UFC/g) |
| 24 horas | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $1,16 \times 10^8$                           | $7,63 \times 10^7$                   |
| 7.ºdia   | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $1,05 \times 10^8$                           | $7,56 \times 10^7$                   |
| 15.ºdia  | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $9,60 \times 10^7$                           | $6,80 \times 10^7$                   |
| 30.ºdia  | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $9,46 \times 10^7$                           | $6,53 \times 10^7$                   |
| 60.ºdia  | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $9,43 \times 10^7$                           | $6,53 \times 10^7$                   |
| 90.ºdia  | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $9,13 \times 10^7$                           | $6,50 \times 10^7$                   |
| 120.ºdia | C                              | C   | C              | AUS                             | AUS | $8,96 \times 10^7$                           | $6,03 \times 10^7$                   |

|          |   |   |   |     |     |                    |                    |
|----------|---|---|---|-----|-----|--------------------|--------------------|
| 150.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $8,70 \times 10^7$ | $2,13 \times 10^7$ |
| 180.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $8,5 \times 10^7$  | $9,56 \times 10^6$ |
| 210.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $8,16 \times 10^7$ | $9,03 \times 10^6$ |
| 240.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $7,93 \times 10^7$ | $8,10 \times 10^6$ |
| 270.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $7,90 \times 10^7$ | $8,03 \times 10^6$ |
| 300.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $7,03 \times 10^7$ | $7,46 \times 10^6$ |
| 330.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $6,70 \times 10^7$ | $7,36 \times 10^6$ |
| 365.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $6,26 \times 10^7$ | $6,76 \times 10^6$ |
| 395.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $5,33 \times 10^7$ | $5,87 \times 10^6$ |
| 435.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $3,77 \times 10^7$ | $4,73 \times 10^6$ |
| 455.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $3,13 \times 10^7$ | $3,30 \times 10^6$ |
| 485.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $2,70 \times 10^7$ | $9,10 \times 10^5$ |
| 515.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $1,67 \times 10^7$ | $1,83 \times 10^5$ |
| 545.ºdia | C | C | C | AUS | AUS | $8,83 \times 10^6$ | $9,33 \times 10^4$ |

Legenda: C: conforme; AUS: ausente; UFC/g: Unidade formadora de colônia por grama; CT: coliformes totais; EC: *Escherichia coli*; CTT: coliformes termotolerantes Fonte: Autoria própria (2024)

No que se refere às bactérias ácido-láticas totais, o teste de Friedman revelou um valor de  $p$  de 0,0000119. Esse valor extremamente baixo ( $p < 0,05$ ) indica diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de bactérias ácido-láticas entre os diferentes períodos avaliados.

O teste pós-hoc de Dunn mostrou que, na maioria das comparações entre os dias, os valores de  $p$  foram iguais a 1,000, indicando ausência de diferenças significativas entre esses dias. Isso sugere que as concentrações de bactérias ácido-láticas permaneceram semelhantes na maior parte do tempo. Fixado o dia 7, observou-se que as diferenças nos valores de  $p$  começaram a se tornar evidentes a partir do dia 365, mas só se tornaram estatisticamente significativas a partir do dia 515. Entre os dias analisados, a comparação entre o dia fixado e o dia 395 apresentou um valor de  $p$  de 0.611272, sugerindo que não houve diferença significativa entre o intervalo desses dias, embora esse seja o ponto em que a variação começou a se manifestar. No dia 425, o valor de  $p$  foi 0.279816, e no dia 485, o valor de  $p$  estava muito próximo de indicar uma diferença significativa, com o valor de 0.065908. Finalmente, no dia 515, foi detectada uma diferença estatisticamente significativa, com o valor de  $p$  de 0.028860. Esses resultados demonstram que, até o dia 515 (correspondente a 1 ano e 5 meses), as bactérias ácido-láticas apresentaram comportamento estável, sem redução significativa na contagem.

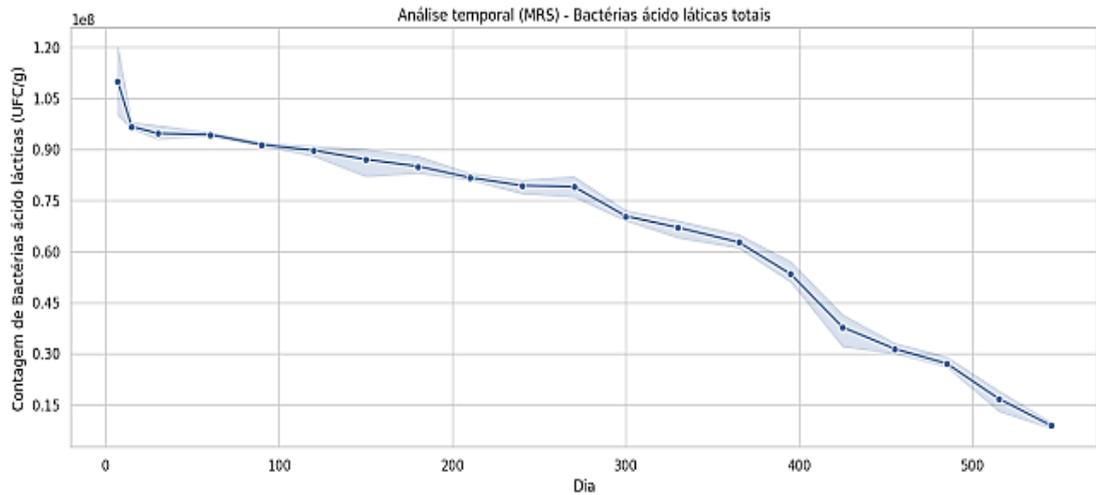
No que se refere às leveduras totais, o teste de Friedman revelou um valor de  $p$  de 0.0000125, indicando diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de leveduras totais entre os diferentes períodos avaliados.

O teste pós-hoc de Dunn mostrou que, na maioria das comparações entre os dias, os valores de  $p$  foram iguais a 1,000, indicando ausência de diferenças significativas entre esses dias. No entanto, também há intervalos em que as diferenças se tornaram mais pronunciadas (novamente fixando o dia 7). A partir do dia 395, a diferença começou a surgir, com um valor de  $p$  de 0.611758, embora ainda sem ser significativa. No dia 425, a comparação entre o dia fixado e o dia 425 resultou em um valor de  $p$  de 0.303527. Já no dia 485, o valor de  $p$  foi 0.065984, indicando uma diferença quase significativa. Finalmente, no dia 515, foi observada uma diferença significativa em relação ao dia fixado, com  $p$  de 0.028897. Esses resultados indicam que, embora as populações de bactérias ácido láticas e leveduras totais possam ser relativamente estáveis ao longo do tempo, mudanças nos valores de  $p$  começam a ocorrer após períodos mais longos, sendo significativas a partir do dia

515. Assim, esse período pode ser considerado um indicativo do prazo de validade microbiológico do produto.

Os resultados obtidos ao longo dos 18 meses de estudo demonstraram que, até o 17º mês, tanto a contagem total de bactérias ácido-láticas quanto de leveduras permaneceu dentro dos limites estabelecidos pelo MAPA, sugerindo uma preservação satisfatória da viabilidade microbiana do kefir liofilizado de castanhas durante o período de armazenamento. No entanto, no 18º mês, a contagem de bactérias ácido-láticas foi de  $8.83 \times 10^6$  UFC/g, ficando abaixo do limiar estabelecido pelo MAPA, o que indica uma redução na viabilidade microbiana no final do período de estudo. As leveduras, por sua vez, apresentaram preservação até o 18º mês, mantendo-se dentro dos padrões estabelecidos. As Figuras 2 e 3 ilustram as reduções observadas nas contagens de bactérias lácticas totais e leveduras totais ao longo do tempo, conforme análise temporal.

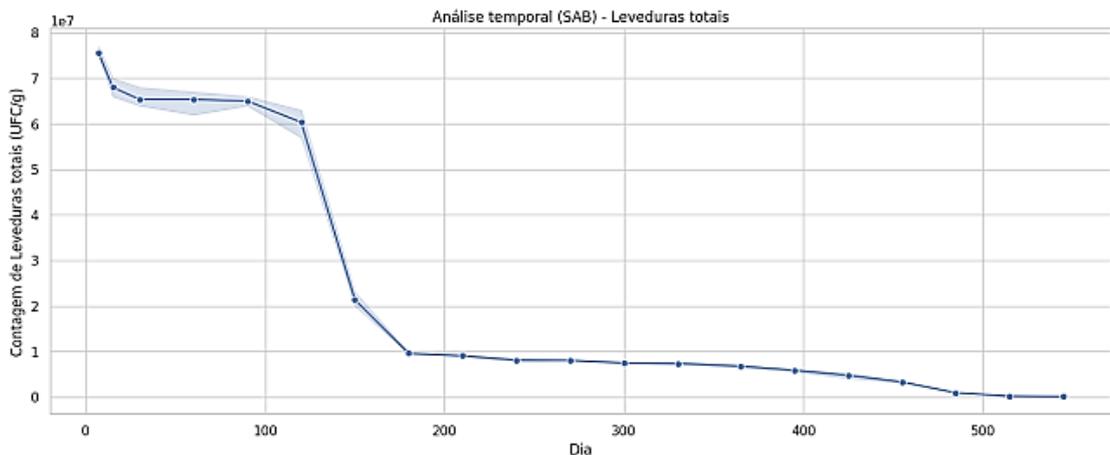
Figura 2- Análise temporal das bactérias ácido lácticas totais



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Analisando a Figura 2, observa-se que, nos primeiros 100 dias, há uma redução gradual na quantidade de bactérias ácido lácticas, indicando uma diminuição progressiva da população microbiana. Entre os dias 100 e 300, a diminuição continua, mas de forma mais lenta e constante, sugerindo uma fase de maior estabilização da viabilidade. Após o dia 300, a queda se acentua, especialmente entre os dias 400 e 500, alcançando valores bem mais baixos no final do período analisado. Infere-se que esse comportamento reflete a diminuição da viabilidade das bactérias ácido-lácticas ao longo do tempo, provavelmente devido a fatores como o esgotamento de nutrientes, o acúmulo de subprodutos metabólicos ou mudanças nas condições ambientais.

Figura 3 - Análise temporal das leveduras totais



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Analisando a Figura 3, é possível concluir que, nos primeiros 100 dias, há uma queda gradual na contagem de leveduras, indicando uma redução na viabilidade microbiana. Após esse período, entre os dias 100 e 200, observa-se uma queda acentuada na contagem de leveduras, possivelmente associada ao esgotamento de nutrientes ou às condições do meio. Entre os dias 200 e 400, a contagem de leveduras se estabiliza em níveis mais baixos. A partir do dia 400 até o dia 500, percebe-se uma leve diminuição na contagem, seguida de estabilização no final do período analisado. Infere-se que esse padrão reflete a diminuição progressiva da atividade metabólica das leveduras ao longo do tempo, característica comum em sistemas fermentados submetidos a longos períodos de armazenamento.

Esses achados confirmam que a liofilização é um método eficaz para manter a viabilidade microbiana ao longo do tempo e estão alinhados com estudos prévios sobre a estabilidade de microrganismos após liofilização, destacando a relevância dessa técnica para a qualidade e segurança dos produtos fermentados (Garcia *et al.*, 2023; Costa, 2019; Costa, 2023).

A redução observada na contagem microbiana entre os valores iniciais e finais era esperada, considerando as condições de armazenamento. Flutuações de temperatura e umidade relativa do ar podem submeter os microrganismos a estresses, resultando em uma redução gradual na viabilidade. Costa (2019) observou que embora a liofilização seja um método eficaz para desidratação que minimiza danos celulares e preserva a integridade dos microrganismos por períodos prolongados, processos de degradação celular podem ocorrer ao longo do tempo, contribuindo para a redução da viabilidade microbiana.

A liofilização de produtos fermentados, que envolve congelamento e sublimação do gelo sob vácuo, expõe os microrganismos a estresses de temperatura e desidratação, podendo comprometer sua viabilidade celular. Para mitigar esses efeitos, a adição de crioprotetores ao inóculo é prática comum, pois protege os microrganismos durante o processo, aumentando sua viabilidade após a reidratação (Silva, 2014). No kefir, esses impactos são reduzidos devido à sua composição microbiana diversificada, com predominância de *Lactobacillus*. Essas bactérias produzem kefiran, um polissacarídeo extracelular composto por galactose e glicose, que protege os microrganismos contra estresses osmóticos e térmicos ao formar uma camada viscosa ao redor das células, aumentando sua resistência e estabilidade (Plessas *et al.*, 2017).

## 8.5 Avaliação da estabilidade organoléptica e físico-química e viabilidade da bebida vegetal fermentada

A Tabela 4 apresenta as médias dos resultados das análises organolépticas, físico-químicas e microbiológicas da bebida vegetal fermentada ao longo de 150 dias.

**Tabela 4** – Avaliação das características organolépticas, físico – químicas e viabilidade da bebida vegetal fermentada durante 150 dias.

| Tempo    | Características organolépticas |     |      |            |            | Características microbiológicas |       |     |                       |                      |
|----------|--------------------------------|-----|------|------------|------------|---------------------------------|-------|-----|-----------------------|----------------------|
|          | Aspecto                        | Cor | Odor | pH         | ACDT (%)   | S.S                             | CT/EC | CTT | Cont. BALT (UFC/g)    | Cont. LT (UFC/g)     |
| 24h      | C                              | C   | C    | 3.25±0.020 | 0.19±0.015 | 9                               | AUS   | AUS | 5.13 x10 <sup>7</sup> | 7,63x10 <sup>7</sup> |
| 7.ºdia   | C                              | C   | C    | 3.46±0.150 | 0.21±0.015 | 9                               | AUS   | AUS | 5.13x10 <sup>7</sup>  | 5.53x10 <sup>6</sup> |
| 15.ºdia  | C                              | C   | C    | 3.73±0.070 | 0.22±0.015 | 9                               | AUS   | AUS | 4.97x10 <sup>7</sup>  | 5.20x10 <sup>6</sup> |
| 30.ºdia  | C                              | C   | C    | 3.73±0.115 | 0.22±0.010 | 9                               | AUS   | AUS | 4.80x10 <sup>7</sup>  | 5.13x10 <sup>6</sup> |
| 60.ºdia  | C                              | C   | C    | 3.89±0.030 | 0.23±0.011 | 9                               | AUS   | AUS | 4.23x10 <sup>7</sup>  | 4.70x10 <sup>6</sup> |
| 90.ºdia  | C                              | C   | C    | 3.95±0.025 | 0.22±0.015 | 9                               | AUS   | AUS | 4.13x10 <sup>7</sup>  | 4.43x10 <sup>6</sup> |
| 120.ºdia | C                              | C   | C    | 3.97±0.020 | 0.23±0.005 | 9                               | AUS   | AUS | 4.03x10 <sup>7</sup>  | 4.00x10 <sup>6</sup> |
| 150.ºdia | C                              | C   | C    | 4.00±0.020 | 0.24±0.011 | 9                               | AUS   | AUS | 2.97x10 <sup>7</sup>  | 3.47x10 <sup>6</sup> |

Legenda: C: conforme; AUS: ausente; UFC/g: Unidade formadora de colônia por grama; pH: potencial hidrogeniônico; ACDT: acidez total; S.S: sólidos solúveis; CT: coliformes totais; EC: *Escherichia coli*; CTT: coliformes termotolerantes; Cont. BALT: contagem de bactérias ácido lácticas totais; Cont. LT: contagem de leveduras totais. Fonte: Aatoria própria (2024)

Quanto ao pH, o teste de Friedman revelou um valor de p de 0.0037. Esse valor extremamente baixo ( $p < 0,05$ ) indica diferenças estatisticamente significativas entre os dias. O teste pos-hoc indica uma diferença significativa entre os dias 1 e 150 ( $p = 0.009292$ ), mas não há outras diferenças significativas entre os pares de dias restantes.

Sales *et al.* (2020) relataram uma faixa de pH entre 3,96 e 4,51, influenciada pelo tempo de fermentação e pela concentração de polpa de açaí adicionada. Wichello *et al.* (2023) em um estudo sobre a desenvolvimento e estabilidade físico-química de uma bebida fermentada com suco de uva e grãos de kefir, registrou um pH de 3,18, resultados que corroboram com os obtidos neste trabalho.

Quando realizado o teste de Friedman para acidez total foi revelado um valor de p de 0.1208, sem diferença significativa entre os dias, mostrando que a acidez total permaneceu estável ao longo do tempo, o que pode sugerir que a produção de ácidos orgânicos não variou de forma significativa nesse período. Wichello *et al.* (2023) observaram médias de acidez total variando de 0,63% a 1,97%, enquanto Sales *et al.* (2020) encontraram valores entre 0,59% e 1,12%. Já Tavares *et al.* (2020), em um estudo de kefir a partir de extrato de arroz integral, reportaram uma acidez total de 0,25%. Da mesma forma, Souza e Silva (2017), que também utilizaram extrato de arroz integral, verificaram uma acidez total variando de 0,23% a 0,29%. Esses dois últimos estudos apresentam uma acidez total mais baixa, similar à observada no estudo presente, que variou de 0,19% a 0,24%.

Não foi possível realizar o teste estatístico para os sólidos solúveis, pois não houve variação entre os dias. Isso significa que o valor de p não pôde ser calculado. Wichello *et al.* (2023) observaram um valor de 5,0 °Brix, enquanto Sales *et al.* (2020) registraram valores entre 12,70 e 14,40 °Brix. Em contraste, Paredes, Escudero-Gilete e Vicario (2022), em um estudo sobre a elaboração e caracterização de kefir de suco de frutas e vegetais (maçã, cenoura, beterraba e morango) com 24 horas de fermentação, apresentaram valores de °Brix variando de 8,69 a 9,93. Da mesma forma, Sun *et al.* (2024), que utilizaram suco de chokeberry (*Aronia melanocarpa*), observaram uma concentração de sólidos solúveis de 9,83 °Brix, resultados mais próximos dos encontrados neste estudo, que foi de 9,0 °Brix.

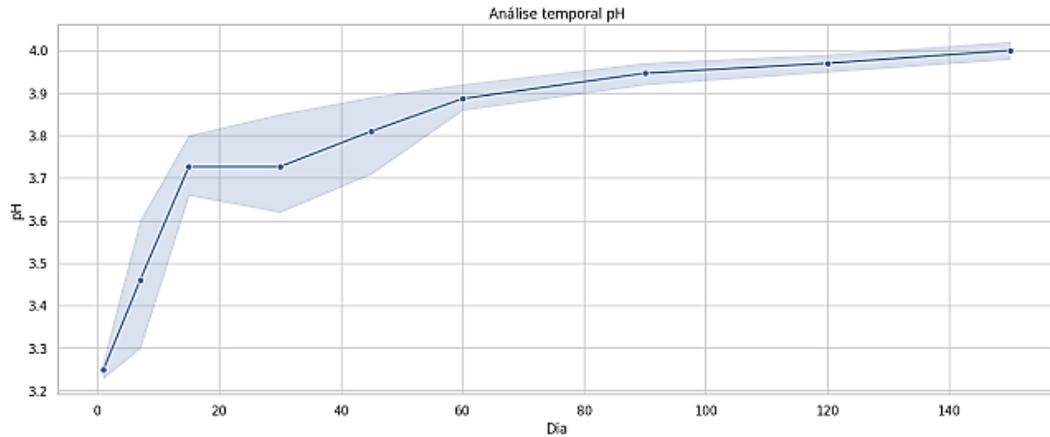
No tocante às bactérias ácido-láticas totais, o teste de Friedman revelou um valor de p de 0.0048, ( $p < 0,05$ ) indicando diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de bactérias ácido-láticas entre os diferentes períodos avaliados.

O teste pós-hoc de Dunn mostrou que houve alterações significativas principalmente entre os dias 1 e 150. Rios (2021), em um estudo sobre o desenvolvimento e caracterização de extratos vegetais fermentados por kefir, observou que, após 24 horas de fermentação, as bactérias ácido-láticas atingiram  $5,25 \times 10^8$  UFC/mL no extrato de arroz integral. Wichello *et al.* (2023), por sua vez, registraram uma contagem de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL ao longo de cinco semanas de avaliação, embora não tenham relatado contagens de leveduras. De maneira semelhante, Sales *et al.* (2020) observaram, durante 45 dias de armazenamento, contagens de bactérias ácido-láticas viáveis entre  $10^7$  e  $10^8$  UFC/mL, destacando o potencial probiótico do produto. Esses resultados são consistentes com os encontrados no estudo presente, que mantiveram uma contagem de  $10^7$  UFC/mL durante todo o período de avaliação.

No que se refere às leveduras totais, o teste de Friedman revelou um valor de  $p$  de 0.0024 ( $p < 0,05$ ) indicando diferenças estatisticamente significativas nas concentrações entre os diferentes períodos avaliados. O teste pós-hoc de Dunn mostrou que houve alterações significativas principalmente entre os dias 1 e 150.

Rios (2021), em um estudo sobre o desenvolvimento e caracterização de extratos vegetais fermentados por kefir, observou que, após 24 horas de fermentação, as leveduras, o maior valor encontrado foi nos extratos de arroz integral e castanha do Pará, com  $2,53 \times 10^8$  UFC/mL e Sales *et al.* (2020) observaram que a contagem de leveduras nas formulações estudadas variou de  $0,71 \times 10^7$ -  $1,1 \times 10^5$  UFC/ml a  $0,19 \times 10^7$  -  $0,17 \times 10^6$  UFC/ml após 45 dias o que corrobora com os resultados deste estudo, que, após 140 dias, ainda apresentava uma contagem de  $10^6$  UFC/ml. A Figura 4 apresenta o aumento do pH ao longo dos dias, conforme análise temporal.

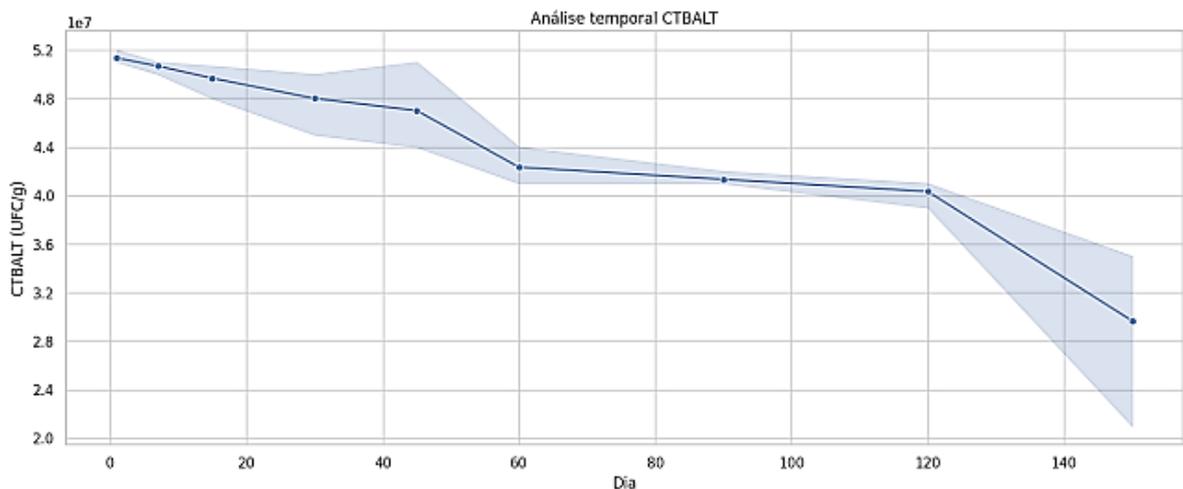
Figura 4 - Análise temporal do pH da bebida vegetal fermentada.



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Analisando a Figura 4, é possível concluir que, nos primeiros 20 dias, o pH da bebida fermentada aumenta de forma acentuada, indicando uma redução rápida da acidez. Entre os dias 20 e 60, o pH se estabiliza gradualmente, com um leve aumento contínuo. Após esse período, de 60 a 140 dias, o pH segue subindo de maneira lenta e constante, atingindo um valor próximo a 4 e estabilizando-se ao final do intervalo analisado. Esse comportamento sugere uma neutralização progressiva do meio, possivelmente devido à diminuição da atividade metabólica dos microrganismos fermentadores ao longo do tempo. As Figuras 5 e 6 apresentam a redução nas contagens de bactérias lácticas totais e leveduras totais da bebida vegetal fermentada ao longo do tempo, conforme análise temporal.

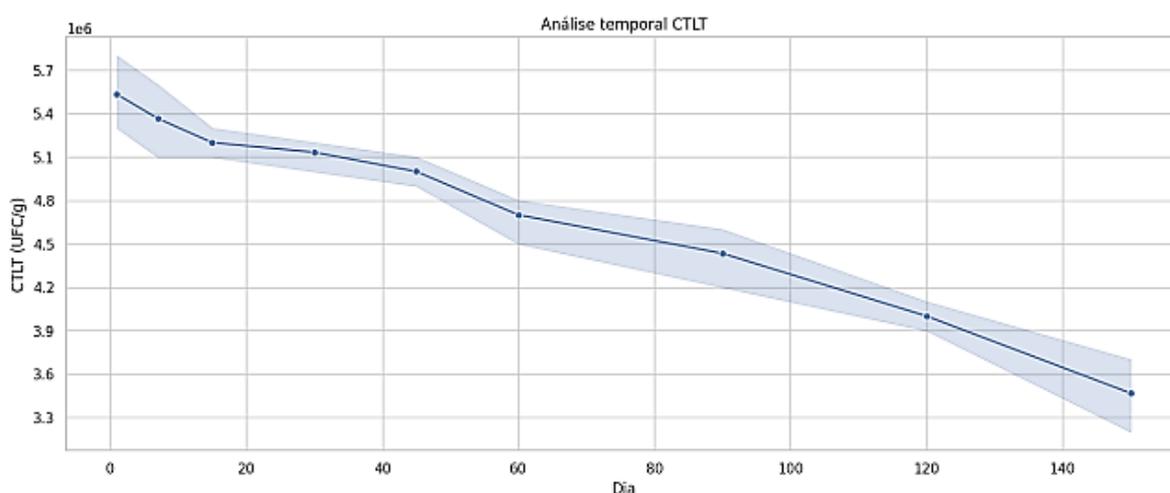
Figura 5 - Análise temporal das bactérias ácido lácticas da bebida vegetal fermentada



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Analisando a Figura 5, é possível concluir que a contagem total de bactérias lácticas (CTBALT) apresenta uma redução gradual ao longo de 140 dias de análise. Inicialmente, os valores começam em aproximadamente  $5,2 \times 10^7$  UFC/g e diminuem de forma consistente, com uma leve estabilização entre os dias 60 e 100. Após o dia 120, a redução se acentua, atingindo valores próximos a  $3,0 \times 10^7$  UFC/g ao final do período analisado. Esse comportamento sugere uma diminuição progressiva da viabilidade das bactérias lácticas ao longo do tempo, provavelmente devido à redução de nutrientes disponíveis ou a condições menos favoráveis ao crescimento microbiano no produto armazenado. A estabilização observada entre os dias 60 e 100 pode indicar uma fase de adaptação ou uma taxa de declínio menor na população bacteriana antes de uma queda mais acentuada.

Figura 6 - Análise temporal das leveduras totais na bebida vegetal fermentada



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Analisando a Figura 6, é possível observar que a contagem total de leveduras na bebida vegetal fermentada segue uma tendência de diminuição ao longo do período de análise. Inicialmente, a contagem era de aproximadamente  $5,7 \times 10^6$  UFC/g no dia 0, caindo para cerca de  $3,6 \times 10^6$  UFC/g no dia 140. Embora essa redução tenha ocorrido, os valores apresentaram uma queda gradual e constante, mas sem variações abruptas. Esse comportamento sugere que, ao longo do tempo, houve uma diminuição na viabilidade dos microrganismos presentes na bebida vegetal, possivelmente devido a fatores como condições de armazenamento ou limitações de nutrientes. No entanto, a queda foi gradual, o que indica que os microrganismos mantiveram uma atividade metabólica residual ao longo de todo o período de análise.

Isso pode sugerir uma estabilidade relativa do produto durante o intervalo observado, mesmo com a redução na contagem microbiana.

## 8.6 Análise sensorial do kefir liofilizado e da bebida vegetal fermentada

A análise sensorial contou com a participação de 30 provadores não treinados, que avaliaram o kefir liofilizado e a bebida vegetal fermentada em diferentes atributos sensoriais. Para a avaliação, foi utilizada a escala hedônica de 7 pontos, amplamente empregada em testes de análise sensorial para medir o grau de prazer ou desagrado que os consumidores sentem em relação a um produto alimentício. Essa escala é composta pelas seguintes categorias: desgostei muitíssimo, desgostei muito, desgostei moderadamente, nem gostei nem desgostei (neutro), gostei moderadamente, gostei muito e gostei muitíssimo.

No aspecto visual, ambos os produtos receberam a mesma nota média de 6,57, situando-se entre as categorias “gostei muito” e “gostei muitíssimo”, o que reflete uma excelente aceitação visual pelos participantes. Em relação à impressão geral e ao odor, o kefir liofilizado apresentou uma leve vantagem sobre a bebida vegetal fermentada, com médias de 6,40 contra 6,33 para a impressão geral, e 6,47 contra 6,37 para o odor, indicando uma preferência ligeiramente maior para o kefir nesses dois aspectos. Contudo, no quesito sabor, a bebida vegetal fermentada obteve a nota mais alta, com uma média de 6,50, destacando-se como o atributo mais apreciado pelos provadores. As médias gerais, acompanhadas de seus respectivos desvios padrão para cada atributo avaliado, foram expressas na Tabela 5.

De modo geral, as médias em torno de 6 em todos os atributos avaliados indicam que tanto o kefir liofilizado quanto a bebida vegetal fermentada foram bem aceitos pelos provadores, evidenciando seu alto potencial de aceitação pelo público consumidor.

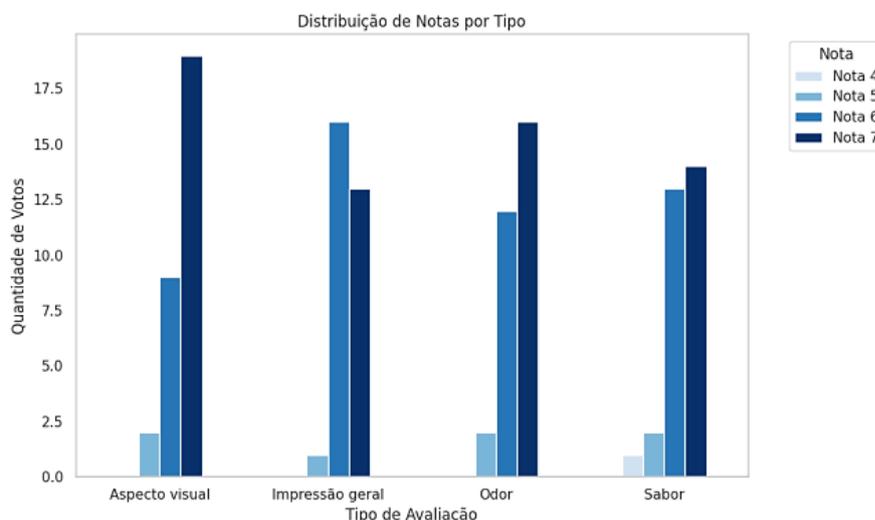
Tabela 5 – Comparativo da análise sensorial do kefir liofilizado e da bebida vegetal fermentada

| Amostras                  | Aspecto visual | Impressão geral | Sabor     | Odor      |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------|-----------|
| Kefir liofilizado         | 6.57±0.62      | 6.40±0.55       | 6.33±0.75 | 6.47±0.62 |
| Bebida vegetal fermentada | 6.57±0.50      | 6.33±0.60       | 6.50±0.56 | 6.37±0.60 |

Fonte: Autoria própria, 2025.

Os dados obtidos foram apresentados em gráficos separados para cada amostra demonstrando a distribuição das notas por característica nas Figuras 7 e 8, permitindo uma visualização clara da aceitação sensorial dos produtos

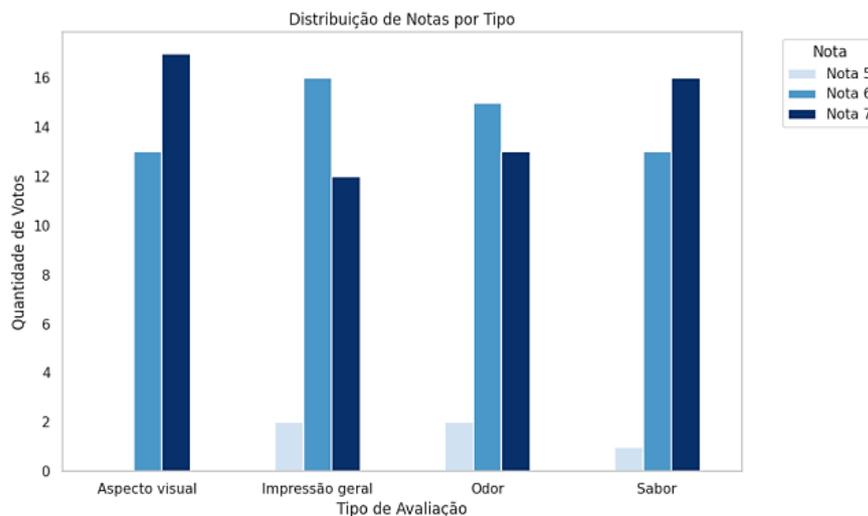
Figura 7 - Distribuição das notas por característica (kéfir liofilizado de castanhas)



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Na Figura 7, é possível observar que nenhum dos atributos avaliados recebeu nota inferior a 4, evidenciando uma boa aceitação dos produtos. No total de 30 voluntários, para o aspecto visual, 19 participantes (63,33%) atribuíram nota 7, 9 (30,00%) nota 6 e 2 (6,67%) nota 5. Em relação ao odor, 16 voluntários (53,33%) votaram na nota 7, 12 (40,00%) na nota 6 e 2 (6,67%) na nota 5. No quesito sabor, 14 avaliadores (46,67%) atribuíram nota 7, 13 (43,33%) nota 6 e 2 (6,67%) nota 5. Por fim, na impressão geral, 13 participantes (43,33%) atribuíram nota 7, 16 (53,33%) nota 6 e apenas 1 (3,33%) atribuiu nota 5. Esses resultados demonstram que a maior parte das avaliações se concentrou nas notas mais altas da escala hedônica, indicando uma excelente aceitação dos produtos avaliados.

Figura 8 - Distribuição das notas por característica (bebida vegetal fermentada)



Fonte: Gerados utilizando as bibliotecas Python "matplotlib.pyplot" e "seaborn".

Na Figura 8, é possível observar que nenhum dos atributos avaliados recebeu nota inferior a 4, evidenciando uma boa aceitação dos produtos. No total de 30 voluntários, para o aspecto visual, 17 participantes (56,67%) atribuíram nota 7 e 13 (43,33%) nota 6. Em relação ao odor, 13 voluntários (43,33%) votaram na nota 7, 15 (50,00%) na nota 6 e 2 (6,67%) na nota 5. No quesito sabor, 16 avaliadores (53,33%) atribuíram nota 7, 13 (43,33%) nota 6 e 1 (3,33%) nota 5. Por fim, na impressão geral, 12 participantes (40,00%) atribuíram nota 7, 16 (53,33%) nota 6 e apenas 2 (6,67%) atribuíram nota 5.

Esses resultados reforçam que os produtos avaliados apresentam uma aceitação consistente entre os diferentes atributos sensoriais. O predomínio de notas altas em todos os quesitos analisados indica o potencial dos produtos para atender às expectativas sensoriais do público-alvo, mostrando que ambos possuem características promissoras para o mercado.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir que a viabilidade dos microrganismos do kefir liofilizado foi amplamente demonstrada ao longo do estudo, evidenciando a eficácia do processo de liofilização em manter as bactérias ácido-láticas e as leveduras viáveis por até um ano e cinco meses em condições de armazenamento refrigerado. Embora a Instrução Normativa N. 46 de 2007 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento seja específica para leites fermentados de origem animal, ela serviu como parâmetro comparativo, uma vez que era a referência disponível sobre os requisitos microbiológicos para o kefir, dada a ausência de regulamentações específicas para kefir vegetal. Esse embasamento forneceu uma base sólida para a análise da estabilidade microbiológica e validou a viabilidade do kefir liofilizado em conformidade com os padrões exigidos para produtos fermentados.

A bebida vegetal fermentada elaborada a partir do kefir liofilizado demonstrou estabilidade e viabilidade ao longo dos cinco meses de avaliação, com parâmetros físico-químicos, como pH, acidez total e sólidos solúveis, dentro dos padrões esperados para produtos fermentados. As contagens microbiológicas de bactérias ácido-láticas e leveduras também indicaram que o kefir liofilizado mantinha suas propriedades funcionais durante todo o período de armazenamento refrigerado.

Além disso, a análise sensorial, conduzida com 30 provadores não treinados, revelou excelente aceitação dos produtos, destacando aspectos como visual, odor, sabor e impressão geral. As médias obtidas nas avaliações sensoriais indicaram que tanto o kefir liofilizado quanto a bebida vegetal fermentada possuem grande potencial de aceitação por parte dos consumidores. Isso reforça a viabilidade do uso do kefir liofilizado como ingrediente em novos produtos alimentícios, especialmente aqueles voltados para o público que busca alternativas veganas e funcionais.

Portanto, este estudo contribuiu com respostas para os objetivos propostos e para o avanço do conhecimento sobre o uso do kefir liofilizado em produtos alimentícios, abrindo caminho para o desenvolvimento de bebidas vegetais fermentadas com características probióticas. A combinação da liofilização com a utilização de extratos vegetais oferece uma alternativa promissora para a produção de alimentos funcionais, alinhando-se à crescente demanda por produtos mais saudáveis e inovadores no mercado.

## REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, A. P. *et al.* Utilização de polpa de frutas em pó carregadoras de probióticos como alimento funcional: aspectos gerais e perspectivas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, p. e2019310, 2021.

AOAC - Association of Official Analytical Chemist, **Official Methods of Analysis**, Methods AOAC, 2002 (997.02).

APHA, **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. cap.47, pág. 409 4<sup>th</sup> ed., 2001.

ARAÚJO, N. G. *et al.* Influência da concentração de polpa de goiaba na faixa acessível de fermentado de kefir. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 4, pág. 184-191, 2017.

BARBOSA, M. L. S. *et al.* **Characterization of fermented beverages made with soybean and Brazil nut hydrosoluble extracts**. International Journal of Gastronomy and Food Science, v. 21, n. May, p. 100228, 2020.

BÍBLIA SAGRADA. *Nova Versão Internacional*. Romanos 11:36. Disponível em: <https://www.bibliaonline.com.br>. Acesso em: 22 jan. 2025.

BRAINER, M. S. C. P. Cajucultura. **Caderno Setorial ETENE**, ano 7, n. 230, junho, 2022.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução 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. Brasília, DF, 2002.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução N. 18, de 30 de abril de 1999**. Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de Alimentos. Brasília, DF, 1999.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa N. 46, de 23 de outubro de 2007**. Adota o Regulamento

Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, DF: Diário Oficial da União, Seção 1, 2007. Disponível em: <<https://www.abia.org.br/vsn/temp/z201886INMAPA462007.pdf>> Acesso em: 29 mar. 2024.

BOZKIR, E. *et al.* Challenges in water kefir production and limitations in human consumption: A comprehensive review of current knowledge. **Heliyon**, 2024.

BROWN, H. E.; ESHER, S. K.; ALSPAUGH, J. A. **Chitin: a “hidden figure” in the fungal cell wall**. The fungal cell wall: an armour and a weapon for human fungal pathogens, p. 83-111, 2020.

CAETANO, D.R.; MONTANHINI, M.T.M. Análise Microbiológica de Leite Fermentado Kefir Produzido com Leite Contaminado por *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 33–38.

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

COSTA, I.P.; DOS SANTOS, N.S.T. Bebidas fermentadas com kefir a partir de extratos vegetais. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v. 12, 2020.

COSTA, K. **Obtenção de culturas iniciadoras para produção de kefir de leite adicionadas ou não de linhagem probiótica**. Tese de doutorado. Universidade federal de Minas Gerais, programa de pós-graduação em microbiologia. 2023.

COSTA, K. **Avaliação da viabilidade de micro-organismos isolados de grãos de kefir submetidos ao processo de liofilização para formulação de culturas iniciadoras**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Editora Rubio, 2016.

CONDE ISLAS, A.A. **Obtención de un alimento funcional mediante la liofilización y secado por aspersión de un producto generado a partir de la microbiota del Kefir**. Tese de Doutorado. Doctorado en Ciencias de la Ingeniería. Instituto Tecnológico de Orizaba. 2020.

DA SILVA, N. *et al.* **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimento**. 3a ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552p.

DE MELLO, L. M. R. *et al.* Panorama da produção de uvas e vinhos no Brasil. **Revista Agronomia Brasileira**, v.1, 2017.

DIAS, W. C.; MARTINS, A. D.; MOREIRA JÚNIOR, S. Kefir: Características e benefícios. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v.7, pg.22-42, 2020.

FERNANDES, M.L.P. *et al.* Sugary kefir grains as the inoculum for developing a low sodium isotonic beverage. **Food Research International**, 2022; 157: 111257.

FREITAS, A. B. de *et al.* Ação dos crioprotetores glicose, trealose e quitosana na manutenção da viabilidade de células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* após liofilização. **Ciência Animal Brasileira**, v. 21, p. e-47464, 2020.

GHEDINI, T.G.M. *et al.* Qualidade microbiológica do kefir. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 4336-4349, 2020.

GOMES, F.O. *et al.* Avaliação físico-química de uma bebida à base de kefir saborizada com pequi. **Brazilian Journal of Development**, v.63, 2020.

GRANATO, D. *et al.* Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. **Annu Rev Food Sci Technol**. 2020; 11:93-118.

HAS, Murilo *et al.* Caracterização morfológica e fisiológica de leveduras submetidas à preservação prolongada por congelamento a -80°C e liofilização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 14, n. 1, 2020.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008. E-book.

KUHN, A. (Ed.). **Bacterial Cell Walls and Membranes**. Cham: Springer International Publishing, 2019.

MACHADO, A.L.B. **Desenvolvimento de extrato hidrossolúvel à base de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) e Macadâmia (*Macadamia integrifolia*)**. 126 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.

MAGALHÃES, B.C.; PEREIRA, P.T.V.T. Sobre o fruto Açaí. **RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, v. 9, n. 53, 2015

MARCO, M.L. *et al.* The International Scientific for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. v. 18, p. 196–208, 2021.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American journal of physiology-cell physiology**, v. 247, n. 3, p. C125-C142, 1984.

MOURA, A.D.C.T. *et al.* Avaliação sensorial de antepasto de kefir enriquecido com *Lactobacillus acidophilus* La-5 e coprodutos agroindustriais. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, v.2, pg.84-96, 2020.

NAMBOU, K. *et al.* A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, 2014; 34(2): 237-246.

NEVIN, Ş.; BÜŞRA, B.G.; AYBÜKE, C. S. Health benefits of fermented foods, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59:3, p. 506-527, 2019.

NEFFE-SKOCIŃSKA, K. *et al.* Trends and Possibilities of Probiotics in Food Production. **Alternative and Replacement Foods** [s. l.], p. 65–94, 2018.

NIELSEN B; GÜRAKAN G.C; UNLÜ G. Kefir: a multifaceted fermented dairy product. **Probiotics Antimicrob Proteins**. 2014 Dec;6(3-4):123-35.

OLIVEIRA, A. F. **Estudo da viabilidade da produção de biofilmes de kefir e suas interações com extratos de açaí (*Euterpe oleracea Martius*) e de gérmen de soja (*Glycine max* (L.) Merrill)**. Doctoral dissertation, Tese (Universidade Federal do Amapá), 2016.

PALEZI, S.C.; DE MARCHI, L.; PIETTA, G.M. Caracterização e avaliação sensorial do kefir tradicional e derivados. **Unoesc & Ciência-ACET**, p. 15-22, 2015.

PAREDES, J. L.; ESCUDERO-GILETE, M. L.; VICARIO, I. M. A new functional kefir fermented beverage obtained from fruit and vegetable juice: Development and characterization. **LWT**, v. 154, p. 112728, 2022.

PEREIRA, W. L. *et al.* O efeito dos alimentos funcionais na microbiota intestinal: o uso do kefir e da kombucha na dieta alimentar saudável. **Revista de Trabalhos Acadêmicos** - Universo Campos dos Goytacazes, v. 1, n. 13, 2020.

PLESSAS, S. *et al.* Microbiological exploration of different types of kefir grains. **Fermentation**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017.

REIS, S.A. *et al.* Kefir reduces the incidence of pre-neoplastic lesions in an animal model for colorectal câncer. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 1-6, 2019.

RIOS, D.A.S. **Extratos vegetais fermentados por kefir: desenvolvimento, caracterização e potencial antimicrobiano**. 2021. Tese Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará.

ROCKINGER, U.; FUNK, M.; WINTER, G. Current approaches of preservation of cells during (freeze-drying). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2873-2893, 2021.

SALES, L.G.M. *et al.* Caracterização e estabilidade de kefir com adição de polpa de açaí. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 8, pág. e293985189-e293985189, 2020.

SCARPELIN, C. **Desenvolvimento e avaliação do potencial bioativo de bebidas vegetais fermentadas com grãos de kefir**. 2023. Dissertação - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, A.T.A. *et al.* Eficiência de Diferentes Crioprotetores, Empregados Na Liofilização, Para Preservação de Bactérias Lácticas e Leveduras em kefir. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 577-578, 2014.

SILVA, V.C.C.; DE SOUSA, M.N.A. Uso De Cranberry Na Profilaxia De Infecções Do Trato Urinário. **Revista Científica Integr@ção**, v. 1, pág. 21-12, 2021.

SOUZA, U.S.; SILVA, M.R. da. Avaliação de ph, acidez titulável e crescimento de massa colônica de grãos de kefir de água inoculados em extrato hidrossolúvel de arroz (*Oryza sativa*). **Hig. aliment**, p. 143-148, 2017.

TAVARES, P.P.L.G. *et al.* **Nova bebida kefir a partir de extrato de arroz integral (*Oryza sativa* L.)**. In: A produção do conhecimento nas ciências da saúde. Brasília, DF: CAPES, 2020.

UDAYARAJAN, C. T; MOHAN, KAVYA; NISHA, P. **Treasure mine for prebiotic and probiotic dairy free vegan products**. Trends in Food Science & Technology, v. 124, n. August 2021, p. 208–218, 2022.

WICHELO, S.P. *et al.* Desarrollo y estabilidad fisicoquímica de una bebida fermentada y carbonatada utilizando jugo de uva y granos de kéfir de agua. **Editora Home Publishings**, p. 440-448, 2023.

WULANSARI, P. D. *et al.* Physicochemical, microbiological, and sensory evaluation of kefir produced from goat milk containing *Lacticasei bacillus casei* AP and/or oat milk during storage. **Food Science and Technology**, Campinas, Brasil, v. 43, 2023.

**APÊNDICE A – MÉTODOS DE PRODUÇÃO E REGULAMENTAÇÃO DO KEFIR****CARTA DE ACEITE DE MANUSCRITO****REAS, Revista Eletrônica Acervo Saúde (ISSN 2178-2091)**

Informamos que o artigo abaixo foi considerado para publicação na revista.

**Título do artigo:**

Métodos de produção e regulamentação do kefir

**Autor/Coautores:**

Bruna Kristyer Lima de Paula

Maria de Fátima Fonseca Marques

Marina Maria Barbosa de Oliveira

Karina Perrelli Randau

sexta-feira, dezembro 20, 2024



**Dr. Andreazzi Duarte**  
Editor-líder da Revista

**NOTA:**

\* O aceite do artigo está sujeito a confirmação do pagamento e documentação conforme as normas da revista.

\*\* O aceite não extingue a possibilidade de correções ou adequações no conteúdo do trabalho.

[WWW.ACERVOMAI.COM](http://WWW.ACERVOMAI.COM)  
Base presente em todo o Brasil.

## APÊNDICE B – EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE PROBIÓTICOS PRESENTES NA COMPOSIÇÃO DO KEFIR



**Studies Publicações** [ojjs@studiespublicacoes.com.br](mailto:ojjs@studiespublicacoes.com.br) [ojs.dgeo.acaoacademico.com.br](http://ojs.dgeo.acaoacademico.com.br)  
para mim, Fátima, Marina, Karina

5 de fev. de 2025, 10:13 (há 7 dias) ☆ ↶ ⋮

Bruna, Fátima, Marina, Karina:

Nós chegamos a uma decisão referente a sua submissão para o periódico *Caderno Pedagógico*, "Eficácia terapêutica de probióticos presentes na composição do kefir em ensaios clínicos recentes".

Temos o prazer de informar que, após avaliação, seu artigo submetido à *Revista Caderno Pedagógico* foi **ACEITO** para publicação.

Nossa equipe editorial identificou a necessidade de algumas correções, conforme descrito abaixo:

- Todas as referências bibliográficas precisam estar completas, nas normas ABNT com o título das obras em negrito (de acordo com cada tipo de obra) e em ordem alfabética.

Para darmos continuidade ao processo de publicação de seu trabalho, solicitamos que envie o arquivo com as correções solicitadas, juntamente com o formulário preenchido, para o e-mail [contato@studiespublicacoes.com.br](mailto:contato@studiespublicacoes.com.br). Caso contrário, o processo de publicação permanecerá pendente.

Após o envio das correções, será necessário efetuar o pagamento da taxa de publicação, no valor de **R\$990,00**. O limite de autores é de 8 e o limite de páginas é de 20. Caso esses limites sejam ultrapassados, será cobrada uma taxa adicional de **R\$15,00 por autor e por página extra**. As informações para o pagamento serão enviadas por e-mail, após a conferência das correções solicitadas.

As instruções para o pagamento serão enviadas por e-mail após o recebimento dos documentos. Aceitamos as seguintes formas de pagamento: depósito, transferência, PIX e cartão de crédito. Pedimos, por gentileza, que informe a modalidade de pagamento escolhida para que possamos encaminhar as informações necessárias.

Em caso de dúvidas, estamos à disposição para assisti-lo(a).

Aguardamos seu retorno e ficamos à disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente,  
**Equipe Editorial**  
*Revista Caderno Pedagógico*

---

## APÊNDICE C - IMPACTOS DA UTILIZAÇÃO DE SUCOS DE FRUTAS E EXTRATOS VEGETAIS COMO SUBSTRATOS NO KEFIR



**Studies Publicações** [oj@studiespublicacoes.com.br](mailto:oj@studiespublicacoes.com.br) [por.dgeo.acessoacademico.com.br](http://por.dgeo.acessoacademico.com.br)  
para mim, Fátima, Marina, Karina

5 de fev. de 2025, 10:40 (há 7 dias) ☆ ↶ ⋮

Bruna, Fátima, Marina, Karina:

Nós chegamos a uma decisão referente a sua submissão para o periódico *Caderno Pedagógico*, "Impactos da utilização de sucos de frutas e extratos vegetais como substratos no kefir".

Temos o prazer de informar que, após avaliação, seu artigo submetido à *Revista Caderno Pedagógico* foi **ACEITO** para publicação.

Para darmos continuidade ao processo de publicação, solicitamos que envie o arquivo final do seu artigo, juntamente com o formulário preenchido, para o e-mail [contato@studiespublicacoes.com.br](mailto:contato@studiespublicacoes.com.br). O envio desses documentos é imprescindível para que o processo siga adiante.

Após o envio dos arquivos, será necessário efetuar o pagamento da taxa de publicação, no valor de **R\$990,00**. O limite de autores por artigo é de 8, e o limite de páginas é de 20. Caso esses limites sejam ultrapassados, haverá uma cobrança adicional de **R\$15,00 por autor e por página extra**.

\*\*\*

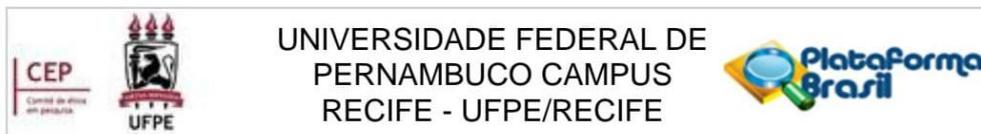
As instruções para o pagamento serão enviadas por e-mail após o recebimento dos documentos. Aceitamos as seguintes formas de pagamento: depósito, transferência, PIX e cartão de crédito. Pedimos, por gentileza, que informe a modalidade de pagamento escolhida para que possamos encaminhar as informações necessárias.

Em caso de dúvidas, estamos à disposição para assisti-lo(a).

Aguardamos seu retorno e ficamos à disposição para qualquer esclarecimento.

Atenciosamente,  
**Equipe Editorial**  
*Revista Caderno Pedagógico*

## APÊNDICE D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
PERNAMBUCO CAMPUS  
RECIFE - UFPE/RECIFE



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** VIABILIDADE E POTENCIAL DO KEFIR DE CASTANHAS NA ELABORAÇÃO DE UMA BEBIDA VEGETAL FERMENTADA: UM ESTUDO DE ESTABILIDADE E ANÁLISE SENSORIAL.

**Pesquisador:** BRUNA KRISTYER LIMA DE PAULA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 81614524.7.0000.5208

**Instituição Proponente:** Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

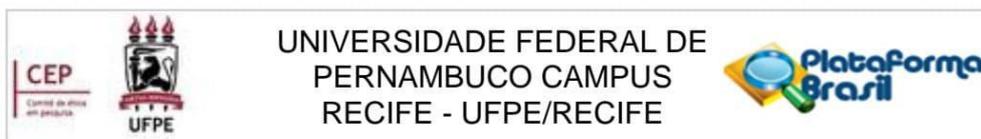
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 7.021.458

#### Apresentação do Projeto:

O Projeto submetido para a apreciação do Comitê de Ética refere-se à Dissertação de Mestrado da discente BRUNA KRISTYER LIMA DE PAULAA, vinculada ao Programa de Pós-graduação em INOVAÇÃO TERAPEUTICA da Universidade Federal de Pernambuco. O projeto será orientado pela professora Dra. Karina Perrelli Randau e co-orientado pela Dra. Maria de Fátima Fonseca Marques e terá o objetivo de avaliar a viabilidade de microrganismos do Kefir de leite de castanhas após o processo de liofilização e verificar seu potencial para elaboração de uma bebida vegetal fermentada estável. Trata-se de um estudo com abordagem metodológica experimental, caracterizado pela manipulação de variáveis independentes para observar seus efeitos sobre variáveis dependentes, permitindo estabelecer relações de causa e efeito, envolvendo controle rigoroso das condições de produção e análise para investigar os efeitos da fermentação do Kefir de leite de castanhas.. A elaboração da bebida vegetal fermentada será produzida utilizando o Kefir liofilizado como cultura-mãe, polpa de açaí para conferir sabor na bebida e açúcar demerara para dar o start da fermentação. Será realizada análise sensorial conduzida após aprovação do projeto no CEP, com o propósito de avaliar a aceitabilidade do Kefir liofilizado de leite de castanhas e da bebida vegetal fermentada sabor açaí, produzida a partir dele. O estudo envolverá 30 provadores não treinados, os quais utilizarão uma escala hedônica de 7 pontos, variando de 7 (gostei extremamente) a 1 (desgostei extremamente). As

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 7.021.458

duas amostras, serão apresentadas aleatoriamente aos provadores. Entre a degustação de uma amostra e outra, os provadores irão consumir um copo de água para evitar a mistura de sabores, seguido do preenchimento de um formulário de análise sensorial de ambos os produtos. Serão incluídos participantes maiores de 18 anos e consumidores habituais de Kefir, sendo excluídas gestantes. Os potenciais participantes podem ser identificados por meio de diferentes canais, como redes sociais, comunidades locais, instituições de ensino ou centros de saúde. O objetivo é alcançar uma amostra diversificada e representativa da população-alvo. Os participantes serão convidados e passaram pela triagem inicial para garantir os critérios de elegibilidade. Os dados coletados nesta pesquisa (avaliação sensorial) ficarão armazenados em pastas no computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço: Rua noventa e três número 52, Maranguape II, Paulista, Pernambuco, CEP:53421450 pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa

#### **Objetivo da Pesquisa:**

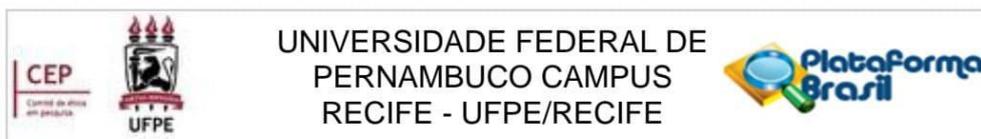
##### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar a viabilidade de microrganismos do Kefir de leite de castanhas após o processo de liofilização e verificar seu potencial para elaboração de uma bebida vegetal fermentada estável.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ¿ Avaliar a viabilidade do inóculo líquido do Kefir de leite de castanhas e obter um pó liofilizado a partir dele;
- ¿ Avaliar o pó em termos da viabilidade celular, especificamente, contagem de bactérias ácido lácticas totais e leveduras e comparar as análises microbiológicas iniciais do inóculo líquido e do pó liofilizado;
- ¿ Determinar a taxa de sobrevivência dos microrganismos no pó liofilizado durante 1 ano de armazenamento em temperatura de geladeira ( $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ );
- ¿ Elaborar uma bebida vegetal fermentada (à base de açaí em polpa e solução de açúcar demerara), utilizando o Kefir liofilizado de leite de castanhas como cultura iniciadora;
- ¿ Analisar a estabilidade da bebida através de testes como: determinação de pH, acidez titulável, sólidos solúveis totais e contagem de bactérias ácido lácticas totais e leveduras durante 28 dias de armazenamento, sob refrigeração ( $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e comparar os resultados microbiológicos obtidos com os da cultura mãe.
- ¿ Realizar uma análise sensorial do Kefir liofilizado de leite de castanhas e da bebida vegetal

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 7.021.458

fermentada sabor açaí, produzida a partir dele.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **RISCOS**

A pesquisadora afirma que poderá haver risco dos participantes alérgicos aos componentes da bebidas apresentarem alergias ou reações anafiláticas. No entanto, a pesquisadora afirma que para minimizar os riscos, antes de incluir os participantes no estudo, será realizada uma triagem detalhada para identificar possíveis alergias alimentares e intolerâncias, além de condições de saúde pré-existentes que possam ser agravadas pelo consumo dos produtos em estudo. Além disso, serão fornecidas informações claras e detalhadas sobre os ingredientes presentes na bebida vegetal fermentada e no insumo probiótico, destacando os potenciais alérgenos e substâncias que possam causar desconforto gastrointestinal. Ainda será garantido que os participantes compreendam completamente os possíveis riscos associados à degustação dos produtos e obtenham seu consentimento informado antes de participar do estudo. A equipe será treinada e para lidar com situações de emergência e haverá monitoramento dos participantes durante a degustação.. Sendo assim, a análise foi considerada adequada a metodologia proposta.

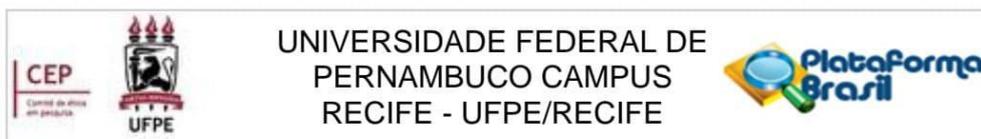
##### **BENEFÍCIOS**

A pesquisadora apresenta benefícios indiretos e diretos. Em sua análise, o benefício indireto seria contribuir para o avanço do conhecimento científico na área de alimentos e saúde. Como benefício direto, a pesquisadora relata que seria aumentar a conscientização dos voluntários sobre a importância da alimentação saudável e dos benefícios dos alimentos fermentados e probióticos para a saúde digestiva e geral. Sendo assim, a análise esta adequada a metodologia proposta.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa apresenta excelente referencial teórico. A metodologia foi redigida apresentando rigoroso detalhamento, impossibilitando qualquer duvida a respeito das etapas do projeto. No entanto, alguns detalhes importantes como previsão de alergias e intolerâncias alimentares

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 7.021.458

aparecem no texto apenas nas considerações éticas. Apesar disso, também está bem delimitado. De um modo amplo, o projeto não suscita quaisquer dúvidas, o que possibilita uma análise ampla e robusta do ponto de vista ético.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os documentos numerados abaixo estão de acordo com as recomendações do CEP:

1. A Folha de Rosto foi devidamente assinada.
2. Carta de anuência
3. O Termo de Confidencialidade foi devidamente assinado pela pesquisadora;
4. Informações Básicas da Plataforma Brasil
5. O projeto detalhado.
6. Currículo Lattes.
7. TCLE

**Recomendações:**

Sem recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências

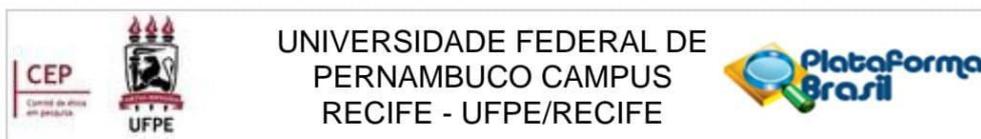
**Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Conforme as instruções do Sistema CEP/CONEP, ao término desta pesquisa, o pesquisador tem o dever e a responsabilidade de garantir uma devolutiva acessível e compreensível acerca dos resultados encontrados por meio da coleta de dados a todos os voluntários que participaram deste estudo, uma vez que esses indivíduos têm o direito de tomar conhecimento sobre a aplicabilidade e o desfecho da pesquisa da qual participaram.

Informamos que a aprovação definitiva do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO COM O RELATÓRIO FINAL da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final disponível em [www.ufpe.br/cep](http://www.ufpe.br/cep) para enviá-lo via Notificação de Relatório Final, pela Plataforma Brasil. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado. Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 7.021.458

justificativas.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

| Tipo Documento  | Arquivo                                       | Postagem               | Autor                           | Situação |
|---|---|------------------------|---------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto                            | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2371309.pdf | 10/08/2024<br>09:28:41 |                                 | Aceito   |
| Outros  | cartaderespostaaspendencias.docx              | 10/08/2024<br>09:20:09 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | ufpetclemaiores18corrigido.docx               | 10/08/2024<br>09:18:26 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador                 | projetodetalhadocorrigido.docx                | 10/08/2024<br>09:18:15 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Folha de Rosto  | folhaderostoassinada.pdf                      | 17/07/2024<br>17:16:59 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | declaracaodevinculo.pdf                       | 11/07/2024<br>18:06:28 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | historicoescolar.pdf                          | 11/07/2024<br>18:06:06 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | curriculobrunakristyer.pdf                    | 11/07/2024<br>18:04:07 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | curriculokarinarandau.pdf                     | 11/07/2024<br>18:03:44 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | curriculomariadefatima.pdf                    | 11/07/2024<br>18:03:15 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | roteirodeentrevistaefichadeavaliacao.docx     | 27/06/2024<br>17:11:57 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Outros  | cartadeanuencia.pdf                           | 27/06/2024<br>17:09:55 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Declaração de Pesquisadores                               | termodeconfidencialidade.pdf                  | 27/06/2024<br>17:08:12 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |
| Folha de Rosto  | folhaderostoassinada.pdf                      | 27/06/2024<br>16:59:02 | BRUNA KRISTYER<br>LIMA DE PAULA | Aceito   |

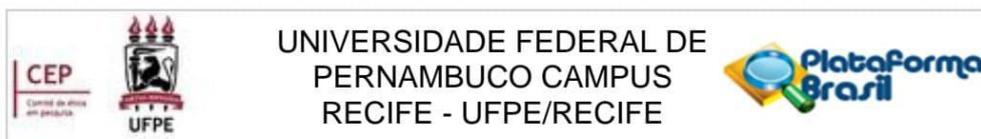
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 7.021.458

RECIFE, 22 de Agosto de 2024

---

**Assinado por:**  
**LUCIANO TAVARES MONTENEGRO**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br

## APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### BioLogicus

Biotecnologia Probiótica Indústria e Comércio LTDA.  
Av. Afonso Olindense, 72 - Várzea, Recife - PE, 50810-000, (81) 98829-4111.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

Convidamos a Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa -Viabilidade e o potencial do Kefir de castanhas na elaboração de uma bebida vegetal fermentada: um estudo de estabilidade e análise sensorial, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Bruna Kristyer Lima de Paula, endereço: Rua noventa e três número 52, Maranguape II, Paulista, Pernambuco, CEP:53421450, Telefone: (81) 98304-4850, e-mail: [bruna.kristyer@ufpe.br](mailto:bruna.kristyer@ufpe.br) e está sob a orientação de: Karina Perrelli Randau Telefone: (81) 98822-5279, e-mail [karinarandau@gmail.com](mailto:karinarandau@gmail.com) e coorientação de: Maria de Fátima Fonseca Marques Telefone: (81) 99656-6124, e-mail: [fatima.fonseca@biologicus.com.br](mailto:fatima.fonseca@biologicus.com.br).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

**Objetivo:** Realizar uma análise sensorial para descrever as propriedades sensoriais percebidas pelos sentidos, como sabor, aroma, cor e aparência. Permitindo verificar se os produtos atendem às expectativas do consumidor, auxiliando no desenvolvimento de formulações mais atraentes e palatáveis.

**Metodologia da Pesquisa:** Realizaremos um teste com 30 pessoas não especializadas, selecionadas com base em seu consumo de bebidas fermentadas, como Kefir. Antes do teste, todos os avaliadores deverão assinar um documento de consentimento. Usaremos uma escala de 7 pontos para avaliar diversos aspectos da bebida, como aparência, cor, aroma, textura, sabor e aceitação global. Calcularemos um índice de aceitabilidade para entender como as pessoas reagem à bebida e ao pó probiótico. Toda a avaliação será realizada na BioLogicus.

**Passos da Avaliação:**

1. Selecionar os participantes.
2. Apresentar os componentes da formulação dos produtos e perguntar se o participante tem alergia a algum deles, a fim de prevenir reações alérgicas.
3. Preparar as bebidas conforme protocolo estabelecido.
4. Apresentar as bebidas de forma padronizada.
5. Os participantes provarão e avaliarão as bebidas.
6. Registrar sistematicamente as respostas dos participantes.
7. Fazer as análises estatísticas dos dados coletados.
8. Tirar conclusões sobre a aceitabilidade e preferências dos produtos.

**Riscos:** Existe a possibilidade de intolerância, reações alérgicas e anafiláticas a ingredientes da bebida e do pó. Para minimizar esse risco, o voluntário será questionado sobre possíveis alergias ou intolerâncias a algum componente da formulação antes de iniciar a pesquisa. Caso ocorra alguma reação, o participante será encaminhado para a unidade de pronto atendimento mais próxima, localizada na Avenida Caxangá, S/N (em frente ao nº 40 da Rua Ribeiro Pessoa) - Várzea, Recife - PE, a aproximadamente 400 metros da empresa BioLogicus.

**Componentes da formulação**

- Pó probiótico: leite vegetal de castanha de caju e de castanha do Pará e cultura de microrganismos BioLogicus.
- Bebida vegetal fermentada: Polpa de açaí, suco de cranberry, suco de uva, suco de limão, açúcar, água e pó probiótico.

- **Medidas para minimizar os possíveis riscos:**
- **Triagem de participantes:** Antes de incluir os participantes no estudo, será realizada uma triagem detalhada para identificar possíveis alergias alimentares e intolerâncias, além de condições de saúde pré-existentes que possam ser agravadas pelo consumo dos produtos em estudo; **Informações detalhadas:** Serão fornecidas informações claras e detalhadas sobre os ingredientes presentes na bebida vegetal fermentada e no insumo probiótico, destacando os potenciais alérgenos e substâncias que possam causar desconforto gastrointestinal;
- **Consentimento informado:** Será garantido que os participantes compreendam completamente os possíveis riscos associados à degustação dos produtos e obtenham seu consentimento informado antes de participar do estudo;
- **Monitoramento durante a degustação:** Haverá uma supervisão de perto dos participantes durante a degustação, para identificar rapidamente qualquer reação alérgica e fornecer assistência médica, se necessário;
- **Equipe treinada:** A equipe responsável pela condução do estudo estará devidamente treinada para reconhecer e lidar com situações de emergência, como reações alérgicas ou problemas de saúde dos participantes durante a degustação.

#### **Benefícios para os Voluntários:**

1. Contribuir para avanços científicos na área de alimentos e saúde.
2. Experimentar novos sabores e expandir seu conhecimento sobre alimentos.
3. Fornecer feedback valioso para melhorar a qualidade dos produtos.
4. Aumentar sua conscientização sobre alimentação saudável e benefícios dos probióticos para a saúde.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (avaliação sensorial) ficarão armazenados em pastas no computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora, no endereço: Rua noventa e três número 52, Maranguape II, Paulista, Pernambuco, CEP:53421450 pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br).**

---

(assinatura do pesquisador)

#### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)**

Eu, \_\_\_\_\_, CPF \_\_\_\_\_, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Viabilidade e o potencial do Kefir de castanhas na elaboração de uma bebida vegetal fermentada: um estudo de estabilidade e análise sensorial”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação, declaro não possuir alergia aos componentes presentes na formulação tanto da bebida vegetal fermentada quanto do pó probiótico. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

**Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.** (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

|             |             |
|-------------|-------------|
| Nome:       | Nome:       |
| Assinatura: | Assinatura: |