

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DE KEFIR DE UVA INTEGRAL SUBMETIDA A PASTEURIZAÇÃO.

Isabelle Bolognese Santa Brígida (IT); Isabela Rosier Olimpio Pereira (Orientador)

Apoio: PIBITI CNPq

RESUMO

O kefir de água é uma bebida fermentada que utiliza os grãos de kefir de água, gerando substâncias bioativas em seu processo fermentativo. O suco de uva é considerado uma importante fonte de compostos bioativos fenólicos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da pasteurização lenta sobre as características microbiológicas e físico-químicas de bebida com características probióticas, fermentada pelos grãos de kefir a partir do suco de uva tinto integral, com intenção de prolongar a validade deste produto. Foi feito o acompanhamento da estabilidade das amostras fermentadas (F) e fermentadas e posteriormente pasteurizadas em diferentes parâmetros (69°C-30 min FP1, 65°C-30 min FP2) armazenadas por até 90 dias. Avaliou-se variação de pH, acidez, brix, teor alcoólico, contagem de bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras e determinação de fenólicos. A contagem de BAL e leveduras na amostra F foi na ordem de 10^{-6} UFC/mL, a amostra FP2 demonstrou crescimento a partir de 30 dias de armazenamento chegando a mesma ordem de crescimento ao fim do terceiro mês, sendo a única amostra pasteurizada a apresentar crescimento. Em todas as amostras, ocorreu diminuição do brix e aumento do teor alcóólico (T60 dias F=7,6% \pm 0,05, FP1=0,4% \pm 0,12 e FP2=0,1% \pm 0,14) em função do tempo de armazenamento. Em todos os parâmetros analisados, excetuando o brix (T60 dias F=7,1° \pm 0,55, FP1=10,9° \pm 0 e FP2=10,3 \pm 0), os valores das amostras pasteurizadas persistiram reduzidos em comparação a amostra F. Conclui-se que a pasteurização pode ser efetiva no atraso da deterioração do produto, e que a amostra FP2 demonstrou os melhores resultados.

Palavras-chave: Probiótico, Compostos fenólicos, Estudo de estabilidade.

ABSTRACT

The water kefir is a fermented drink that uses the grains of water kefir, generating bioactive substances in its fermentation process. Grape juice is considered an important source of bioactive phenolic compounds. The aim of this study was to evaluate the effect of slow pasteurization on the microbiological and physical-chemical characteristics of a drink with probiotic characteristics, fermented by kefir grains from whole red grape juice, with the intention of extending the validity of this product. The stability of the fermented (F) and fermented samples was followed up and later pasteurized in different parameters (69°C-30 min FP1, 65°C-30 min FP2) stored for up to 90 days. Variation in pH, acidity, brix, alcohol content, count

of lactic acid bacteria (BAL) and yeasts and determination of phenolics were evaluated. The BAL and yeast count in sample F was on the order of 10^{-6} CFU / mL, the FP2 sample showed growth after 30 days of storage reaching the same growth order at the end of the third month, being the only pasteurized sample to show growth. In all samples, there was a decrease in brix and an increase in alcohol content (T60 days F = $7.6\% \pm 0.05$, FP1 = $0.4\% \pm 0.12$ and FP2 = $0.1\% \pm 0.14$) as a function of the time of storage. In all parameters analyzed, except for the brix (T60 days F = $7.1^{\circ} \pm 0.55$, FP1 = $10.9^{\circ} \pm 0$ and FP2 = 10.3 ± 0), the values of pasteurized samples remained low compared to sample F. It is concluded that pasteurization can be effective in delaying the deterioration of the product, and that the sample FP2 demonstrated the best results.

Keywords: Probiotic, Phenolic compounds, stability study.

1. Introdução

O mercado global de suplementos alimentícios probióticos, de €4 bilhões (US\$ 4,30 bilhões), teve um crescimento de 9% em 2016 e uma estimativa de crescimento de 38% entre 2016 e 2021. Além disso, o crescimento dos suplementos probióticos ultrapassará todas as outras categorias de suplementos alimentares. (MILK POINT, 2016). O relatório Global Industry Analysis, feito pelo Transparency Market Research (TMR) destacou as áreas de interesse para probióticos não lácteos, cereais, produtos fermentados de carne, alimentos desidratados, entre outros. O mercado de probióticos no Brasil também está mostrando um grande potencial para crescimento (MILK POINT, 2013).

Mascarenhas (2012) avaliou a aceitação sensorial de bebida láctea à base de Kefir em comparação aos iogurtes comerciais e os resultados obtidos mostraram preferência ao iogurte comercial em alguns quesitos, resultando em uma menor aceitação do Kefir. Este resultado indica que o kefir pode não ter uma boa aceitação no mercado brasileiro na forma de bebida, porém, abre-se o campo para o desenvolvimento de produtos versáteis e alternativos com melhor aceitação junto aos benefícios probióticos do kefir.

O produto proposto, com características probióticas, fermentado pelos os grãos de kefir e partir do suco de uva tinto integral, visa apresentar elevada aceitação sensorial somada aos benefícios do consumo do suco de uva integral. E assim, contribuir com esta demanda do mercado por alimentos e bebidas saudáveis.

Este projeto pretende desenvolver e caracterizar um produto inovador, usando a tecnologia de fermentações como base para obtenção de um produto com características probióticas contendo microrganismos vivos, e de pasteurização como estratégia para prolongação do tempo de prateleira do produto, mantendo o teor alcoólico inferior a 0,5%

(para ser considerado não-alcoólico pela legislação brasileira) e mínimo de acidez para não afetar a sensorialidade.

1.1. Objetivo Geral e Específico

1.1.1. Objetivo geral

- ✓ Desenvolver um produto fermentado com grãos de kefir de água a partir do suco de uva tinto integral, sem adição de açúcares e conservantes.

1.1.1. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a eficiência da pasteurização lenta sob as características físico-químicas e microbiológicas do produto fermentado com grãos de kefir;
- ✓ Determinar o melhor tempo e temperatura de pasteurização em função da sobrevivência dos micro-organismos;
- ✓ Determinar as características dos produtos fermentados com grãos de kefir de água a partir de suco de uva tinto integral e pasteurizados durante seu armazenamento, comparando com os dados descritos na literatura;

1.2. Organização do Documento

O estudo é apresentado em, a partir deste, mais sete tópicos. Do tópico 2 ao 5 apresentam-se aspectos gerais e contextualização, incluindo o problema a ser trabalhado, solução proposta, revisão bibliográfica e estado da prática no mercado. O tópico 6 refere-se aos materiais e métodos empregados e discussão dos resultados obtidos. Por fim o tópico 7 conclui o estudo e apresenta suas perspectivas futuras. No tópico seguinte são listadas as referências utilizadas.

2. Problema

O kefir pode ser encontrado em diversos países. Na Rússia é produzido em indústrias lácteas, como a Danone (ENIKKEEV, 2012 *apud* PAIVA, 2013). No Brasil ainda há poucas indústrias produzindo kefir e começaram sua produção entre final de 2018 e início de 2019, mas o produto vem conquistando adeptos em várias regiões do país. Sua preparação se dá em nível artesanal, e resulta em um produto com uma série de características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas, se restringindo a algumas famílias que passam as amostras e a ela vão adicionando leite para a sua fermentação e utilização. O cultivo de kefir não é uma tarefa muito prática diante da rotina da vida nas grandes cidades. Muitos consumidores preferem produtos mais práticos e rápidos, sem abrir mão da “saudabilidade”. O interesse pelo kefir tem aumentado, representando um desafio tecnológico (ROSA et al., 2017).

Além da baixa aceitação e falta de praticidade, um outro desafio é a manutenção dos microrganismos vivos. A produção industrial de probióticos exige que estes microrganismos se mantenham estáveis e viáveis em níveis satisfatórios durante todo o prazo de validade do produto (SAAD, 2006). Um suco fermentado com kefir, porém, deverá ter teor alcoólico inferior a 0,5% (para ser considerado bebida não-alcoólica segundo a Instrução Normativa MAPA nº 55 de 2008) e mínimo de acidez para não afetar a sensorialidade, necessitando de um controle sobre suas atividades microbiológicas.

3. Proposta de Solução

A pasteurização é um tratamento térmico controlado e realizado com temperaturas inferiores a 100°C, em que o alimento é resfriado após um determinado tempo de aquecimento (GUTIERREZ, 2008). É uma técnica baseada em usar temperaturas elevadas com finalidade de pelo menos desativar alguns microrganismos, ou mesmo eliminá-los e, com isso, controlar o nível de atividade bacteriológico nos produtos, sem alterar profundamente suas propriedades (SEVILA, 2004 *apud* FONTANA, 2009).

O processo possui diferentes objetivos dependendo do alimento que sofre o processo. Em alimentos ácidos, como os sucos de fruta, produz uma boa estabilização já que o meio ácido impede a proliferação de microrganismos mais resistentes à ação térmica (GAVA, 1998).

Na pasteurização o ponto mais importante é o binômio tempo/temperatura, que garante a obtenção de um processo de esterilização comercial. Temperaturas abaixo das estabelecidas são indesejáveis e acima podem causar problemas tecnológicos com alterações das proteínas, interferindo no sabor, geleificação, formação de sedimentos, bloqueio da transferência de calor nas superfícies dos trocadores de calor, perda do valor nutricional e escurecimento (BASTOS, 1999).

Processo amplamente utilizado nas indústrias alimentícias e até por pequenos produtores, por ser um processo relativamente barato, quando levado em consideração a manutenção da qualidade que pode ser obtida, tanto com relação à estabilidade microbiana quanto à fixação de nutrientes (FELLOWS, 1994).

A solução ideal desejada nesse estudo é a obtenção da melhor relação tempo/temperatura que levasse a uma maior redução da contagem de leveduras, que mais afeta a estabilidade do produto, mas que afetasse o menor possível a contagem de bactérias lácticas, mantendo seu valor probiótico.

4. Referencial Teórico

4.1. Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais destacam-se por possuírem potencial para promover a saúde no indivíduo, e não apenas fornecer macro e micronutrientes previstos na nutrição convencional (SAAD et al., 2011).

O entendimento de que a alimentação tem um significado muito maior do que fornecer nutrientes necessários para o desenvolvimento do homem é uma corrente que tem crescido mundialmente cada vez mais nos últimos anos (NITZKE, 2012). Apenas a América Latina representa US\$ 45 bilhões do mercado de alimentos e bebidas funcionais, sendo o Brasil responsável por movimentar US\$ 14,6 bilhões desse total. Estes números colocam o Brasil entre os 10 mercados que mais crescem no mundo neste seguimento (SCHULKA; COLLA, 2014).

Alguns componentes que dão funcionalidade aos alimentos são: carotenoides, flavonoides, ácidos graxos, probióticos, fibras alimentares dentre outros. A importância deste tema se deu, principalmente, em decorrência do aumento da média de expectativa de vida da população relacionado com o maior interesse por parte da mesma em uma alimentação mais equilibrada afim de buscar qualidade de vida (SAAD et al., 2011).

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) não define alimentos funcionais, mas permite através das Resoluções n. 18, de 30 de abril de 1999 e n.19, de 30 de abril de 1999, o uso da alegação de propriedades funcionais e registros na categoria de alimentos com propriedades funcionais ou de saúde, respectivamente.

De acordo com a ANVISA (BRASIL, 2016), deve ser levado em consideração se o texto pretendido contém todos os elementos primordiais para descrevê-lo como uma alegação de propriedade funcional ou como uma alegação de propriedade de saúde, conforme descrições constantes da Resolução n. 18/1999. As alegações de propriedade funcional são aquelas que se referem ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente (substâncias bioativas ou micro-organismos) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo. Ao passo que as alegações de propriedade de saúde são aquelas que afirmam, sugerem ou implicam a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com a doença ou condição relacionada à saúde.

4.2. Efeitos dos probióticos na saúde humana

Um probiótico deve ser preferencialmente de origem humana, seguro e livre de vetores capazes de transferir resistência a antibióticos e de patogenicidade ou até mesmo fatores de toxicidade. Além disso, um micro-organismo probiótico deve ter grande capacidade de sobreviver sob condições intestinais (pH ácido, enzimas digestivas, sais biliares etc.), deve

demonstrar antagonismo contra patógenos e estimulação do sistema imunológico e, por fim, proporcionar efeitos benéficos em seu hospedeiro (PLAZA-DIAZ, 2018).

Alguns possíveis mecanismos de ação dos probióticos já foram descritos: 1) supressão do número de células viáveis, por meio da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão; 2) a modulação do metabolismo microbiano, por meio da redução ou elevação da atividade enzimática; 3) o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. Neste contexto, o efeito da atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos (FULLER, 1989).

Estudos documentaram o papel dos probióticos em reduzir os fatores de risco para diversas comorbidades, incluindo distúrbios digestivos, como a diarreia causada por infecções (PLAZA-DÍAZ, 2018), síndrome do intestino irritável (SII) (MOAYYEDI et al., 2010), doença inflamatória intestinal (DII) (SAEZ-LARA et al., 2015) e distúrbios alérgicos, como dermatite atópica (RATHER et al., 2016) e rinite alérgica (BERINGS et al., 2017).

4.3. Kefir de água

O kefir de água é uma bebida fermentada caseira à base de uma solução de sacarose e diferentes tipos de suco de frutas. Tradicionalmente, no processo de preparação da bebida, os grãos de kefir são colocados em uma solução contendo 8% de sacarose, frutas (tipicamente figos) e fatias de limão. A fermentação ocorre por um ou dois dias a temperatura ambiente, resultando em uma bebida turva, carbonatada e cor de palha, que é ácida, pobre em açúcar e ligeiramente alcoólica (GULITZ et al.; 2011).

A microbiota do kefir de água é conhecida por ser uma associação estável de diferentes bactérias como as ácido-láticas, ácido-acéticas e leveduras (NEVE; HELLER, 2002). Os grãos de kefir de água contém exopolissacarídeos, como o kefirano e o dextrano. Já foi identificado que a cepa de *Lactobacillus hilgardii* produz quantidades importantes de exopolissacarídeos, que formam os grãos de kefir e que trazem benefícios à saúde (WALDHERR et al., 2010).

O processo fermentativo do kefir gera uma série de compostos que conferem sabor e aroma característicos, além de substâncias bioativas, responsáveis por propriedades nutracêuticas, como o kefirano, ácidos graxos de cadeia curta, bacteriocinas, além de efeitos independentes da viabilidade celular (BOURRIE et al., 2016). Maeda et al. (2004a e b) encontrou efeito da suplementação de kefirano isolado (sem a presença de microrganismos vivos) sobre a motilidade intestinal, qualidade das fezes e redução da glicemia e pressão sanguínea em animais. Em complemento, Paiva et al. (2013) obteve eficiência em avaliar seu

efeito imunomodulatório, concluindo que o dextrano isolado foi capaz de modular a resposta imune em camundongos. Isso significa que a despeito dos produtos derivados de kefir manterem viabilidade celular, adicionalmente podem possuir efeitos benéficos decorrentes de produtos bacterianos que também podem ser explorados.

4.4. Suco de uva

O suco de uva é considerado uma bebida única, tanto sob o aspecto energético quanto nutricional e terapêutico. É uma bebida de sabor doce e ácido ao mesmo tempo, com baixo teor de lipídios, proteínas e sódio. Possui quantidade elevada de açúcar, ácidos orgânicos e sais minerais. Além disso contém vitaminas e é de fácil digestibilidade, já que todos os seus constituintes são facilmente assimilados pelo organismo humano (EMBRAPA, 2006).

A uva é uma das maiores fontes de compostos bioativos fenólicos. Encontra-se flavonoides (antocianinas, flavanóis e flavonóis), os estilbenos (resveratrol), os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos cinâmicos e benzóicos) e uma larga variedade de taninos. No organismo humano o resveratrol traz benefícios relacionados a saúde do coração, como a hipogregação de plaquetas e a inibição de peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade (POUSSIER, 2005).

O ácido gálico, um dos metabólitos gerados a partir das antocianinas pela microbiota intestinal, reduziu significativamente bactérias nocivas que geram doenças inflamatórias intestinais, como o *Clostridium histolyticum* (HIDALGO et al., 2012).

Considerando-se todas as vantagens dos probióticos e dos compostos bioativos fenólicos para a saúde humana, os sucos de frutas probióticos, integrais e sem adição de açúcar, são produtos atraentes para atingir consumidores que, além de se preocuparem com saúde e bem-estar, também querem produtos funcionais não-lácteos inovadores. Atualmente, um aumento do vegetarianismo/veganismo e a intolerância à lactose justifica a necessidade de criar novos produtos (GRANATO et al., 2010). A aceitação do suco de uva é alta por parte dos brasileiros, e isso auxilia de forma positiva na inserção de novos produtos utilizando esta matéria prima como base para a formulação de bebidas funcionais (NASCIMENTO et al. 2011).

5. Estado da Prática

Nessa linha de entendimento uma bebida similar a produzida nesse estudo, é a kombucha. Bebida fermentada tradicional originada no Oriente, e que hoje já está bastante difundida no Ocidente (TEOH; HEARD; COX, 2004). Ela é obtida a partir da infusão de folhas de chá pela fermentação de uma associação simbiótica de bactérias e leveduras, resultando em uma bebida um pouco doce e ligeiramente ácida (CHEN; LIU, 2000).

Assim como o kefir, ao longo de sua fermentação, ela vai ficando com o sabor mais ácido, originado do ácido acético produzido, diminuindo sua aceitação sensorial. O valor do pH decresce ao longo da fermentação devido à produção de ácidos orgânicos (DUFRESNE; FARNWORTH, 2000). Ao final do processo, consome-se a kombucha refrigerada, podendo ser servida como um substituto não alcoólico do espumante devido ao seu alto grau de carbonatação ou também do refrigerante, sendo uma alternativa mais saudável (PALUDO, 2017).

O mercado global de kombucha, foi avaliado em torno de USD 1062 milhões em 2016 e espera-se alcançar aproximadamente USD 2457 bilhões até 2022, crescer em um CAGR de cerca de 25,0% entre 2017 e 2022 (ZION MARKET RESEARCH, 2018). Segundo dados da Associação Brasileira de Kombucha, estima-se que o mercado brasileiro movimentava atualmente cerca de R\$ 11 milhões de faturamento com produção de 500 mil litros mensais (ABKOM, 2020).

O processo térmico utilizado nesse projeto é amplamente utilizado industrialmente. O suco de laranja natural apresenta uma vida útil muito limitada, o processo térmico visa aumentar a sua vida útil e garantir a saúde do consumidor, porém deve ser conduzido de forma a manter as características sensoriais mais próximas do suco natural “fresco” (CORRÊA NETO; FARIA, 1999). Tribess e Tadini (2001), conclui em seu estudo que o suco de laranja minimamente processado atende a expectativa do público e vai de acordo com a tendência mundial de consumidores por produtos prontos industrializados, e no caso do suco em pesquisa, muito próximo ao suco fresco obtido da laranja.

6. Avaliação de Desempenho

6.1. Metodologia Experimental

6.1.1. Material

O suco utilizado, de uva tinto integral sem adição de açúcar, conservantes e água da marca Campo Largo®, foram adquiridos em comércio local. Os grãos de kefir de água utilizados na fermentação do suco de uva tinto integral doados pelo Laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, onde foram cultivados. Os grãos de kefir de água estiveram mantidos em solução contendo açúcar mascavo e suco de uva tinto integral. Todos os reagentes e solventes utilizados nas análises corresponderam a grau analítico.

6.1.2. Manutenção dos grãos

Os grãos de kefir de água foram mantidos na geladeira do Laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie a 5°C. Foi realizada a troca da solução de açúcar mascavo (8g/L) e suco de uva tinto integral sem adição de açúcar (10 mL/L) semanalmente.

Os grãos eram retirados da jarra de acrílico com o auxílio de uma peneira de malha fina sem serem lavados, para evitar perda de kefirano/dextrano. Após a água ser descartada, passava-se os grãos novamente na jarra acrílica adicionada de solução de açúcar mascavo e suco de uva tinto integral sem adição de açúcar.

6.1.3. Direcionamento das análises

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas para as amostras de suco de uva tinto integral antes da fermentação (Uva tinto), suco de uva tinto integral submetido a fermentação (Fermentada), suco de uva tinto integral submetido a fermentação e posteriormente a pasteurização sob os parâmetros 69°C em 30 minutos (Pasteurizada 1), e sob os parâmetros 65°C em 30 minutos (Pasteurizada 2), sendo que neste último parâmetro também avaliado sua eficiência em embalagem de lata de alumínio armazenada sob refrigeração (Lata/Refrigerada) e em temperatura ambiente (Ambiente), no acompanhamento do prazo de validade do produto, sendo logo após a fermentação e pasteurização (T0), após 30 dias (T1), após 60 dias (T2) e após 90 dias (T3).

Entretanto o tempo de análise foi interrompido pela pandemia decorrente ao SARS-CoV-2, frente a situação, alguns dos tempos de análise foram excluídos de acordo com a necessidade da coleta dos dados.

6.1.4. Fermentação do suco de uva tinto integral

Realizada a assepsia com álcool 70% da bancada e dos utensílios utilizados na produção, para eliminar os riscos de contaminação do suco e dos grãos de kefir, os grãos de kefir de água foram pesados em balança semi-analítica e adicionados ao suco de uva tinto integral, na própria embalagem do fabricante (1,35L), na proporção de 0,4 g (quantidade estabelecida em testes preliminares) para cada 100 mL de suco. Após isso, este suco é levado para a câmara de fermentação a 25°C durante 12h e 24h. O suco fermentado foi coado (em rede de nylon) a fim de retirar todos os grãos de kefir que serão armazenados para reutilização conforme item 6.1.2.

6.1.5. Pasteurização do suco de uva tinto integral fermentado

Para avaliação do parâmetro 1, as amostras foram postas em banho-maria em 69°C, após as amostras introduzidas levou aproximadamente 5 minutos para estabilização do banho na temperatura definida, as amostras ficaram sob a temperatura de 69°C \pm 1°C por 30 minutos, em seguida transferidas para banho de gelo á 10°C \pm 2°C, onde foram mantidas por 10 minutos. Após esse processo as amostras foram mantidas sob refrigeração por até 60 dias.

Para avaliação do parâmetro 2, as amostras, em garrafa de vidro e lata de alumínio, foram postas em banho-maria em 65°C, após as amostras introduzidas levou

aproximadamente 4 minutos para estabilização do banho na temperatura definida, as amostras ficaram sob a temperatura de $65^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos, em seguida transferidas para banho de gelo á $10^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, onde foram mantidas por 10 minutos. Após esse processo as amostras foram mantidas sob refrigeração por até 90 dias, em paralelo amostras em lata de alumínio foram mantidas em temperatura ambiente pelo mesmo período.

6.1.6. Caracterização físico-química dos produtos fermentados com grãos de kefir de água a partir de suco de uva tinto integral

As análises físico-químicas básicas de pH, acidez, °Brix e teor alcoólico serão realizadas de acordo com Lutz, 2008.

6.1.7. Teor de compostos fenólicos

Para análise do teor de fenólicos totais será realizada metodologia descrita por Singleton et al. (1999), com algumas modificações.

6.1.8. Caracterização microbiológica (Leveduras e Bactérias ácido-láticas (BAL))

Para avaliação da viabilidade de BAL e leveduras foi utilizada a técnica de contagem baseada nas Unidades Formadoras de Colônias por mL (UFC/mL), de acordo com o procedimento descrito na literatura (Gül et al., 2005).

6.1.9. Análise Estatística

O teste t de Student (não pareado, bicaudal) foi usado para comparar os dados das amostras fermentadas e pasteurizadas com o suco e entre amostra fermentada e pasteurizada. O software utilizado foi o Microsoft Excell. Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão da média. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos se $p < 0,05$.

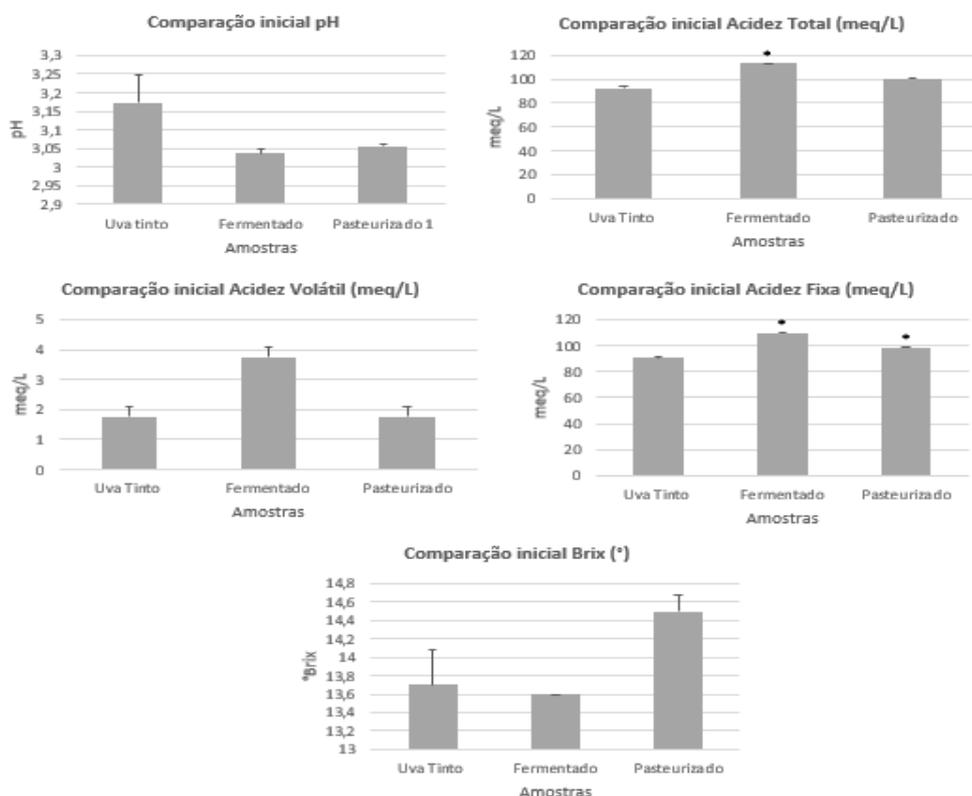
6.2. Resultados Experimentais e Análise

6.2.1. Caracterização Físico-química

Os resultados de tais análises físico-químicas são utilizados nos padrões de identidade e qualidade dos sucos, sendo pH, acidez total, volátil e fixa, teor alcóólico e °Brix. Do suco de uva tinto integral para o mesmo suco após passar por fermentação houve variações estatisticamente significativas somente na acidez (total e fixa) do produto, sendo que após a fermentação tende a aumentar. Isso ocorre, pois, as bactérias e algumas leveduras irão produzir ácidos orgânicos e outros metabólitos a partir da degradação dos carboidratos presentes (VILELA, 2019). Após a pasteurização houve variações estatisticamente significativas somente na acidez fixa, embora a acidez aumente decorrente a fermentação, após o aquecimento no processo de pasteurização acidez volátil é perdida e, portanto, o

produto se torna menos ácido (Fig. 1). Não houve comparação inicial do teor alcoólico pois, inicialmente, em todas as amostras o teor era nulo.

Figura 1 - Comparação dos parâmetros físico-químicos (pH, meq/L, °Brix e %(v/v)). T0 (tempo inicial do experimento). Amostras de suco de uva tinto integral (Uva tinto), amostras fermentadas (Fermentada) e fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros 69°C-30 min (Pasteurizada). Os dados são expressos como média \pm desvio padrão da média. ** comparam a amostra analisada com o suco de uva tinto integral ($p < 0,05$ Teste T de Student, não-pareado, bicaudal).

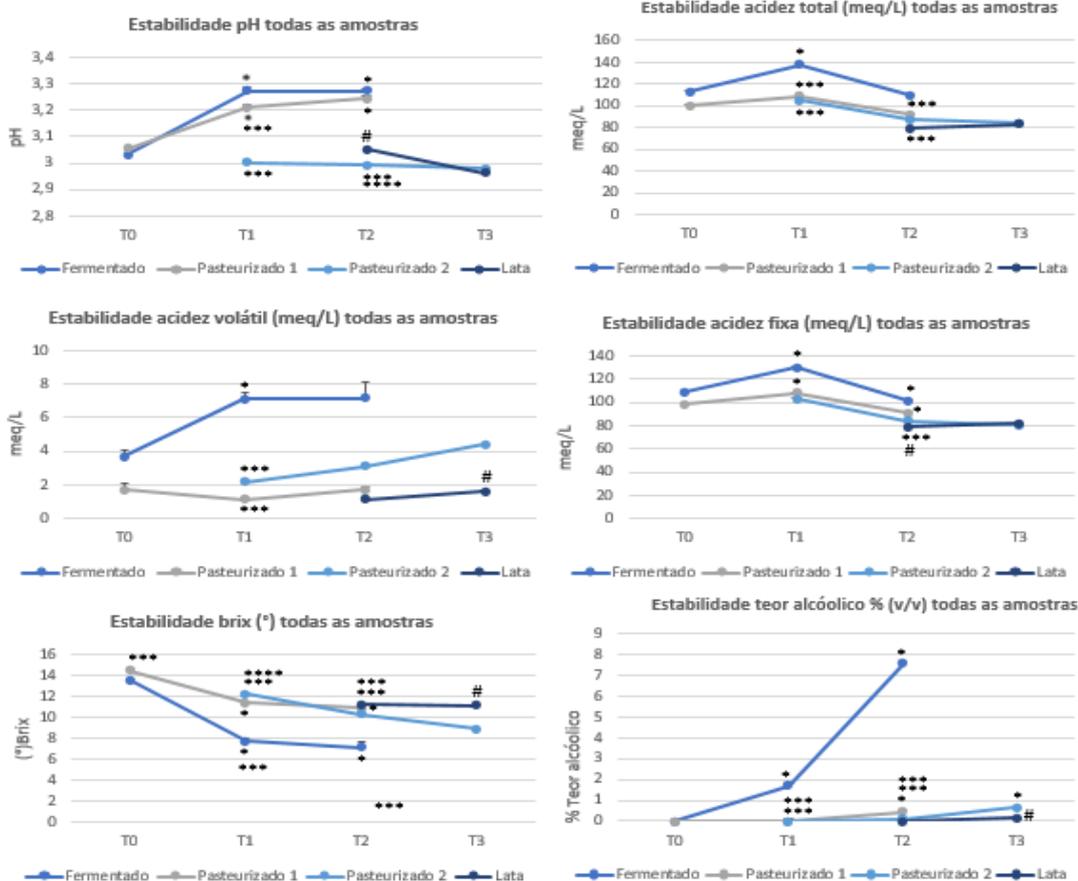


A figura 2 reúne os resultados das análises físico-químicas durante o tempo de validade do produto. Em relação a acidez nas amostras, comparando os resultados nota-se que a amostra fermentada manteve valores elevados em detrimento das amostras fermentadas e posteriormente pasteurizadas, e teve um aumento significativo do T0 ao T1, ou seja, no primeiro mês de armazenamento. As amostras “Pasteurizada 2” e “Lata” demonstraram menor acidez total e fixa, embora a amostra acondicionada em lata tenha se mantido abaixo em acidez da amostra em vidro não foi em valores estatisticamente significativos. A amostra “Pasteurizada 1” demonstrou menor acidez volátil que as demais, provavelmente, pelo fato de a temperatura de pasteurização ter sido maior, eliminou maior quantidade de ácido acético produzido na fermentação, demonstrando também, provável vazamento pela tampa durante a pasteurização, seu aumento durante o tempo de estudo, tal como a acidez total, não foi significativo, assim como as outras amostras pasteurizadas sob os segundos parâmetros.

O teor alcóolico é o parâmetro de maior preocupação, pois por ele o produto pode ser recusado em vista da legislação brasileira vigente. Observa-se que a amostra somente fermentada apresentou um aumento considerável durante o tempo de estudo, alcançando o valor de 7,6% \pm 0,05 ao final do segundo mês de armazenamento. Em comparação, as amostras submetidas a pasteurização apresentaram aumento significativamente reduzidos, enquanto a amostra “Pasteurizada 1” apresentou 0,4% \pm 0,12 ao final do segundo mês de armazenamento, a amostra “Pasteurizada 2” apresentou 0,1% \pm 0,14 no mesmo período, enquanto a amostra “Lata” permanecia em 0%. Ao final do tempo de validade (T90 dias), a amostra “Pasteurizada 2” alcançou teor alcóolico de 0,6% \pm 0,05 e a “Lata” de 0,1% \pm 0,12. Demonstrando a efetividade e necessidade da pasteurização.

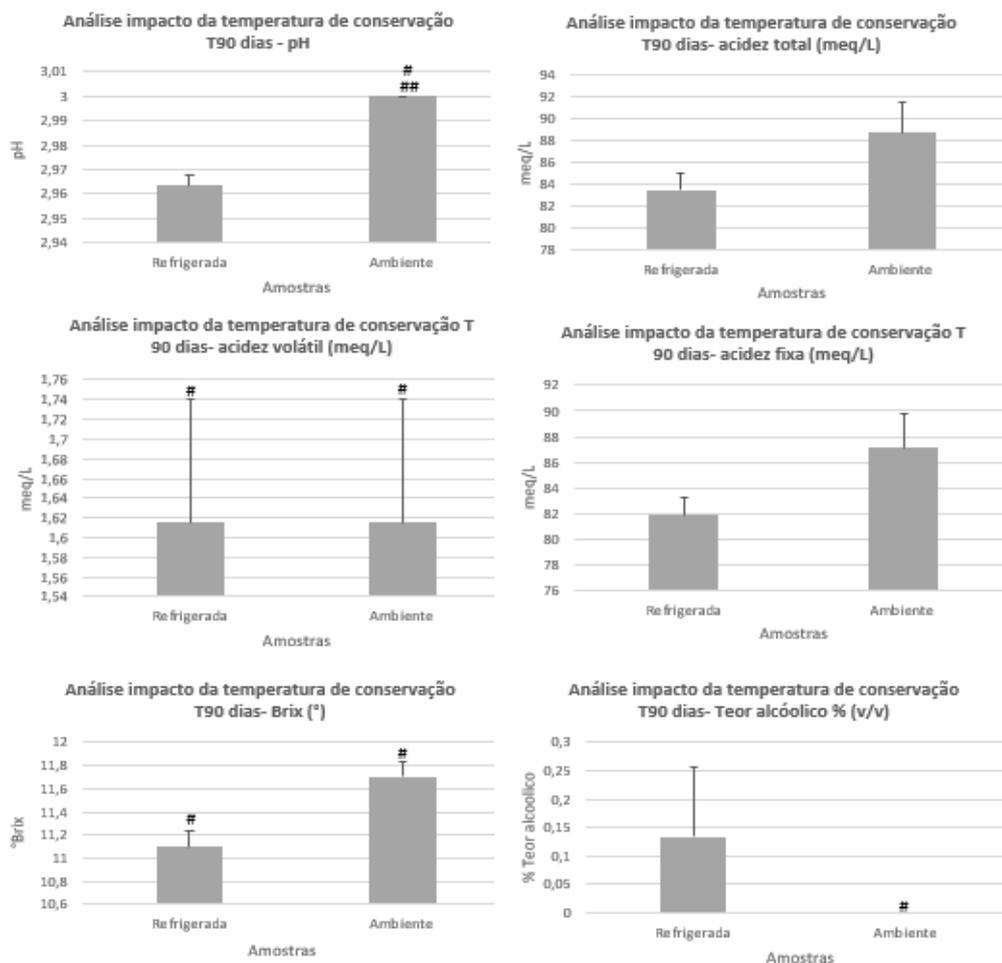
O °Brix reflete a concentração de carboidrato (substrato) na amostra, MANSANO & VENTURINI FILHO (2014) fundamenta em seu trabalho que a alta fermentação gera altos teores alcóolicos, fazendo com que os resíduos sólidos no produto após os processos de fermentação sejam baixos. Em concordância com o mesmo estudo, os valores de °Brix da amostra somente fermentada decresceu significativamente durante o período de estudo, com variação significativa em comparação as amostras fermentadas e posteriormente pasteurizadas. Seguindo mesmo sentido, comparando-se as amostras pasteurizadas, os valores apresentados no final do primeiro mês de armazenamento pela amostra “Pasteurizada 2” foi significativamente maior a da “Pasteurizada 1”, e ao final do terceiro mês de armazenamento significativamente menor que a amostra “Lata”.

Figura 2 – Comparação dos parâmetros físico-químicos (pH, meq/L, °Brix e %(v/v)) durante o acompanhamento da estabilidade das amostras. T0 (inicial), T1 (30 dias), T2 (60 dias), T3 (90 dias). Amostras fermentadas (Fermentada), fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros 69°-30 min (Pasteurizada 1), e sob os parâmetros 65°-30 min (Pasteurizada 2) e pasteurizadas sob o segundo parâmetro acondicionada em lata (Lata). * compara a variação da mesma amostra em relação ao tempo anterior, *** compara a amostra analisada com o suco fermentado, **** compara a amostra analisada com o suco fermentado e pasteurizado sob os parâmetros 1, # compara os acondicionamentos, em garrafa de vidro e em lata de alumínio ($p < 0,05$ Teste t de Student, não-pareado, bicaidal).



Uma amostra do suco fermentado e posteriormente pasteurizado sob os parâmetros 2 acondicionada em lata de alumínio foi mantida durante todo tempo de validade em temperatura ambiente, para que, no último tempo de avaliação (T3- 90 dias) pudesse ter seus parâmetros comparados a amostra de mesmas condições mantida sob refrigeração (Fig. 3). Percebe-se que houve diferença significativa somente no pH, nos demais parâmetros não houveram variações significativas. Nota-se também que as duas amostras demonstraram alteração significativa tanto nos valores de acidez volátil como de °brix em comparação com a amostra acondicionada em garrafa de vidro. O teor alcóolico da amostra “Ambiente” também foi significativo em comparação a amostra “Pasteurizada 2”, visto que a primeira permaneceu em $0\% \pm 0$.

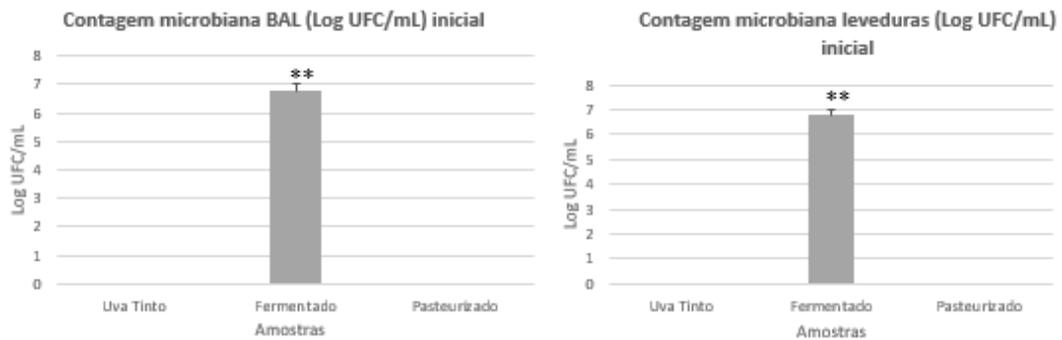
Figura 3 - Comparação dos parâmetros físico-químicos (pH, meq/L, °Brix e %(v/v)). T3 (90 dias). Amostras fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros 69°C-30 min acondicionadas em lata de alumínio refrigeradas (Refrigeradas) e mantidas em temperatura ambiente (Ambiente). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. # compara os acondicionamentos, em garrafa de vidro e em lata de alumínio, ## compara temperatura de acondicionamento, lata de alumínio refrigerada e em temperatura ambiente ($p < 0,05$ Teste T de Student, não-pareado, bicaudal).



6.2.2. Características Microbiológicas

A contagem microbiana, expressada por UFC/mL⁻¹, logo após os processos os quais as amostras foram submetidas foi ilustrada na figura 4, na qual é visível o aumento significativo, tanto de BAL quanto de fungos e leveduras após a fermentação do suco de uva tinto integral, ambos com viabilidade de 10⁶ UFC/mL⁻¹. Demonstrando concordância com valores expressos em estudos tratando-se de fermentação probiótica em sucos, com viabilidade de no mínimo de 10⁶ UFC/mL, como o realizado por Damião (2019) e Machado e Rizzato (2019). A amostra “Pasteurizada”, no entanto, não demonstrou crescimento microbiano, sendo abaixo do esperado.

Figura 4 – Comparação parâmetros microbiológicos (Log UFC/mL). T0 (tempo inicial do experimento). Amostras de suco de uva tinto integral (Uva tinto), amostras fermentadas (Fermentada) e fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros 69°C-30 min (Pasteurizada). Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. ** comparam a amostra analisada com o suco de uva tinto integral (p < 0,05 Teste T de Student, não-pareado, bicaudal).



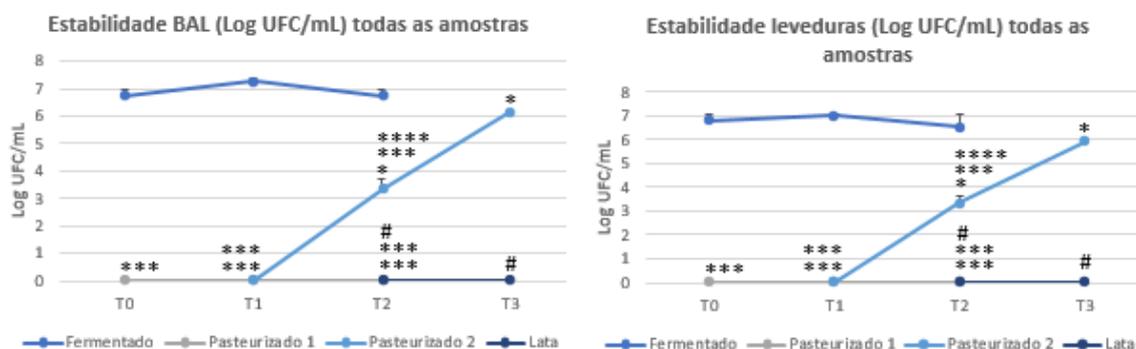
A figura 5 reúne a variação nos parâmetros microbiológicos de todas as amostras ao longo do período de experimento. Todas as amostras submetidas a pasteurização (Pasteurizado 1, Pasteurizado 2 e Lata) demonstraram diferença significativas com a amostra apenas fermentada (Fermentado), essa última manteve-se com a contagem microbiana acima de 10^6 UFC/mL, no T2 essa contagem demonstrou um declínio, embora não significativo. Ácidos orgânicos, como o lático e o acético, são poderosos agentes antimicrobianos e podem ter um papel fundamental na sobrevivência de culturas probióticas, sendo que maiores concentrações desses compostos resultam em menores contagens de probióticos (AKALIN; FENDERYA; AKBULUT, 2004).

As amostras “Pasteurizado 1” e “Lata” não demonstraram contagem durante o período de estudo, não sendo resultados satisfatórios, porém acredita-se que tenha mantido microorganismos vivos pois, em consonância com o visto na literatura, de que os microorganismos das culturas probióticas metabolizam os açúcares presentes (DING; SHAH, 2008), observa-se que os parâmetros físico-químicos, em especial °Brix e teor alcóolico, variaram progressivamente, confirmando a presença destes. A amostra que demonstrou os melhores resultados foi a “Pasteurizada 2”, na qual houve crescimento gradativo até o T3. Apesar de que a amostra “Lata” tenha sido pasteurizada sob os mesmos parâmetros que a “Pasteurizada 2”, a embalagem de alumínio apresenta uma melhor condução térmica, superior ao vidro, nesse sentido a mesma temperatura causou maior eliminação dos microorganismos decorrente ao material acondicionado.

Quanto a amostra “Ambiente”, assim como a amostra “Refrigerada”, não apresentou crescimento (ambos < 1 UFC/mL ± 0).

Figura 5- Comparação dos parâmetros microbiológicos (Log UFC/mL) durante o acompanhamento da estabilidade das amostras. T0 (inicial), T1 (30 dias), T2 (60 dias), T3 (90 dias). Amostras fermentadas (Fermentada), fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros 69° -30 min (Pasteurizada 1), e sob os parâmetros 65° -30 min (Pasteurizada 2) e pasteurizadas sob o segundo parâmetro acondicionada em lata (Lata). * compara a variação da mesma amostra em relação ao tempo anterior, *** compara a amostra analisada com o suco fermentado, **** compara a amostra analisada

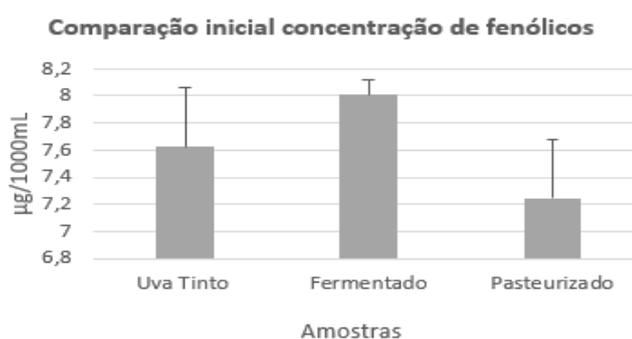
com o suco fermentado e pasteurizado sob os parâmetros 1, # compara os acondicionamentos, em garrafa de vidro e em lata de alumínio ($p < 0,05$ Teste t de Student, não-pareado, bicaudal).



6.2.3. Determinação de Fenólicos

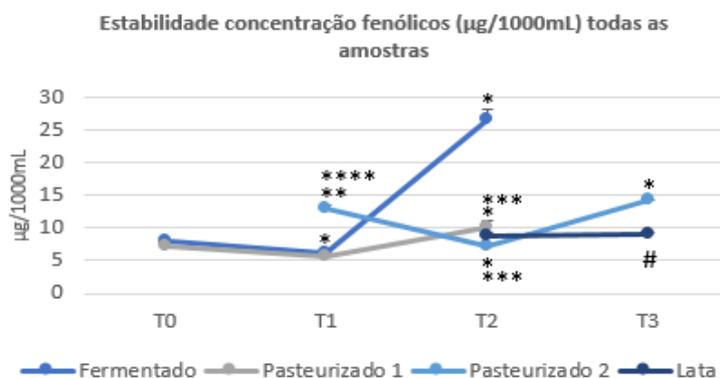
A figura 6 expõe a variação da concentração de fenólicos após o suco passar, respectivamente, pelos processos de fermentação e pasteurização. Embora não estatisticamente significativas, percebe-se que a fermentação provocou um estímulo a produção de fenólicos, posteriormente a pasteurização causou perda desses compostos. Um estudo realizado por Dutra (2012), observando a interferência de processos térmicos sobre compostos fenólicos, a concentração de fenólicos em uma amostra teria aumentado após processos a partir de 88°C por 30 segundos, o mesmo explicou que tais aumentos poderiam ser o resultado de uma provável redução do teor de água presente no suco em razão da evaporação, considerando esse trabalho podemos supor que o tempo prolongado sobre altas temperaturas tenha sido prejudicial para esses compostos.

Figura 6 - Comparação do teor de fenólicos ($\mu\text{g}/1000\text{mL}$). T0 (tempo inicial do experimento). Amostras de suco de uva tinto integral (Uva tinto), amostras fermentadas (Fermentada) e fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros 69°C-30 min (Pasteurizada). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. ** comparam a amostra analisada com o suco de uva tinto integral ($p < 0,05$ Teste T de Student, não-pareado, bicaudal).



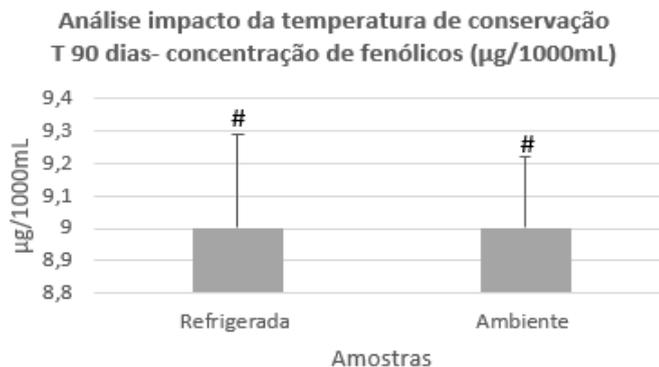
Na figura 7 é observado que, em exceção a amostra “Lata”, todas as amostras apresentaram uma redução significativa do teor de fenólicos, seguida de aumento significativo. A diminuição no teor destes compostos estaria relacionada com a participação destes compostos em reações químicas e/ou enzimáticas (GARCÍA, BIANCHI, 2015). O aumento significativo da concentração de fenólicos durante o processo de fermentação a literatura sugere que os metabólitos secundários se acumulam no meio da fermentação, usualmente durante a etapa seguinte ao crescimento microbiano, chamada de Idiofase (NIGAM, 2009). Seu acréscimo após a diminuição, no entanto, não foi encontrado evento semelhante na literatura pesquisada.

Figura 7 - Comparação do teor de fenólicos ($\mu\text{g}/1000\text{mL}$) durante o acompanhamento da estabilidade das amostras. T0 (inicial), T1 (30 dias), T2 (60 dias), T3 (90 dias). Amostras fermentadas (Fermentada), fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros $69^\circ\text{-}30\text{ min}$ (Pasteurizada 1), e sob os parâmetros $65^\circ\text{-}30\text{ min}$ (Pasteurizada 2) e pasteurizadas sob o segundo parâmetro acondicionada em lata (Lata). * compara a variação da mesma amostra em relação ao tempo anterior, *** compara a amostra analisada com o suco fermentado, **** compara a amostra analisada com o suco fermentado e pasteurizado sob os parâmetros 1, # compara os acondicionamentos, em garrafa de vidro e em lata de alumínio ($p < 0,05$ Teste t de Student, não-pareado, bicaudal).



A amostra mantida em temperatura ambiente revelou concentração idêntica a lata mantida refrigerada (Refrigerada = $9,0 \pm 0,29$; Ambiente = $9,0 \pm 0,22$).

Figura 8 - Comparação do teor de fenólicos ($\mu\text{g}/1000\text{mL}$). T3 (90 dias). Amostras fermentadas e posteriormente pasteurizadas sob os parâmetros $69^\circ\text{C-}30\text{ min}$ acondicionadas em lata de alumínio refrigeradas (Refrigeradas) e mantidas em temperatura ambiente (Ambiente). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média. # compara os acondicionamentos, em garrafa de vidro e em lata de alumínio ($p < 0,05$ Teste T de Student, não-pareado, bicaudal).



7. Conclusão e Perspectivas Futuras

Os resultados permitiram concluir que a pasteurização pode ser efetiva no atrasado da deterioração do suco de uva tinto integral fermentado com kefir, prolongando seu prazo de validade. As amostras pasteurizadas sob os parâmetros 1 (69°C-30min), mostrou comportamento adequado nos parâmetros físico-químicos, porém não houve crescimento microbiano, as amostras pasteurizadas sob os parâmetros 2 (65°C-30min) acondicionadas em lata não apresentou crescimento microbiano nem variação significativa nos parâmetros avaliados, revelando baixa atividade microbiana, sendo assim, as amostras pasteurizadas sob os parâmetros 2 (65°C-30min) acondicionadas em garrafa de vidro foi a que demonstrou melhores resultados, com contagem microbiológica crescente e degradação relativamente baixa. Contudo, é necessário o reajuste do processo para que uma quantidade viável de microorganismos permaneçam vivos e o teor alcóolico não ultrapasse a 0,5% até o final do tempo de validade.

8. Referências Bibliográficas

AKALIN, A. S.; FENDERYA, S.; AKBULUT, N. Viability and activity of bifidobacteria in yoghurt containing fructooligosaccharide during refrigerated storage. *International journal of food science & technology*, v. 39, n. 6, p. 613-621, 2004.

BASTOS, M. S. R. Leite longa vida UHT: Aspectos do processamento e identificação dos pontos críticos de controle. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 13, p. 32-36, 1999.

BERINGS, M. et al. Advances and highlights in allergen immunotherapy: on the way to sustained clinical and immunologic tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 140, n. 5, p. 1250-1267, 2017.

BOURRIE, B. C. T; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 647, 2016.

BRASIL. Constituição (1999). Resolução nº 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, constante do anexo desta portaria.. Resolução Nº 18, de 30 de Abril de 1999. Brasília , DF, Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-no-18-de-30-de-abril-de-1999.pdf/view>>. Acesso em: 19 fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 55, de 31 de outubro de 2008. Aprova os regulamentos técnicos para a fixação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas alcoólicas por mistura: licor, bebida alcoólica mista, batida, caipirinha, bebida alcoólica composta, aperitivo e aguardente composta. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 31 de out. 2008.

BRUNELLI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 17, n. 1, p. 19-27, 2014.

CHEN, C.; LIU, B. Y. Changes in major components of tea fungus metabolites during prolonged fermentation. *Journal of applied microbiology*, v. 89, n. 5, p. 834-839, 2000.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. *International Food Research Journal*, Selangor, v.15, n. 2, p. 219-232, 2008.

CORRÊA NETO, Randolpho da Silva; FARIA, José de Assis Fonseca. Fatores que influem na qualidade do suco de laranja. *Food Science and Technology*, v. 19, n. 1, p. 153-161, 1999.

DAMIÃO, B. G. S. Elaboração de bebida probiótica a partir de suco de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) fermentado com *Lactobacillus casei*. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

DUFRESNE, C.; FARNWORTH, E. Tea, Kombucha, and health: a review. *Food research international*, v. 33, n. 6, p. 409-421, 2000.

DUTRA, A. de S. et al. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenóides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 15, n. 3, p. 198-207, 2012.

FELLOWS, P. *Tecnología del procesado de los alimentos: principios y prácticas*. Zaragoza: Acribia, 549p.1994.

FONTANA, D. H. G. Elaboração de um modelo para o controle do processo de pasteurização em cerveja envazada (In-Package). 2009. Disponível em:

<<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/18596/000730351.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 19 fev de 2021.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, p. 365-378, 1989.

GARCÍA, L. R. P. et al. The effect of fungal fermentation in phenolics content in Robusta coffee husk. *Semina: Ciências Agrárias (Londrina)*, v. 36, n. 2, p. 777-785, 2015.

GAVA, A. J. *Princípios de Tecnologia de Alimentos*. 1ª edição. São Paulo: Nobel, 1998.

GRANATO, D. et al. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, v. 9, n. 5, p. 455-470, 2010.

GÜL, A.; EROĞUL, D.; ONGUN, A. R. Comparison of the use of zeolite and perlite as substrate for crisp-head lettuce. *Scientia Horticulturae*, v. 106, n. 4, p. 464-471, 2005.

GULITZ, A.; STADIE, J.; ENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, v.151, p. 284–288, 2011.

GUTIERREZ, C. C. G. C. Distribuição do tempo de residência em processo de pasteurização com trocador de calor a placas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2008.

HIDALGO, M. et al. Metabolism of anthocyanins by human gut microflora and their influence on gut bacterial growth. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 60, n. 15, p. 3882-3890, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. São Paulo: /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, 2008.

MACHADO, L. F.; RIZZATTO, M. L. Produção e análises físico-químicas de bebida probiótica de suco de maracujá. *Cogitare*, v. 2, n. 1, p. 50-69, 2019.

MAEDA, H. et al. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefir produced by *Lactobacillus kefirifaciens* WT-2BT. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 17, p. 5533-5538, 2004.

MASCARENHAS, M. QualiKefir: avaliação da qualidade físico-química e sensorial em produtos derivados de kefir, leite e iogurte líquido natural. 2012. Tese de Doutorado.

MOAYYEDI, P. et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut*, v. 59, n. 3, p. 325-332, 2010.

NASCIMENTO, R. L. et al. Aceitação de sucos elaborados a partir de uvas de diferentes variedades produzidas no Nordeste do Brasil. In: *Embrapa Semiárido-Artigo em anais de*

congresso (ALICE). In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 6., 2011, Petrolina. Anais... Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011., 2011.

NEVE, H.; HELLER, K. J. The microflora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, v. 54, n. 4, p. 337-349, 2002.

NIGAM, P. S. Production of bioactive secondary metabolites. In: NIGAM, P. S.; PANDEY, A. (Ed.). *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Northern Ireland: Springer, 2009. p. 129-145.

NITZKE, J.A. Agronegócio: panorama, perspectivas e influência do mercado de alimentos certificados. Curitiba: Appris, p. 11-23, 2012.

PAIVA, I. M de. Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de Kefir. 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-96DG2X/1/manuscrito_igor.pdf>. Acesso em: 24 de fev. de 2021.

PALUDO, N. Desenvolvimento e caracterização de kombucha obtida a partir de chá verde e extrato de erva-mate: processo artesanal e escala laboratorial. 2017. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/174899/001061869.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 20 de fev. de 2021.

PLAZA-DÍAZ, J. et al. Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients*, v. 10, n. 1, p. 42, 2018.

POUSSIER, B. et al. Resveratrol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and induces apoptosis. *Journal of vascular surgery*, v. 42, n. 6, p. 1190-1190. e14, 2005.

RATHER, I. A. et al. Probiotics and atopic dermatitis: an overview. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 507, 2016.

ROSA, D. D.; DIAS, M. M. S.; GRZEŚKOWIAK, L. M.; REIS, S. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; PELUZIO, M. C. G.. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, v. 30, p. 1–15, 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, v. 42, n. 1, p. 01-16.

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURUTI, F.C.A. Probióticos e Prebióticos em Alimentos: Aspectos tecnológicos, legislação e segurança no uso. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. *Probióticos e Prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas*. 1ª ed. São Paulo: Varela, 2011a. cap.1, p.23-50.

SÁEZ-LARA M. J.; ROBLES-SANCHEZ C; RUIZ-OJEDA F. J.; PLAZA-DIAZ J.; GILA. Effects of probiotics and synbiotics on obesity, insulin resistance syndrome, type 2 diabetes and non-alcoholic fatty liver disease: a review of human clinical trials. *Int J Mol Sci.*17:928, 2016.

SCHULKA, A.; COLLA, E.E. Alimentos funcionais e suas perspectivas para o mercado brasileiro. n30; pg 43. *Revista Food Ingredients.* 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, v. 299, p. 152-178, 1999.

TEOH, Ai Leng; HEARD, Gillian; COX, Julian. Yeast ecology of Kombucha fermentation. *International journal of food microbiology*, v. 95, n. 2, p. 119-126, 2004.

TRIBESS, T. B.; TADINI, C. C. Suco de laranja natural minimamente processado: uma alternativa para ampliar o mercado de suco de laranja no Brasil. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE ECONOMIA E GESTÃO DE NEGÓCIOS NETWORKS EM AGROINDÚSTRIAS. 2001. p. 159.

VILELA, A. The Importance of Yeasts on Fermentation Quality and Human HealthPromoting Compounds. *Fermentation*, v. 5, n. 46, 2019.

WALDHERR, F. W. et al. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. *Food Microbiology*, v. 27, n. 5, p. 672-678, 2010.

ZION MARKET RESEARCH. Mercado de Kombucha foi estimado em cerca de US\$ 2457 bilhões a partir de 2022. Disponível em: <<https://icrowdpt.com/2018/01/31/mercado-de-kombucha-foi-estimado-em-cerca-de-us-2457-bilhoes-a-partir-de-2022/>>. Acesso em: 14 de fev. de 2019.