

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS

Juliane Duarte Silva Ayupp

**Desenvolvimento de bebida carbonatada de kefir à base de soro de leite
permeado de ultrafiltração**

Juiz de Fora
2022

Juliane Duarte Silva Ayupp

**Desenvolvimento de bebida carbonatada de kefir à base de soro de leite
permeado de ultrafiltração**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Orientador: Dr. Junio César Jacinto de Paula

Coorientadores: Dr. Humberto Moreira Húngaro;
Dra. Renata Golin Bueno Costa

Juiz de Fora
2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ayupp, Juliene Duarte Silva .

Desenvolvimento de bebida carbonatada de kefir à base de soro de leite permeado de ultrafiltração / Juliene Duarte Silva Ayupp. -- 2022.

62 p.

Orientador: Junio César Jacinto de Paula

Coorientadores: Humberto Moreira Húngaro , Renata Golin Bueno Costa

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2022.

1. Tecnologia de Membrana. 2. Aproveitamento. 3. Soro de Ultrafiltração. I. Paula, Junio César Jacinto de , orient. II. Húngaro , Humberto Moreira , coorient. III. Costa, Renata Golin Bueno , coorient. IV. Título.

Juliane Duarte Silva Ayupp

Desenvolvimento de bebida carbonatada de Kefir à base de soro de leite permeado de ultrafiltração

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados. Área de concentração: Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados.

Aprovada em 25 de fevereiro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Junio César Jacinto de Paula - Orientador
EPAMIG/ILCT

Prof. Dr. Humberto Moreira Húngaro - Coorientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Renata Golin Bueno Costa - Coorientadora
EPAMIG/ILCT

Profa. Dra. Denise Sobral

EPAMIG/ILCT

Profa. Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira

EPAMIG/ILCT

Juiz de Fora, 15/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Denise Sobral, Usuário Externo**, em 21/03/2022, às 13:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **GISELA DE MAGALHAES MACHADO MOREIRA, Usuário Externo**, em 21/03/2022, às 13:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Junio Cesar J. de Paula, Usuário Externo**, em 21/03/2022, às 13:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Moreira Hungaro, Professor(a)**, em 21/03/2022, às 16:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Golin Bueno Costa, Usuário Externo**, em 22/03/2022, às 08:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0680516** e o código CRC **469DEA04**.

Dedico este trabalho aos meus amados filhos e ao meu esposo. Luisa e Vicente, por serem a força e a inspiração constante em minha vida e por terem aceitado minha ausência. Espero, de agora em diante, compensá-los das horas de atenção e brincadeiras que lhes devo. Vocês são o meu grande estímulo. É por vocês a minha luta e é para vocês a minha vitória. Felipe, por ser meu companheiro de sonhos, pelo amor e apoio incondicional, por me incentivar a cada dia ser melhor e por nunca me deixar desistir de nada. Agradeço a enorme compreensão, generosidade e alegria com que me brindou constantemente, contribuindo para chegar ao fim deste percurso.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo, principalmente por me conceder saúde e sabedoria, sendo minha força e meu guia em todos os momentos. E à Nossa Senhora, por guiar meus caminhos e passar à frente de todas as minhas dificuldades.

À minha mãe, pela educação e exemplo de mulher batalhadora e ao meu irmão, pela amizade e incentivo incondicional.

Ao meu orientador, professor e pesquisador Dr. Junio César Jacinto de Paula, por ter acreditado em mim, pela sua orientação e dedicação durante o desenvolvimento desta pesquisa. Eu não chegaria até aqui sem o seu apoio e compreensão.

Aos meus coorientadores, professor Dr. Humberto Moreira Húngaro e professora Dra. Renata Golin Bueno Costa, pelas orientações adicionais e valiosas contribuições durante o projeto.

À UFJF pela oportunidade de desenvolver este trabalho no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados (parceria EPAMIG, EMBRAPA e UFJF).

À EPAMIG ILCT pela utilização das instalações industriais, laboratórios, equipamentos, aos professores e funcionários pela atuação na execução do projeto. Aos funcionários e alunos bolsistas por todo apoio prestado nos laboratórios da EPAMIG ILCT. Em especial, agradeço às professoras Dra. Gisela, Dra. Vanessa e Dra. Elisângela, por terem me orientado na realização das análises microbiológicas e físico-químicas.

Aos funcionários e alunos bolsistas do Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFJF que contribuíram para a execução das análises laboratoriais, em especial ao Prof. Dr. Humberto, pela disponibilização do laboratório e por ter me direcionado na condução das análises microbiológicas.

Aos professores do mestrado, os quais admiro pela competência. Aos amigos de curso, pelas agradáveis horas de estudo e momentos de alegria compartilhados.

À todas as pessoas e instituições que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho e fizeram parte da minha formação.

Muito obrigada!

RESUMO

O permeado de ultrafiltração de leite é uma solução composta principalmente de lactose, sais, nitrogênio não proteico, vitaminas e água. Ele é amplamente gerado pela indústria de laticínios devido a utilização dos processos de filtração por membranas. A ultrafiltração vem sendo utilizada para concentrar proteínas do leite e do soro de leite, a fim de produzir produtos com maior teor de proteínas. Invariavelmente o permeado é tratado como resíduo, podendo gerar danos ambientais e custos para a indústria. Logo, o desenvolvimento de novas aplicações para este coproduto torna-se importante. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de elaboração de bebida fermentada por microrganismos dos grãos de kefir e carbonatada utilizando o soro permeado de ultrafiltração. Foi elaborada bebida à base do permeado de ultrafiltração, pasteurizada, fermentada por grãos de kefir, carbonatada e adicionada de aroma natural de limão. A bebida apresentou composição de 0% (m/m) de gordura, 0,12% (m/m) de proteína, 0,49% (m/m) de resíduo mineral fixo e 90,09% (m/m) de água. O pH do produto variou entre 3,42 e 3,47 e a acidez titulável variou entre 0,77 e 0,95 g de ácido láctico por 100 mL, os quais mantiveram-se estáveis durante 34 dias de armazenamento sob refrigeração. A análise instrumental de cor da bebida indicou que ela apresentou cor clara amarela-esverdeada. Quanto à qualidade microbiológica, nenhuma das amostras apresentou contagens de coliformes a 30 ou 45°C, atendendo aos critérios estabelecidos pela legislação. As contagens de aeróbios mesófilos encontraram-se com valores acima dos determinados pela legislação para bebidas lácteas. A contagem de bolores e leveduras ficaram entre 5,77 e 6,87 Log UFC/mL. As contagens de bactérias ácido-láticas variaram entre 6,39 e 7,02 Log UFC/mL, e permaneceram viáveis e ativas e na mesma concentração durante todo o período de armazenamento. O produto apresentou boa aceitação sensorial durante o período de armazenamento, com notas acima de 7 na Escala Hedônica de nove pontos. Assim, o aproveitamento do permeado de ultrafiltração para produção de bebida carbonatada e fermentada por grãos de kefir mostrou-se viável.

Palavras-chave: Tecnologia de Membrana. Aproveitamento. Soro de Ultrafiltração.

ABSTRACT

Milk ultrafiltration permeate is a solution composed mainly of lactose, salts, non-protein nitrogen, vitamins and water. It is widely generated by the dairy industry due to the use of membrane filtration processes. Ultrafiltration has been used to concentrate milk and whey proteins in order to produce products with a higher protein content. Invariably, the permeate is treated as waste, which can generate environmental damage and costs for the industry. Therefore, the development of new applications for this co-product becomes important. The objective of this study was to evaluate the feasibility of elaborating a fermented beverage by microorganisms from kefir and carbonated grains using ultrafiltration permeated whey. Beverages based on ultrafiltration permeate were prepared, pasteurized, fermented with kefir grains, carbonated and added with natural lemon aroma. The beverage presented a composition of 0% (m/m) of fat, 0.12% (m/m) of protein, 0.49% (m/m) of fixed mineral residue and 90.09% (m/m) of water. The pH of the product varied between 3.42 and 3.47 and the titratable acidity varied between 0.77 and 0.95 g of lactic acid per 100 mL, remaining stable during the 34 days of storage under refrigeration. The beverage color analysis indicated that it presented a light yellow-green color. As for microbiological quality, none of the samples showed coliform counts at 30 or 45 °C, meeting the criteria established by legislation. The counts of mesophilic aerobic bacteria are above those determined by legislation for dairy beverages. The mold and yeast count was between 5.77 and 6.87 Log CFU/mL. The lactic acid bacteria counts ranged from 6.39 to 7.02 Log CFU/mL, and remained viable and active at the same concentration throughout the storage period. The product showed good sensory acceptance during the storage period, with scores above 7 on the nine-point Hedonic Scale. Thus, the use of ultrafiltration permeate for the production of carbonated beverage, fermented with kefir grains, proved to be viable.

Keywords: Membrane Technology. Use. Ultrafiltration Serum.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1	SORO PERMEADO DE ULTRAFILTRAÇÃO.....	14
3.2	APROVEITAMENTO DO SORO PERMEADO DE ULTRAFILTRAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS.....	16
3.3	ALIMENTOS FUNCIONAIS E PROBIÓTICOS.....	20
3.3.1	Legislação brasileira para alimentos com alegação de propriedades funcionais	21
3.3.2	Microrganismos probióticos	22
3.3.3	Benefícios do consumo de alimentos probióticos para a saúde	25
3.4	KEFIR.....	25
3.4.1	Histórico e definições	25
3.4.2	Características dos grãos	26
3.4.3	Composição microbiológica	29
3.4.4	Consumo mundial	31
3.4.5	Benefícios de consumo de kefir para a saúde	31
3.5	CARBONATAÇÃO.....	34
3.5.1	Tecnologia de carbonatação aplicada em produtos lácteos	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	ENSAIOS PRELIMINARES.....	39
4.1.1	Obtenção do permeado de ultrafiltração	39
4.1.2	Elaboração de bebida à base de soro de queijo	40
4.1.3	Elaboração de bebida à base de soro de queijo parmesão fermentada com grãos de kefir	41
4.1.4	Elaboração de bebida à base de permeado de ultrafiltração	42
4.1.5	Método eleito para elaboração da bebida fermentada de kefir à base de permeado de ultrafiltração	48
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	51
4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	52

4.4	ANÁLISE DE COR.....	53
4.5	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	53
4.6	ANÁLISE SENSORIAL.....	54
4.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	54
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE, DO PERMEADO DE ULTRAFILTRAÇÃO E DA BEBIDA ELABORADA.....	56
5.2	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DURANTE A ESTOCAGEM.....	58
5.3	ANÁLISE DE COR.....	59
5.4	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA.....	60
5.5	ANÁLISE SENSORIAL.....	63
6	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

O permeado de ultrafiltração é uma solução de sabor salgado composta principalmente de lactose, sais, nitrogênio não proteico e água (CHEN et al., 2019; PARASHAR et al., 2015). Ele apresenta uma coloração amarelo-esverdeada em função do pigmento riboflavina, uma vitamina (B2) hidrossolúvel (FONTES et al., 2015). O permeado é produzido através do processo de ultrafiltração, realizado através de membranas que separam os componentes com base no tamanho molecular. Moléculas grandes são geralmente retidas na membrana e denominadas retentado, enquanto moléculas pequenas, como açúcares, minerais e vitaminas, passam através da membrana junto do solvente, que é denominado permeado (AHMAD e AHMED, 2014; KELLY, 2011; PRUKSASRI, 2015).

A ultrafiltração é amplamente utilizada nas indústrias de alimentos. Nos laticínios, a ultrafiltração vem sendo utilizada para concentrar proteínas do leite e do soro de leite, a fim de produzir produtos com alto teor de proteínas, como concentrado de proteína do leite, concentrado de proteína de soro de leite e isolado de proteína de soro de leite (ETZEL e ARUNKUMAR, 2015; MOHAMMAD, et al., 2012). Devido este processo tem-se gerado o permeado, que invariavelmente é descartado como resíduo (PARASHAR et al., 2015). Sua eliminação usualmente demanda extensos pré-tratamentos e, portanto, contribui para elevação dos custos operacionais da indústria (FONTES et al., 2015; PARASHAR et al., 2015).

Assim, o desenvolvimento de novas aplicações para este coproduto torna-se importante, tanto no ponto de vista nutricional como ambiental. O permeado de soro de ultrafiltração é uma solução que possui em sua composição lactose, sais, nitrogênio não proteico, vitaminas e água (CHEN et al., 2019). Essas características permitem sua utilização como ingrediente de bebidas hidroeletrólíticas, além de suas características osmolíticas (FERREIRA, 2017). Vários estudos têm sido desenvolvidos utilizando o permeado como matéria-prima base para elaboração de bebidas, inclusive adicionadas de extratos de frutas a fim de torná-las funcionais, e com boa aceitação pelos consumidores nos testes (FERREIRA, 2017; FONTES et al., 2015; SABIONI et al., 2016; PEREIRA et al., 2015). A produção de uma bebida fermentada por grãos kefir segue esta linha de pesquisa.

Os grãos kefir consistem em uma massa gelatinosa e irregular, branca ou levemente amarela, com uma textura firme (GARROTE et al., 2001). A composição

dos grãos inclui *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter* e leveduras (BRASIL, 2007). Durante o processo de fermentação os microrganismos constituintes dos grãos de kefir produzem uma série de metabólitos (KESENCAŞ et al., 2017). A maioria desses metabólitos são bioativos conferindo aos produtos fermentados pelos grãos de kefir propriedades funcionais (FARAG et al., 2020; KESENCAŞ et al., 2017).

Portanto, o desenvolvimento de produtos que tragam benefícios à saúde dos consumidores e que utilizem como matéria-prima coprodutos da indústria de laticínios, que seriam descartados gerando prejuízos ambientais e custos à indústria, tornam-se fundamentais para o setor. Logo, este estudo teve como objetivo desenvolver uma bebida carbonatada fermentada por kefir à base de soro de leite permeado de ultrafiltração.

2 OBJETIVOS

Avaliar o desenvolvimento de uma bebida carbonatada fermentada por kefir à base de soro de leite permeado de ultrafiltração.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Definir o processo de fabricação para implantação nas indústrias, buscando o aproveitamento do soro permeado de ultrafiltração e dos equipamentos já disponíveis;
- 2) Caracterizar a formulação da bebida com relação às propriedades físico-químicas, microbiológicas e cor instrumental;
- 3) Verificar a aceitação sensorial da bebida desenvolvida;
- 4) Avaliar a estabilidade em relação ao pH e acidez da bebida durante o período de estocagem, a fim de definir o prazo de validade sob refrigeração;
- 5) Avaliar o uso dos grãos de kefir como cultura iniciadora para a produção de bebida fermentada a partir de permeado de ultrafiltração.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Foi realizada uma revisão de literatura abordando temas de interesse para o embasamento e desenvolvimento do trabalho.

3.1 SORO PERMEADO DE ULTRAFILTRAÇÃO

A ultrafiltração é um processo de filtração por membrana que separa os componentes com base na peneiração molecular. As moléculas que não passam através da membrana denominam-se retentado e as que passam, permeado. O processo de ultrafiltração é usado para fracionar os solutos em uma solução com base no tamanho ou diferença de peso molecular. Moléculas grandes são geralmente retidas na membrana e denominadas retentado ou concentrado, enquanto moléculas pequenas, como açúcares, minerais e vitaminas, passam através da membrana junto do solvente e é denominado permeado (AHMAD; AHMED, 2014; KELLY, 2011; PRUKSASRI, 2015).

A força motriz para o transporte de solutos através da membrana é o gradiente de pressão entre os lados opostos da membrana. Pressões operacionais nos processos de ultrafiltração podem variar na faixa de 2 a 10 bar. O tamanho dos poros das membranas de ultrafiltração podem variar entre 0,001 e 0,2 μm (PRUKSASRI, 2015). As membranas de ultrafiltração são especificadas através da sua massa molar de corte (MMC). A MMC corresponde à massa molar das moléculas que a membrana é capaz de reter, com uma taxa de retenção de 90% ou mais (ALVES *et al.*, 2014).

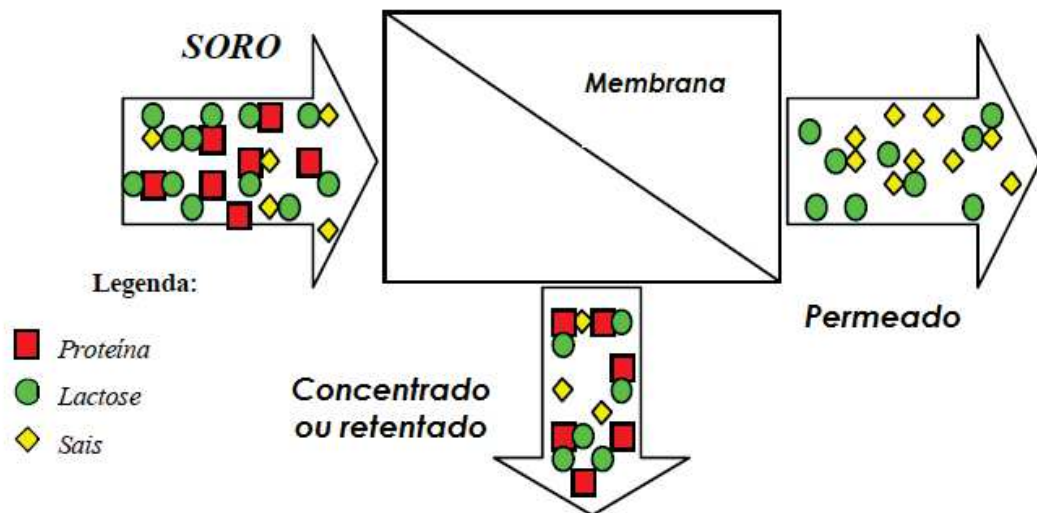
As membranas de ultrafiltração são barreiras permeáveis ou semipermeáveis, e podem ser constituídas por polímeros ou materiais inorgânicos (FAEDO *et al.*, 2013; KELLY, 2011). Uma grande variedade de polímeros pode ser utilizada, sendo mais frequente uma camada ativa de polissulfona microporosa ou de polietersulfona depositado em um suporte de polissulfona. Já dentre os materiais inorgânicos, encontram-se o óxido de zircônio e alumina (KELLY, 2011; MOHAMMAD *et al.*, 2012).

A ultrafiltração é amplamente utilizada nas indústrias alimentícias com a finalidade de clarear soluções e concentrar e/ou fracionar solutos (PRUKSASRI, 2015). Na indústria de laticínios a ultrafiltração vem sendo utilizada para concentrar

proteínas do leite e do soro de leite, a fim de produzir produtos ricos em proteínas, como concentrado de proteína do leite, concentrado de proteína de soro de leite e isolado de proteína de soro de leite (ETZEL; ARUNKUMAR, 2015; MOHAMMAD, *et al.*, 2012).

No processo de ultrafiltração do soro de leite o material macromolecular, como proteínas e gorduras, é retido pela membrana enquanto solutos com menor peso molecular, como lactose, minerais, nitrogênio não proteico, vitaminas hidrossolúveis e água, permeiam a membrana (Figura 1) (ETZEL; ARUNKUMAR, 2015; KELLY, 2011, PARASHAR *et al.*, 2015).

Figura 1 – Esquema do processo de ultrafiltração do soro de leite.



Fonte: Adaptado de BALDASSO (2008).

A permeabilidade seletiva das membranas de ultrafiltração permite uma variação na proporção de concentração dos componentes do soro de leite e o permeado (Tabela 1). A retenção das proteínas e a passagem somente de compostos de baixo peso molecular, permitem a concentração (retentado) e fracionamento dos componentes do soro (BALDASSO *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Composição média do permeado de soro de leite de vaca.

Componente	% (m/v)	Componente	mg/L
Água	95,34 ± 0,55	Sódio	460,99 ± 15,10
Nitrogênio total	0,020 ± 0,005	Potássio	1144,75 ± 96,05
Cinzas	0,38 ± 0,10	Cálcio	506,11 ± 11,58
Carboidratos totais	4,04 ± 0,54	Magnésio	159,72 ± 50,19

Fonte: SABIONI *et al.* (2016).

O permeado de soro é uma solução de sabor salgado composta principalmente de lactose, sais, nitrogênio não proteico e água (CHEN *et al.*, 2019; PARASHAR *et al.*, 2015). Ele apresenta uma coloração amarelo-esverdeada em função do pigmento riboflavina, uma vitamina (B2) hidrossolúvel presente no leite que se mantém no permeado de soro. Além da riboflavina, outras vitaminas hidrossolúveis do complexo B como B3, B5 e B7 também se encontram no permeado (FONTES *et al.*, 2015).

Os sais encontrados no permeado de soro conferem a esta solução características eletrolíticas (FONTES *et al.*, 2015). O cálcio é um mineral importante para formação e manutenção de ossos e dentes, assim como para o processo de contração muscular. Sódio e potássio contribuem para o equilíbrio hídrico corporal e o magnésio destaca-se pela sua importância nos processos intracelulares como síntese proteica e ativação enzimática (FONTES *et al.*, 2015; SABIONI *et al.*, 2016).

A utilização do permeado de soro pela indústria ainda não é muito explorada (SABIONI *et al.*, 2016). Algumas das práticas utilizadas pela indústria de laticínios incluem o descarte deste coproduto como resíduo, venda de pó de permeado seco e incorporação na alimentação animal (PARASHAR *et al.*, 2015). O seu descarte como resíduo consiste em um grande problema para indústria uma vez que possui alto potencial poluente. Sua eliminação usualmente demanda extensos pré-tratamentos e, portanto, contribui para elevação dos custos operacionais da indústria (FONTES *et al.*, 2015; PARASHAR *et al.*, 2015). Assim o desenvolvimento de novas aplicações para este coproduto torna-se relevante.

3.2 APROVEITAMENTO DO SORO PERMEADO DE ULTRAFILTRAÇÃO E SUA UTILIZAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS

O permeado de soro de ultrafiltração é uma solução rica em lactose (CHEN *et al.*, 2019). Esse fato tem motivado a sua utilização como fonte de lactose e tem sido implementada por alguns laticínios (PARASHAR *et al.*, 2015). A lactose é um importante ingrediente de fórmulas infantis e no processamento de alimentos. Para recuperar a lactose presente no permeado de soro de ultrafiltração torna-se necessário à sua desidratação e desmineralização. A concentração do permeado é feita em evaporadores, a lactose é cristalizada a partir do concentrado e separada, dando origem à lactose em pó. O permeado de soro pode ser desmineralizado antes da desidratação, através de nanofiltração, para remoção dos sais minerais e aumento da concentração de lactose (CHEN *et al.*, 2019).

Em estudo feito por Massari (2018) o permeado de soro em pó micronizado foi utilizado em substituição à lactose micronizada na fabricação de leite condensado. A lactose micronizada é utilizada a fim de induzir a cristalização orientada. A utilização do permeado de soro em pó micronizado permitiu a cristalização orientada não afetando as características físico-químicas, microbiológicas, sensoriais e reológicas do leite condensado. Logo a sua utilização mostrou-se uma boa alternativa para o emprego do permeado de soro. Outra alternativa para uso da lactose do permeado de soro é a produção de biocombustível. O permeado pode ser utilizado como substrato para fermentação por cepas produtoras de etanol (PARASHAR *et al.*, 2015; VIGNAGA, 2017).

Em estudo feito por Barile *et al.* (2009) a constituição de oligossacarídeos do permeado de soro foi determinada. Observou-se que ele apresenta uma grande variedade de oligossacarídeos neutros e sialilados. Dos quatorze oligossacarídeos identificados, sete apresentaram a mesma composição dos oligossacarídeos presentes no leite humano. Assim, o permeado de soro também pode ser utilizado como fonte de oligossacarídeos para suplementação de fórmulas infantis e nutrição humana.

Muitas empresas alimentícias têm buscado a redução do teor de sódio em seus produtos. O permeado de soro de ultrafiltração tem sido sugerido como um potencial substituto do sal (FRANKOWSKI *et al.*, 2014; SMITH *et al.*, 2016). No estudo realizado por Frankowski *et al.* (2014) foi determinado a composição do permeado de ultrafiltração avaliando-se quais componentes além do sódio contribuem para o sabor salgado. Ácidos orgânicos, nucleotídeos, nitrogênio não proteico (NNP), aldeídos (compostos voláteis) e cloreto de potássio (KCl) foram

identificados. Os ácidos orgânicos com as maiores concentrações em todos os permeados foram ácidos láctico e cítrico, em menor concentração foram detectados ácidos orótico, úrico e hipúrico. O potássio foi o mineral mais abundante encontrado nos permeados. De acordo com os autores, ácidos orgânicos, nucleotídeos e NNP também são usados para melhorar sabor e podem ser estimulantes do sabor salgado. No seu estudo os componentes do permeado de soro de ultrafiltração que apresentaram correlação com a intensidade do sabor salgado foram cloreto de potássio (KCl), ácido láctico, ácido cítrico, ácido orótico e nitrogênio não protéico (NNP). Os permeados provocaram uma maior resposta ao sabor salgado que a mesma concentração de cloreto de sódio (NaCl) isoladamente, indicando que seus outros componentes contribuem para o sabor salgado.

Smith *et al.* (2016) avaliaram o uso de permeados de ultrafiltração, oriundos de diferentes fontes de fabricação, como substituto do sal em sopas. Eles verificaram que todos os permeados aumentaram o sabor salgado das sopas. Os permeados com maior concentração de ácido láctico e com teores de lactose reduzidos conferiram alto sabor salgado em comparação aos outros. Além disso, os permeados também conferiram alguns sabores específicos como sabor azedo, cozido, de batata e de papelão. Assim, os autores ressaltam que a origem do permeado deva ser levada em consideração, bem como, o produto a ser adicionado do permeado.

O permeado de soro também pode ser utilizado como substituto de outros sólidos lácteos funcionando como fonte de lactose e proteínas em misturas e produtos de panificação. A sua utilização pode conferir crosta marrom aos produtos de panificação, melhorando a aparência, cor, sabor e textura do produto final. Sua aplicação também pode auxiliar na redução da quantidade de açúcar, como sacarose e xarope de milho, utilizados nos produtos panificados (GERDES; RICHLANDTOWN, 2011).

A presença de carboidratos, minerais e vitaminas no permeado de soro de ultrafiltração e suas características osmolíticas também têm estimulado pesquisas para sua utilização como ingrediente de bebidas hidroeletrólíticas (FERREIRA, 2017). Segundo a resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), suplemento hidroeletrólítico é definido como um produto com a finalidade de ajudar na hidratação de atletas. Ela estabelece ainda que os suplementos hidroeletrólíticos sejam compostos por sódio (460 e 1150 mg/L)

e carboidratos (até 8% m/v) podendo ser adicionados de potássio (até 700 mg/L), vitaminas e minerais. No que tange à osmolalidade eles são categorizados em isotônicos e hipotônicos, devendo apresentar osmolalidade entre 270 e 330 mOsm/kg água e abaixo de 270 mOsm/kg água, respectivamente (BRASIL, 2010).

Em estudo realizado por Fontes *et al.* (2015) o permeado de soro foi utilizado para o desenvolvimento de uma bebida eletrolítica. Os autores adicionaram sacarose, ácido cítrico, benzoato de sódio, sorbato de potássio e aroma artificial de limão ao permeado. A bebida manteve a estabilidade microbiologicamente e de osmolalidade (290 mOsm/kg a 330mOsm/kg) durante o período de armazenamento, assim como conservou suas características físico-químicas se enquadrando como repositores eletrolíticos.

Ferreira (2017) utilizou o permeado de ultrafiltração de soro para elaborar uma bebida isotônica adicionada de carotenoides em pó de pequi. A bebida se manteve estável durante o período de armazenamento e apresentou aceitação pelos consumidores avaliados no estudo. A bebida desenvolvida além de ser isotônica, se enquadrando como repositores hidroeletrólitos, também apresentava características bioativas pela presença de carotenoides.

Sabioni *et al.* (2016) aproveitaram o permeado de soro de ultrafiltração para elaboração de bebida funcional, utilizando corantes naturais extraídos do açaí. A bebida além de ser uma fonte de carboidratos e sais minerais, constituintes do permeado, também se mostrou fonte de antocianinas e polifenóis. Esses compostos conferiram a bebida propriedades bioativas, possibilitando a sua classificação como alimento funcional. Pereira *et al.* (2015) utilizou o permeado de ultrafiltração para elaboração de bebida fermentada a partir da inoculação de grãos de kefir e/ou bactérias probióticas comerciais. Ao permeado foi adicionado polpa de fruta, sacarose e flavorizante, aquecidos a 25 °C e adicionados de inóculos para fermentação. Os inóculos consistiram em grãos de kefir, fermento comercial contendo bactérias probióticas (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactocaseibacillus casei* e *Lactocaseibacillus rhamnosus*) e uma mistura na proporção 1:1 de grãos de kefir e fermento. As contagens de *Lactococcus* e *Lactobacillus* ficaram acima de 7 log UFC/mL em todas as bebidas e acima de 6 log UFC/mL nas fermentadas com kefir e kefir mais fermento. As maiores contagens foram observadas nas bebidas fermentadas com a mistura de grãos de kefir e fermento comercial. Após quatorze dias de armazenamento as contagens microbianas de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e

leveduras ainda permaneceram viáveis. Os resultados obtidos pelos autores permitiram o enquadramento da bebida fermentada produzida como produto probiótico, de acordo com os padrões exigidos pela *Food and Drug Administration* (FDA).

3.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS E PROBIÓTICOS

A noção de que os alimentos poderiam ter a capacidade de prevenir doenças e ser usado como forma de tratamento surgiu há 2.500 anos, quando Hipócrates declarou “faça do seu alimento seu medicamento”. Assim sendo, os alimentos funcionais sempre estiveram presentes na história humana, porém, apenas recentemente receberam esta denominação (EVANGELISTA, 2005). Segundo CARNEIRO (2010) o pesquisador Metchnikoff, no início do século XX, deu origem a “teoria da longevidade” que pressupunha que o consumo de leite fermentado eliminava bactérias ruins do intestino e por isso alongava a vida de seus consumidores assíduos.

Vários fatores têm contribuído para o desenvolvimento dos alimentos com alegação de propriedades funcionais. Um deles é o aumento da consciência dos consumidores que, desejando melhorar a qualidade de vida, optam por hábitos mais saudáveis. Para auxiliarem na prevenção de doenças e possivelmente na melhora de quadros crônicos, os alimentos funcionais devem ser consumidos com maior frequência (MORAES; COLLA, 2006; MAGNONI *et al.*, 2010).

Alimento funcional é definido como aquele que promove benefícios à saúde além de cumprir com a função de nutrir o indivíduo. Esses alimentos atuam no organismo auxiliando na prevenção de doenças, como cardiopatias, neoplasias, hipertensão, entre outras (CARNEIRO, 2010). Há um grande aumento no consumo dos alimentos funcionais os quais, além de apresentarem características nutricionais e tecnológicas peculiares, atendem as exigências do consumidor que busca por alimentos inovadores (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013). Nesse aspecto, as indústrias de laticínios têm buscado o desenvolvimento de produtos alimentícios com propriedades funcionais, que além de nutritivos ofereçam benefícios para a saúde (CARNEIRO, 2010). A fabricação de um maior número de produtos funcionais, por meio da adição de probióticos e prebióticos em alimentos como o iogurte e os leites fermentados tem se destacado (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013).

Stanton (2003) afirma que os alimentos mais comuns veiculados com probióticos são os leites fermentados e os produtos infantis. Araújo (2007) cita, ainda, que os produtos lácteos probióticos são a alternativa tecnológica que melhor atende ao consumidor, já que estes buscam produtos inovadores, diferenciados e benéficos para a promoção da saúde e bem-estar. Segundo Roberfroid (2002), outro fator importante para a tecnologia de produção de derivados lácteos com probióticos é a seleção de cepas que desempenhe um bom funcionamento em humanos e simultaneamente sejam tecnologicamente adequadas.

3.3.1 Legislação brasileira para alimentos com alegação de propriedades funcionais

No Brasil, as regras para alimentos funcionais foram instituídas a partir de 1999 através da portaria nº 398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define alimento com alegação de propriedade funcional como aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguros para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999a).

A ANVISA também estabelece que a afirmação de tais benefícios deve ser mediante a demonstração da eficácia. Entretanto, para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não é necessária demonstração de eficácia para alegação de propriedade funcional (BRASIL, 1999).

Em 1999, a ANVISA, publicou duas resoluções relacionadas aos alimentos funcionais:

- Resolução nº18, de 30/04/1999 (republicada em 03/12/1999): 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 (BRASIL, 1999b).
- Resolução nº19, de 30/04/1999 (republicada em 10/12/1999): aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999c).

Com relação às bactérias probióticas, a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que dispõe sobre o regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, cita que, dentre as bactérias lácticas que podem ser usadas no preparo de leites fermentados encontram-se as probióticas. Sendo elas definidas como microrganismos vivos, que administrados em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do hospedeiro, promovendo balanço da microbiota intestinal. E o seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. Ainda, segundo a IN 46, para ser considerado probiótico, o produto deve conter uma quantidade mínima viável desses microrganismos, que está na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g na recomendação diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2007).

Outro fator importante, para que um produto seja considerado probiótico, é que o alimento deve conter uma ou mais cepas bem definidas, uma vez que os efeitos probióticos são específicos para determinadas cepas em especial. Assim sendo, a validação da função probiótica ou o monitoramento do impacto probiótico de uma preparação de microrganismos com composição desconhecida é cientificamente inaceitável (SANDERS, 2003).

3.3.2 Microrganismos probióticos

Atualmente, a definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a preconizada pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo a FAO/OMS (2002), probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinadas quantidades podem trazer benefícios à saúde do indivíduo.

Embora o número de microrganismos que devam ser ingeridos para que se possa obter as propriedades funcionais ainda não seja especificamente determinado, vários autores especulam alguns valores. Ouwehand *et al.* (2002) sugerem 10^9 UFC/dia e Farnworth (2008) 10^7 UFC/g ou UFC/mL. Farnworth (2008) salienta a importância da quantidade ingerida pois, os microrganismos passaram pelo efeito diluição e terão que enfrentar o ambiente intestinal com pH baixo e enzimas digestivas. A quantidade ingerida garantirá que uma parcela significativa de

microrganismos permaneça viável e possa atuar no trato gastrointestinal, proporcionando benefícios. Segundo ANVISA (2007), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

As bactérias pertencentes ao grupo dos microrganismos probióticos possuem a particularidade de tolerância a ácido e bile, o que possibilita a sobrevivência ao trato intestinal, proporcionando o controle da microbiota intestinal e mantendo a saúde. *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. são exemplos de bactérias que possuem este perfil (CARNEIRO, 2010). As espécies probióticas mais utilizadas são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (FAO/OMS, 2001), mas não exclusivamente (Tabela 2). No Brasil, cultivos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lacticaseibacillus casei* Shirota, *Lacticaseibacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lacticaseibacillus casei* variedade *defensis*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* são considerados probióticos (BRASIL, 2007).

Tabela 2 - Exemplos de microrganismos probióticos de leites fermentados.

Gênero	Espécie
	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. casei</i> linhagens Shirota, Imunitass, NCC 208
	<i>L. rhamnosus</i> GG
	<i>L. johnsonii</i>
	<i>L. helveticus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
	<i>L. gasseri</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> e ssp. <i>tolerans</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. brevis</i>
	<i>L. cellobiosus</i>
	<i>L. lactis</i>
	<i>L. fermentum</i>
	<i>L. curvatus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. animalis</i>
	<i>B. thermophilum</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> e <i>S. cerevisiae</i>

Fonte: TAMINE (2002); PARVEZ (2006).

Para a garantia de funcionalidade das bactérias probióticas, algumas características devem ser observadas. A tolerância ao suco gástrico e à bile (BRASIL, 2007), aderência e persistência no trato gastrointestinal humano, atividade antagonista contra os agentes patogênicos (FAO/OMS, 2002), como *Helicobacter pylori*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile* entre outras (SAARELA *et al.*, 2000). Do mesmo modo que, ter histórico de não patogenicidade, não estar associadas a outras doenças e não possuir genes determinantes da resistência aos antibióticos (SAARELA *et al.*, 2000).

De acordo com Parvez *et al.* (2006), os critérios de seleção das bactérias ácido lácticas incluem produzirem efeitos benéficos para o hospedeiro; se adaptarem ao alimento e permanecerem viáveis durante o período de validade do produto; resistir às condições do trato gastrointestinal; capacidade de colonização e produção de substâncias que inibam o crescimento de bactérias patogênicas. Além disso,

segundo Ouwehand *et al.* (2002) definem que elas precisam ser fáceis de cultivar, tolerarem a presença de aditivos químicos e contribuam para as propriedades sensoriais dos produtos.

3.3.3 Benefícios do consumo de alimentos probióticos para a saúde

Os benefícios dos alimentos probióticos para a saúde do ser humano incluem síntese de vitaminas, aminoácidos, inibição de bactérias patogênicas intestinais, melhora da imunidade, redução da atividade de *Helicobacter pylori*, dentre outras (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013). Os produtos lácteos adicionados de microrganismos probióticos desempenham importantes funções nos sistemas imunológico, digestivo e respiratório de crianças. Eles auxiliam na prevenção e tratamento de diarreias e modulam respostas imunes a alérgenos (JARDIM, 2012).

Outros benefícios dos probióticos incluem melhora da digestão da lactose com redução ou eliminação de sintomas associados à intolerância à lactose, prevenção de neoplasias devido a sua capacidade de reduzir a genotoxicidade de alguns compostos químicos (VASILJEVIC; SHAH, 2008), redução do colesterol sérico associado a capacidade de desconjugar os sais biliares em função da produção de enzimas (hidrolases) (MOMBELLI; GISMONDO, 2000) e capacidade de prevenir doenças intestinais inflamatórias (doença de Crohn e colite ulcerativa) (SULLIVAN; NORD, 2002).

3.4 KEFIR

O kefir é um leite fermentado que pode ser preparado a partir de diferentes tipos de leite, como de cabra, búfala, ovelha, camelo ou vaca, por fermentação microbiana iniciada através da inoculação dos grãos de kefir (FARAG *et al.*, 2020; KESENCAŞ *et al.*, 2017).

3.4.1 Histórico e definições

Apesar de não haver registro na literatura sobre a origem do kefir, a produção dos primeiros grãos de kefir deu-se nas montanhas dos Cárpatos, entre a Europa

Oriental e a Ásia Ocidental (KESENCAŞ *et al.*, 2017; NEJATI *et al.*, 2020). Historicamente, os grãos de kefir são considerados um presente de Alá pelo povo mulçumano. Esses povos preparavam o kefir em sacos feitos de couro e do estômago de animais ruminantes, onde ocorria a fermentação do leite e a formação de grãos. Esses grãos foram passados através de gerações e considerados como uma riqueza familiar (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006).

A palavra kefir é originado da palavra “keif” em turco e há várias traduções para a mesma, como “prazer” ou “sentir-se bem” (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006). Segundo Farnworth (2005) o kefir é definido como um leite fermentado apresentando consistência viscosa e sabor levemente ácido, distinguindo-se dos demais leites fermentados pela matriz complexa de microrganismos responsáveis pela fermentação e por conter gás carbônico e etanol. Além disso, o kefir também possui aminoácidos essenciais, minerais e vitaminas (ALTUNTAS; HAPOGLU, 2019).

A FAO/OMS (2003) propôs uma definição do kefir, baseada na composição dos grãos e do produto final. A composição dos grãos inclui *Lentilactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter* e leveduras. O produto final é definido como um leite fermentado oriundo da inoculação de grãos de kefir. Já a legislação brasileira vigente (BRASIL, 2007) define kefir como sendo o produto originário da fermentação do leite a partir de grãos de kefir, constituídos por *Lentilactobacillus kefir*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter* e leveduras fermentadoras e não fermentadoras de lactose, com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono.

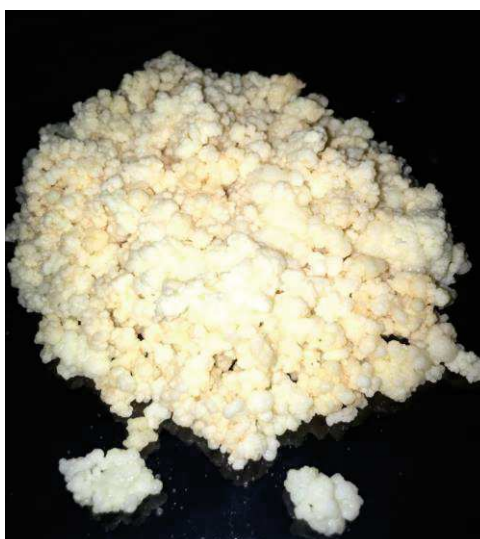
A produção tradicional de kefir é realizada adicionando-se grãos de kefir ao leite pasteurizado e resfriado a 20-25 °C. Os grãos de kefir são adicionados na proporção de 2% a 10%. A fermentação ocorre a 20-25 °C por 18-24 h, após esse período os grãos são removidos através da filtração do leite. O filtrado está pronto para consumo e deve ser armazenado a 4 °C (ALTUNTAS; HAPOGLU, 2019).

3.4.2 Características dos grãos

Os grãos de kefir consistem em uma massa gelatinosa e irregular, branca ou levemente amarela, com uma textura firme. Esses grãos apresentam uma estrutura similar a pedaços de corais ou pequenos segmentos de couve-flor ou pipoca e um

diâmetro que varia de 0,3 a 3,5 cm (Figura 2) (GARROTE *et al.*, 2001; FARNWORTH, 2005). Os grãos de kefir formam numerosas estruturas globulares ocas, que unidas formam uma estrutura de rede poliédrica (NEJATI *et al.*, 2020). A obtenção dos grãos de kefir se dá através da coagulação do leite dentro do abomaso (quarta câmara estomacal de ruminantes) envolvido por pele, comumente de ovelha. Após algumas semanas de incubação, há a formação de uma camada insolúvel em água, de aspecto esponjoso e gelatinoso. Essa camada é formada na superfície interna dos sacos onde ocorreu a coagulação e quando se dividem em pedaços, são denominados grãos de kefir (KESENCAŞ *et al.*, 2017).

Figura 2 – Grãos de kefir.



Fonte: Arquivo pessoal.

O mecanismo de formação dos grãos de kefir dá-se através de auto e co-agregação microbiana. A formação dos grãos inicia-se com a auto-agregação de *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Kazachstania turicensis*. A partir disso outros microrganismos agregam-se à superfície dos grânulos em consequência da produção de biofilme por *L. kefiranofaciens*, formando grânulos maiores (NEJATI *et al.*, 2020). Várias espécies homofermentativas de *Lactobacillus*, principalmente *L. kefiranofaciens*, são responsáveis pela síntese do biofilme. Esse biofilme é composto por um complexo de polissacarídeo, denominado kefirano, que envolve leveduras e bactérias (KESENCAŞ *et al.*, 2017; NOGAY, 2019). O kefirano é composto de 30 a 34% de caseína, 45 a 60% de sacarídeo e 3 a 4% de gordura (NOGAY, 2019). O kefirano também contém d-glicose e d-galactose na proporção

de 1:1 e constitui aproximadamente 25% do peso de grão seco (KESENCAŞ *et al.*, 2017).

A produção dos grãos de kefir é baseada em seu cultivo contínuo em leite resultando no aumento da biomassa dos mesmos (LIBUDZISZ; PIATKIEWICZ, 1990). Todavia, os grãos de kefir só crescem a partir de grãos preexistentes. Os grãos são compostos, na maior parte, por proteínas e polissacarídeos nos quais existe uma microbiota diversa (TAMIME *et al.*, 2001; SARKAR, 2007). A massa biológica elástica e gelatinosa é composta de proteínas, lipídios e um polissacarídeo capsular solúvel em água (kefirano) (KESENCAŞ *et al.*, 2017). A matriz do grão é composta por um complexo de 13% de proteína (massa seca), 24% de polissacarídeo (kefirano), detritos celulares microbianos e componentes desconhecidos (NEJATI *et al.*, 2020; OTLES; CAGINDI, 2003). Todavia essa composição pode variar de acordo com a origem do grão. Kesençaş *et al.* (2017) relata uma variação de água de 81,5 a 86,3%, proteína de 4 a 7,2% e polissacarídeos de 8,6 a 10%.

Farnworth (2005) relata que a microbiota dos grãos de kefir contém bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras as quais encontram-se misturadas com caseína e carboidratos complexos presos numa matriz de polissacarídeos. Carvalho (2011) relata que na parte mais externa dos grãos encontra-se um biofilme complexo, onde os cocos são predominantes sob a superfície das leveduras. Já na parte interior encontra-se um material pouco estruturado composto principalmente por leveduras entremeadas por bacilos.

A bebida de kefir oriunda do processo de fermentação do leite pelos grãos de kefir é um produto lácteo amarelado ou branco, ácido e viscoso, contendo uma pequena quantidade de álcool (NOGAY, 2019). Segundo Carneiro (2010) o kefir deve apresentar características homogêneas, consistência cremosa, sabor ácido e levemente alcoólico e valores mínimos de bactérias ácido-lácticas totais e leveduras de 10^7 UFC/g e 10^4 UFC/g, respectivamente.

O número de microrganismos presentes no início e nas interações microbianas, os compostos bioativos resultantes do metabolismo microbiano e os benefícios associados ao uso desta bebida conferem ao kefir o *status* de um probiótico natural, designado como o iogurte do século XXI (LEITE, 2013). A origem e técnicas de produção dos grãos de kefir podem afetar a microbiota do kefir (ALTUNTAS; HAPOGLU, 2019). As mudanças ambientais durante a fermentação

levam a um estresse severo nos microrganismos, assim como as características do leite a ser fermentado. Leites com alta acidez, limitação de nutrientes, presença de compostos antimicrobianos, entre outras condições levam os microrganismos ao estresse. Assim a microbiota do kefir pode variar e dependerá muito dos mecanismos de resposta ao estresse (NEJATI *et al.*, 2020).

3.4.3 Composição microbiológica

Os grãos de kefir possuem uma composição microbiológica complexa e consistem em uma mistura de lactococos, *Leuconostoc* spp., lactobacilos termofílicos e mesofílicos, leveduras e bactérias do ácido acético (KESENCAŞ *et al.*, 2017; NEJATI *et al.*, 2020). Os lactobacilos mais comuns isolados dos grãos de kefir são *Lentilactobacillus kefiri*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lentilactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactobacillus gasseri*. Entre as leveduras mais encontradas estão as espécies *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Candida kefir*, *Pichia fermentans*, *Kazachstania unispora* e *Kazachstania exigua* (VARDJAN *et al.*, 2013). Todavia a composição microbiológica exata dos grãos de kefir ainda é controversa, uma vez que, até 50 diferentes espécies bacterianas e de leveduras já foram encontradas em kefir. As condições de cultivo são outro fator que pode influenciar na composição microbiana do grão, como por exemplo, tipo de leite utilizado, temperatura, tempo de incubação e proporção de grãos e leite (NEJATI *et al.*, 2020).

Kotova *et al.* (2016) conseguiram verificar que a composição microbiológica do kefir das regiões centrais da Rússia, inclui bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*, e leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kazachstania* e *Gibellulopsis*. As análises realizadas foram uma combinação das análises microbiológicas clássicas e microscópicas elétricas e eletrônicas com o método de reação de polimerização em cadeia (PCR) e eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Foram isoladas e identificadas quinze culturas puramente procariotas e quatro eucarióticas de microrganismos a partir de grãos de kefir. Os autores demonstraram também que membros do gênero *Lactobacillus*

predominavam em grãos de kefir, enquanto as cepas *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Lactococcus lactis* dominavam o produto final - bebida fresca.

A distribuição de microrganismos dentro da matriz de um grão de kefir não é homogênea. Os *Lentilactobacillus kefiri* predominam na camada externa do grão, enquanto a população de *Lactobacillus kefiranofaciens* e leveduras predominam no centro do grão. Apenas as leveduras fermentadoras de lactose encontram-se nas camadas externas (KESENCAŞ *et al.*, 2017). Segundo Nejati *et al.* (2020) os microrganismos ocupam todas as superfícies internas e externas dos grãos de kefir, sendo que as bactérias são dificilmente observadas nas superfícies externas dos grãos, mas apenas incorporadas na matriz fibrilar perto da superfície. O autor ainda destaca que variações na distribuição da microbiota possam ser influenciadas pelas condições de cultivo.

Nos grãos de kefir, geralmente, as bactérias lácticas são mais numerosas (10^8 - 10^9 UFC/mL) que as leveduras (10^5 - 10^6 UFC/mL) e bactérias ácido acéticas (10^5 - 10^6 UFC/mL). Todavia as condições de fermentação podem afetar esse padrão (FARNWORTH, 2005). Estudos indicam que o conteúdo de bactérias no kefir varia de $6,4 \times 10^4$ a $8,5 \times 10^8$ UFC/g e de leveduras de $1,5 \times 10^5$ a $3,7 \times 10^8$ UFC/g (ALTUNTAS; HAPOGLU, 2019; SARKAR, 2007). Guzel-seydim *et al.* (2005), analisaram as populações microbianas na bebida kefir e nos grãos de kefir enumerando-as por plaqueamento. As bactérias ácido lácticas totais, lactococos, lactobacilos e leveduras aumentaram durante a fermentação e apresentaram um ligeiro aumento durante o armazenamento a frio. Os grãos de kefir apresentaram uma proporção de 10^9 UFC/g de bactérias ácido lácticas para 10^6 UFC/g de leveduras. As bactérias ácido lácticas geralmente constituem 65 a 80% da microflora granular, estreptococos 20% e leveduras 5%. As bactérias ácido lácticas hidrolisam a lactose e produzem ácido láctico, garantindo assim o ambiente ideal para o crescimento de leveduras. As leveduras sintetizam vitaminas do complexo B e hidrolisam as proteínas do leite, produzindo dióxido de carbono e etanol (NOGAY, 2019).

Durante o processo de fermentação os microrganismos constituintes dos grãos de kefir produzem uma série de metabólitos. As bactérias lácticas e outros microrganismos homofermentativos, produzem principalmente ácido láctico, já os microrganismos heterofermentativos além do ácido láctico também produzem o

dióxido de carbono como principal metabólito. Outras espécies também podem produzir diacetil, acetaldeído, etanol e acetato (KESENCAŞ *et al.*, 2017).

3.4.4 Consumo mundial

O kefir é amplamente utilizado na nutrição humana devido às suas propriedades promotoras de saúde (NEJATI *et al.*, 2020). Ele ganhou popularidade na segunda metade do século XIX no leste de países da Europa Central e, no final do mesmo século, começou a ser produzido industrialmente na antiga União Soviética (KESENCAŞ *et al.*, 2017). Atualmente o kefir faz parte da dieta humana em muitas partes do mundo como Sudoeste da Ásia, Leste e Norte da Europa, América do Norte, Japão (OTLES; CAGINDI, 2003), Oriente Médio, Norte da África e Rússia (SARKAR, 2007; SARKAR 2008). Devido a seus significativos valores terapêuticos e nutricionais, é recomendado para lactentes acima de seis meses (SARKAR, 2007).

Os grãos de kefir e a bebida comercial ou artesanal produzida a partir dele, são encontrados em todo o mundo. Na Europa e Ásia, é consumido em muitos países, como Bulgária, Dinamarca, Grécia, Finlândia, Hungria, Irlanda, Itália, Polônia, Portugal, Espanha e Suécia, Rússia, Turquia, China, Hungria, Índia, Irã, Japão, Malásia, Taiwan, Tailândia, Tibete, entre outros. Os grãos de kefir e as bebidas também são encontrados e consumidos no Oriente Médio, Norte da África, Canadá, Estados Unidos, América do Sul (Argentina e Brasil), bem como na África do Sul (WYK, 2019).

A longevidade do povo caucasiano foi atribuída ao consumo de kefir, e no Tibete ele não é apenas uma bebida popular de promoção da saúde, mas é considerado um remédio popular natural (WYK, 2019). Na Rússia, o kefir é o leite fermentado mais popular depois do iogurte. Nos Estados Unidos, o produto é comercializado há muitos anos, contendo ou não álcool (CARNEIRO, 2010).

3.4.5 Benefícios de consumo de kefir para a saúde

O valor nutricional do kefir é devido à sua rica composição química, que inclui carboidratos, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas. Além desses compostos o kefir também apresenta outras substâncias, como catequina, vanilina, ácido ferúlico,

ácido salicílico, ácido acético, ácido pirúvico, ácido hipúrico, ácido propiônico e ácido butírico, oriundas do processo de fermentação. A presença dessas substâncias aumenta ainda mais o seu valor nutricional por serem bioativas (FARAG *et al.*, 2020; KESENCAŞ *et al.*, 2017). Segundo CARVALHO (2011), a ideia de que o kefir possa promover benefícios à saúde é antiga, acreditando-se há muito tempo que ele seria um probiótico natural.

Estudos relatam que o kefir e seus constituintes (peptídeos bioativos, ácidos orgânicos, álcoois, dióxido de carbono, bacteriocinas e kefirano, por exemplo) têm atividade antimicrobiana, antitumoral, anti-hipertensiva, antioxidante, antialérgica e imunomoduladora e também melhoram a digestão da lactose (FARAG *et al.*, 2020; KESENCAŞ *et al.*, 2017; LEITE, 2013; NEJATI *et al.*, 2020; NOGAY, 2019). Conforme Farag *et al.* (2020) o efeito antibacteriano do kefir contra vários microrganismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella*, dá-se em função do seu conteúdo de carboidratos. O kefirano, um polissacarídeo solúvel em água do grão de kefir, possui atividade antimicrobiana contra vários patógenos bacterianos e fúngicos. Ele possui a capacidade de inibir o crescimento de várias bactérias, assim como de impedir a formação de esporos por alguns fungos.

Outros metabólitos associados aos efeitos antimicrobianos do kefir são ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol e diacetil, além de algumas bacteriocinas produzidas pelos grãos (KESENCAŞ *et al.*, 2017; NOGAY, 2019). Alguns estudos demonstram a atividade antibacteriana do kefir frente à *Escherichia coli* e a outros agentes de interesse em alimentos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Chifiriuc *et al.* (2005) investigaram a atividade antimicrobiana do kefir contra *Bacillus subtilis* spp. *spizizenii* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Candida albicans* ATCC 10231. O kefir fermentado durante 24 h e 48 h, e também após 7 dias a 4°C e 8°C foi analisado pelo método de disco-difusão *in vitro*. A intensidade da atividade antimicrobiana foi interpretada por comparação com dois antibióticos, ampicilina e neomicina. Os resultados evidenciaram que a atividade antimicrobiana do kefir fermentado por 24 h e 48 h (fresco), ou após 7 dias de conservação a 4°C e 8°C, foi semelhante e observada contra *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S.*

enteritidis. Para *E. coli*, *E. faecalis* e *S. enteritidis*, a atividade antimicrobiana do kefir foi superior aos antibióticos testados e para *B. subtilis* e *S. aureus* a um antibiótico. Os produtos testados não evidenciaram atividade antimicrobiana contra *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Os autores concluíram que o kefir apresenta amplo espectro e forte atividade antibacteriana, provavelmente devido à complexa associação de cepas probióticas viáveis produzindo substâncias antimicrobianas.

No estudo de Ota (1998), é demonstrado que o uso do kefir auxilia na prevenção da contaminação por *Escherichia coli* O-157 enterohemorrágica, pois ele é capaz de aumentar o número de bactérias ácido lácticas e bífidas, nativas do trato gastrointestinal. Nogay (2019) relata que os polissacarídeos sintetizados pelos grãos de kefir (kefirano) têm efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e positivos sobre organismos-chave no intestino. Segundo o autor, esses polissacarídeos inibem o crescimento de bactérias não probióticas, aumentam a concentração de glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (enzimas que compõem o sistema de defesa antioxidante enzimático celular) a nível intestinal.

A propriedade antitumoral do kefir está relacionada à atividade bioativa de seus componentes, como peptídeos, polissacarídeos e esfingolipídios. Tais componentes influenciam na regulação de processos celulares, dentre os quais podemos citar proliferação celular e apoptose. O mecanismo de ação antitumoral está ligado à redução da secreção de fatores de necrose tumoral, citocinas com atividade pro-inflamatória e capacidade de causar a morte de células. A redução dessas citocinas promove um efeito antiproliferativo nas células tumorais (NOGAY, 2019). Kesencas *et al.* (2017) relaciona a propriedade antitumoral do kefir a vários fatores, como indução de mecanismos de apoptose nas células tumorais, efeito antiproliferativo e antioxidante, ativação do sistema imunológico, inibição da atividade de enzimas que convertem compostos procarcinogênicos em agentes cancerígenos.

Os peptídeos são considerados uma classe única e importante de compostos gerados durante a fermentação do leite e são responsáveis por muitos dos benefícios à saúde. Os peptídeos bioativos encontrados no kefir exibem atividade anti-hipertensiva, pois possuem a capacidade de inibição da enzima conversora de angiotensina I (ECA) (FARAG *et al.*, 2020). Gronnevik *et al.* (2011) estudaram cinco produções comerciais de kefir norueguês a fim de investigar e conhecer o desenvolvimento microbiológico, compostos voláteis, ácidos orgânicos, carboidratos

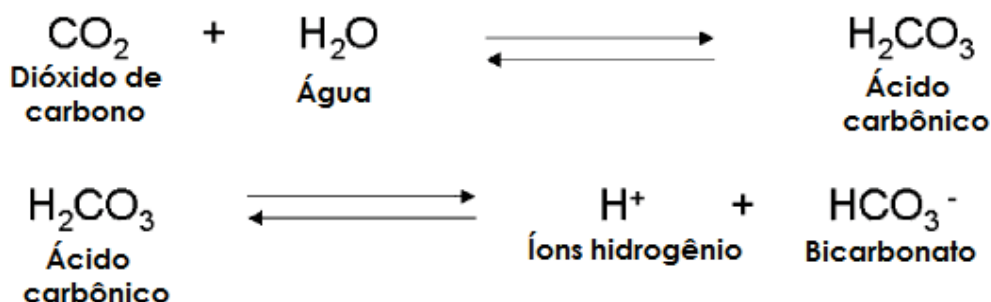
e aminoácidos livres durante o armazenamento refrigerado por 8 semanas. O número de bactérias lácticas diminuiu durante as quatro primeiras semanas de armazenamento, enquanto o número de leveduras aumentou. Os importantes metabólitos de levedura – dióxido de carbono (CO_2) e etanol - aumentaram durante todo o período de armazenamento. O aminoácido ácido glutâmico foi reduzido durante o armazenamento, e um consequente aumento em seu produto de descarboxilação, o ácido g-aminobutírico (GABA), foi encontrado. O GABA tem efeito redutor da pressão arterial em hipertensos leves quando consumido em leite fermentado em quantidades de 10 mg por dia durante um período de 12 semanas.

O kefir também pode auxiliar na redução do colesterol sérico e de hiperglicemia pós-prandial. A redução do colesterol ocorre em função das bactérias probióticas presentes no kefir aumentarem a produção intestinal de ácidos graxos de cadeia curta, que inibem enzimas envolvidas na síntese de colesterol. Já a redução da glicemia acontece devido à inibição de enzimas entéricas responsáveis pela digestão dos carboidratos (α -glucosidases) (KESENCAŞ *et al.*, 2017; NOGAY, 2019).

3.5 CARBONATAÇÃO

O processo de carbonatação dá-se pela dissolução de dióxido de carbono (CO_2) em fluidos (BENA, 2006) (Figura 3). Após a dissolução, o CO_2 forma o ácido carbônico, que se dissocia formando o íon bicarbonato e H^+ . O CO_2 e os íons H^+ são, em grande parte, responsáveis por mecanismos que inibem o crescimento de outros microrganismos (TE GIFFEL, 2003; DIEZ-GONZALEZ *et al.*, 2000).

Figura 3 – Reações de carbonatação.



Fonte: Adaptado de BENA (2006).

As bebidas carbonatadas são reconhecidas principalmente por suas propriedades refrescantes (BENA, 2006). A formação de bolhas e espuma nas bebidas carbonatadas é um dos principais fatores determinantes da sua qualidade e aceitação, pois influenciam a percepção de aromas e sensação de sabor na boca (VIEJO *et al.*, 2019). As sensações proporcionadas pela carbonatação de bebidas são proporcionadas por uma associação de componentes sensoriais do paladar, olfato, quimестesia e somestesia. Esses componentes permitem a estimulação da cavidade oral conferindo a sensação de queimação/formigamento proporcionada pelas bebidas carbonatadas (PELCHAT *et al.*, 2014).

A presença do CO₂ nas bebidas carbonatadas se dá através dos processos que incluem a carbonatação natural, injeção de gás e fermentação. A carbonatação natural ocorre com águas obtidas de fontes naturais, já sendo naturalmente carbonatadas não necessitando de nenhum processamento adicional. A injeção de gás é feita na indústria através da adição do CO₂ nos líquidos (água, cerveja, refrigerantes, dentre outros) sob condições específicas de temperatura e pressão. No caso da fermentação, é um processo onde microrganismos fermentadores produzem CO₂ como subproduto de seu metabolismo, o qual dissolve-se pelo líquido (VIEJO *et al.*, 2019).

A carbonatação pode ser afetada por uma variedade de fatores, incluindo sólidos presentes no líquido a ser carbonatado, temperatura do gás e do líquido e pressão atmosférica (PELCHAT *et al.*, 2014). A fim de aumentar o grau de dissolução de CO₂ e obter uma carbonatação mais eficiente, sugere-se trabalhar sempre com temperaturas baixas (4 °C). Para padronizar a fabricação das bebidas,

são utilizados aparelhos medidores de pressão que, juntamente com a utilização de tabelas, possibilitam determinar o grau de carbonatação. Aparelhos compostos de adaptador com agulha, manômetro e válvula de escape fornecem diretamente o volume de gás utilizado (WODROOF; PHILLIPS, 1981).

Diferentes métodos podem ser usados para adição de CO₂ aos produtos, como a adição de água carbonatada, adição de carbonatos, embalagens com atmosfera modificada e injeção direta de CO₂. No caso de produtos de elevada viscosidade como leites fermentados, o processo de injeção do CO₂ na forma gasosa é sugerido como a melhor forma de processamento. O CO₂ tem sido empregado como alternativa, particularmente para a preservação de alimentos altamente perecíveis e alguns de maior valor agregado (SINGH *et al.*, 2011). O dióxido de carbono dissociado leva a formação do ácido carbônico que reduz o pH da solução diminuindo a atividade de microrganismos, além disso o dióxido de carbono também possui ação bacteriostática e bactericida (BENA, 2006).

A adição de CO₂ nas bebidas é comumente feita sob altas pressões e baixas temperaturas, para a maioria das bebidas engarrafadas ou enlatadas (por exemplo, refrigerante, água, bebidas energéticas, dentre outras). A concentração de CO₂ mais utilizada para bebidas carbonatadas não alcoólicas é de 3 a 4,5 volumes. Nas bebidas fermentadas, a presença do CO₂ deve-se diretamente ao processo de fermentação. Uma determinada quantidade de CO₂ se dissolverá no líquido, sendo limitada às condições de temperatura e pressão ambiente (PELCHAT *et al.*, 2014).

Cada tipo de produto, seja líquido ou sólido, necessita de equipamentos específicos para adição de CO₂. No caso de produtos lácteos líquidos, há possibilidade de desenvolvimento de produtos "gasosos". Bebidas lácteas carbonatadas são produzidas em diversos países. Carbonatadores utilizados em indústrias de bebidas podem ser adaptados para operar em laticínios (LOSS; HOTCHKISS, 2003).

3.5.1 Tecnologia de carbonatação aplicada em produtos lácteos

A primeira bebida carbonatada foi a água, quando em 1767 o químico Joseph Priestley percebeu que ao adicionar dióxido de carbono a água conferia-lhe agradável sabor acidificado (BENA, 2006). A adição de CO₂ em produtos lácteos por meio de injeção direta ou em embalagem de atmosfera modificada é uma estratégia

de aumento da vida útil, com custos relativamente baixos e utilizada comercialmente em todo o mundo, em produtos como queijos, leite cru e pasteurizado, iogurte e bebidas lácteas. No caso das bebidas lácteas carbonatadas, a grande aceitação deve-se à sensação de efervescência e refrescância devido à presença do dióxido de carbono (JARDIM, 2012).

A carbonatação é um processo viável e seguro para o tratamento do leite e seus derivados. O CO₂ é um antimicrobiano natural, apresentando uso potencial na indústria láctea porque possui a opção de ser adicionado e depois removido de leite e derivados sem efeitos deletérios (SINGH *et al.*, 2011). As bebidas carbonatadas a base de leite, com quantidade de CO₂ suficiente para serem detectáveis através do sabor têm geralmente uma vida útil de mais de 6 semanas sob refrigeração. Essas bebidas lácteas com gás têm qualidade nutricional igual ou superior à do leite. A quantidade de CO₂ adicionada e o tipo de sistema aromatizante utilizado nestes produtos são determinantes para a sua aceitação (TE GIFFEL, 2003).

As propriedades físico-químicas do CO₂, ou seja, a facilidade de solubilização nas fases aquosa e lipídica, sua capacidade de reduzir o pH e a solubilidade dependente da temperatura, o tornam ideal para uso em produtos lácteos. Assim, pode ser dissolvido em produtos lácteos fluidos, como conservante para inibir o desenvolvimento de agentes patogênicos e microrganismos deterioradores e/ou alterar a funcionalidade da micela de caseína, podendo em seguida ser removido com um vácuo simples ou por agitação e aquecimento suave (TE GIFFEL, 2003).

Vianna *et al.* (2012), avaliaram o efeito da adição do CO₂ ao leite cru estocado, por seis dias, a 4 °C. Os autores analisaram o leite quanto a sua composição físico-química e microbiológica. Após o período de estocagem foi observado a manutenção das características iniciais de qualidade físico-química e microbiológica no leite tratado com CO₂. O CO₂ inibe o crescimento microbiano, pois afeta o metabolismo dos microrganismos uma vez que reduz o pH. Assim, a sua utilização permite a manutenção da qualidade do leite durante a estocagem.

Paula (2005) desenvolveu uma bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite, estável à temperatura ambiente por pelo menos três meses, sem receber tratamentos térmicos extremos como a esterilização. O produto teve boa aceitação, situando-se entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito”. A bebida apresentou 0,1% de gordura, 0,52% de proteínas, 0,34% de cinzas, 85,84 % de umidade e 13,2% de carboidratos, além de pH 3,25.

Ravindra *et al.* (2012) desenvolveram um iogurte carbonatado e avaliaram o seu efeito sobre a qualidade e tempo de armazenamento. O leite foi fermentado por estirpes de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* a 30 °C por 18h, adicionada de açúcar e estabilizante, resfriada e carbonatada. Foram realizadas análises semanais de qualidade sensorial, química e microbiana de amostras da bebida. O iogurte carbonatado manteve-se estável em todas as análises feitas por 12 semanas, em oposição a amostras controles não carbonatadas que mantiveram a estabilidade por apenas cinco semanas. O processo de carbonatação retardou a lipólise e proteólise na bebida durante o armazenamento, assim como inibiu o crescimento de leveduras. Além disso, a bebida obteve melhor avaliação sensorial em relação ao sabor consistência e aceitação geral se comparada a bebida não carbonatada.

Outra aplicação do processo de carbonatação na indústria de laticínios é seu uso para carbonatação do leite pasteurizado utilizado na fabricação de leites fermentados. Vinderola *et al.* (2000) avaliaram a produção de leite fermentado, adicionado com bactérias probióticas, a partir de leite pasteurizado carbonatado. Os autores evidenciaram uma redução no tempo de fermentação das amostras produzidas a partir do leite carbonatado. Além disso, seu uso não interferiu nas propriedades sensoriais do leite fermentado nem na viabilidade dos microrganismos probióticos. Logo o processo de carbonatação do leite é uma alternativa para redução do tempo de fabricação de leites fermentados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

As análises físico-químicas, sensoriais e a produção da bebida, em escala piloto, foram conduzidos nos laboratórios de pesquisa e no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (Lab de PD&I) do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG ILCT), em Juiz de Fora – MG. As análises microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos e Águas (LAAA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

4.1 ENSAIOS PRELIMINARES

Os ensaios preliminares foram conduzidos a fim de determinar a matéria-prima utilizada para a fabricação da bebida carbonatada fermentada com kefir e os processos tecnológicos empregados na sua fabricação, como tipo de tratamento térmico (binômio tempo/temperatura), ingredientes, fermentação e fluxograma final de fabricação. A metodologia de fabricação foi definida com base nos testes preliminares e em função da bebida que apresentou melhores características sensoriais, visuais (sem separação de fases) e de composição físico-química, conforme acidez desejada no produto final.

4.1.1 Obtenção do permeado de ultrafiltração

Um volume de 200 litros de leite padronizado para 3% (m/v) de gordura e a 55 °C foi utilizado para a produção do permeado de ultrafiltração. O leite foi ultrafiltrado na unidade de ultrafiltração da marca REGINOX (capacidade de 300 litros por hora). Foram utilizadas membranas de ultrafiltração semipermeáveis de polietersulfona (KOCH MEMBRANE SYSTEMS, modelo KMS HFK™-131 FOOD E DAIRY UF ELEMENTS, de 4" 3838-k131-VYT).

Um fator de concentração (FC) com a redução de 80% do volume inicial do leite foi utilizado, conforme a equação abaixo:

$$FC = \frac{\text{Volume inicial de leite (VL)}}{\text{Volume inicial de leite (VL)} - \text{Volume de permeado (VP)}}$$

Sendo o volume de retentado (VR) igual ao volume inicial de leite menos o volume de permeado. O volume de permeado foi igual a 160 litros, logo o de retentado foi igual a 40. Assim temos:

$$FC = \frac{200}{200 - 160} \quad FC = 5,0$$

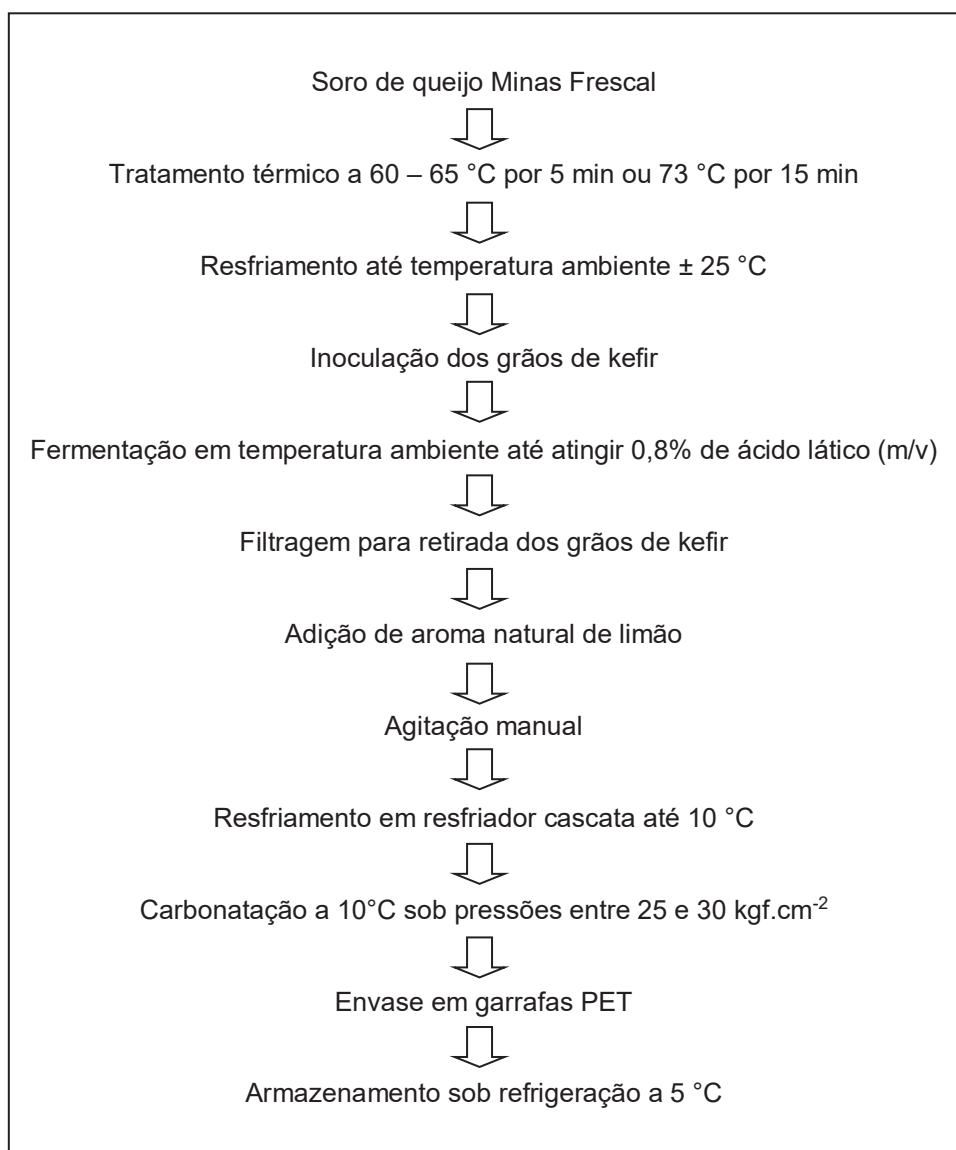
Amostras do permeado obtido foram coletadas para realização de análises físico-químicas e o restante utilizado para a fabricação da bebida carbonatada fermentada com kefir.

4.1.2 Elaboração de bebida à base de soro de queijo

O soro utilizado nos primeiros testes para elaboração da bebida fermentada com kefir e carbonatada foi obtido a partir da fabricação de queijo Minas frescal fabricado no Laboratório de PD&I da EPAMIG ILCT.

Um volume de 12 litros do soro de queijo Minas frescal adicionado de açúcar foi submetido ao tratamento térmico de 60 - 65 °C por 5 minutos ou 73 °C por 15 minutos e posteriormente resfriado até temperatura ambiente (± 25 °C) e adicionado dos 750g de grãos de kefir de cultivo doméstico. O processo de fermentação pelos grãos de kefir foi realizado em temperatura ambiente até que o fermentado atingisse a acidez de 0,8% de ácido láctico (m/v) (aproximadamente 24h). Após procedeu-se a filtragem em dessorador para retirada dos grãos de kefir e adição de aroma natural de limão ao fermentado, agitando-se manualmente para mistura dos ingredientes. O resfriamento do fermentado foi feito através de resfriador em cascata até a temperatura de aproximadamente 10 °C, consecutivamente realizou-se a carbonatação sob pressões entre 25 – 30 kgf.cm⁻² por 35 minutos. O soro fermentado e carbonatado foi envasado em garrafas PET (polietileno tereftalato) e armazenado a 5 °C em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) (Figura 4). A bebida não foi considerada adequada para seguir pois, apresentou separação de fases após o envase durante o armazenamento.

Figura 4 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de soro de queijo.



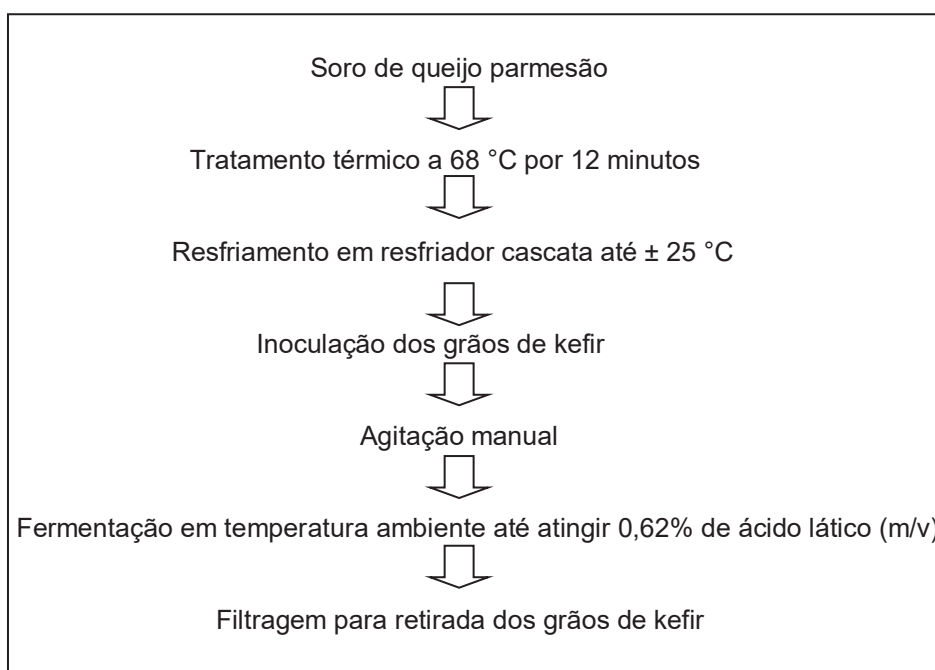
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.1.3 Elaboração de bebida à base de soro de queijo parmesão fermentada com grãos de kefir

Um volume de 12 litros de soro de queijo parmesão foi submetido ao tratamento térmico a 68 °C por 12 minutos. A cuba foi imersa no tacho para tratamento térmico e ao final o soro foi resfriado até ± 25 °C em resfriador em cascata. Sob agitação lenta procedeu-se a adição de 750g dos grãos de kefir de cultivo doméstico. A cuba foi acondicionada em caixa de isopor com tampa e mantida em temperatura ambiente para fermentação. O processo de fermentação foi

mantido por 24h e o fermentado atingiu a acidez de 0,62% de ácido láctico (m/v). Após procedeu-se a filtragem para remoção dos grãos de kefir (Figura 5). O fermentado não foi considerado adequado para seguir para o processo de carbonatação em função da baixa acidez após as 24h de fermentação.

Figura 5 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de soro de queijo parmesão.



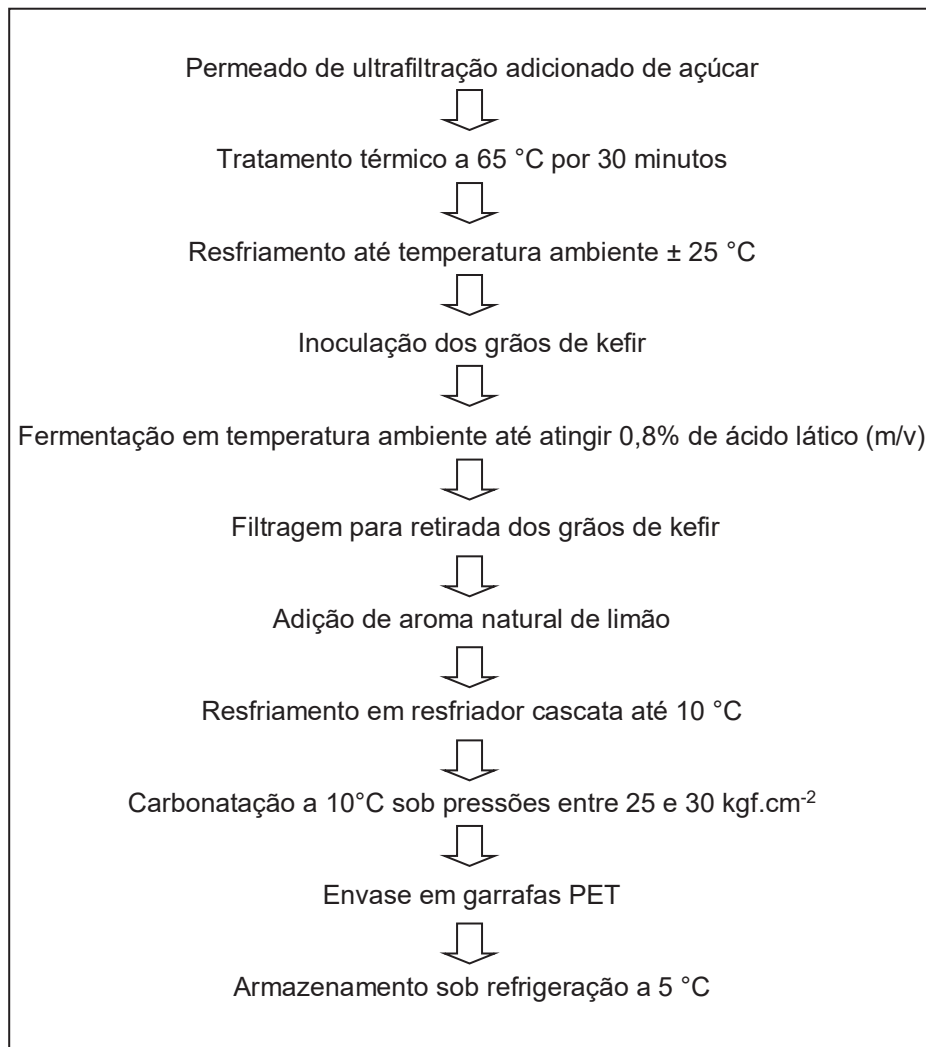
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.1.4 Elaboração de bebida à base de permeado de ultrafiltração

Um volume de 15 litros do permeado de ultrafiltração adicionado de 1 Kg açúcar foi submetido ao tratamento térmico de 65 °C por 30 minutos e posteriormente resfriado até temperatura ambiente (± 25 °C) e adicionado 750 g de grãos de kefir de cultivo doméstico. O processo de fermentação pelos grãos de kefir foi realizado em temperatura ambiente até que o fermentado atingisse a acidez 0,8% de ácido láctico (m/v) (aproximadamente 24h). Após procedeu-se a filtragem em dessorador para retirada dos grãos de kefir. Dez litros do fermentado foi adicionado de 6 mL de aroma natural de limão, agitando-se manualmente para mistura dos ingredientes. O resfriamento do fermentado foi feito através de resfriador em cascata até a temperatura de aproximadamente 10 °C, consecutivamente realizou-se a

carbonatação sob pressões entre 25 – 30 kgf.cm⁻² durante 52 minutos. O permeado de ultrafiltração fermentado e carbonatado foi envasado em garrafas PET e armazenado a 5 °C em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) (Figura 6).

Figura 6 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.

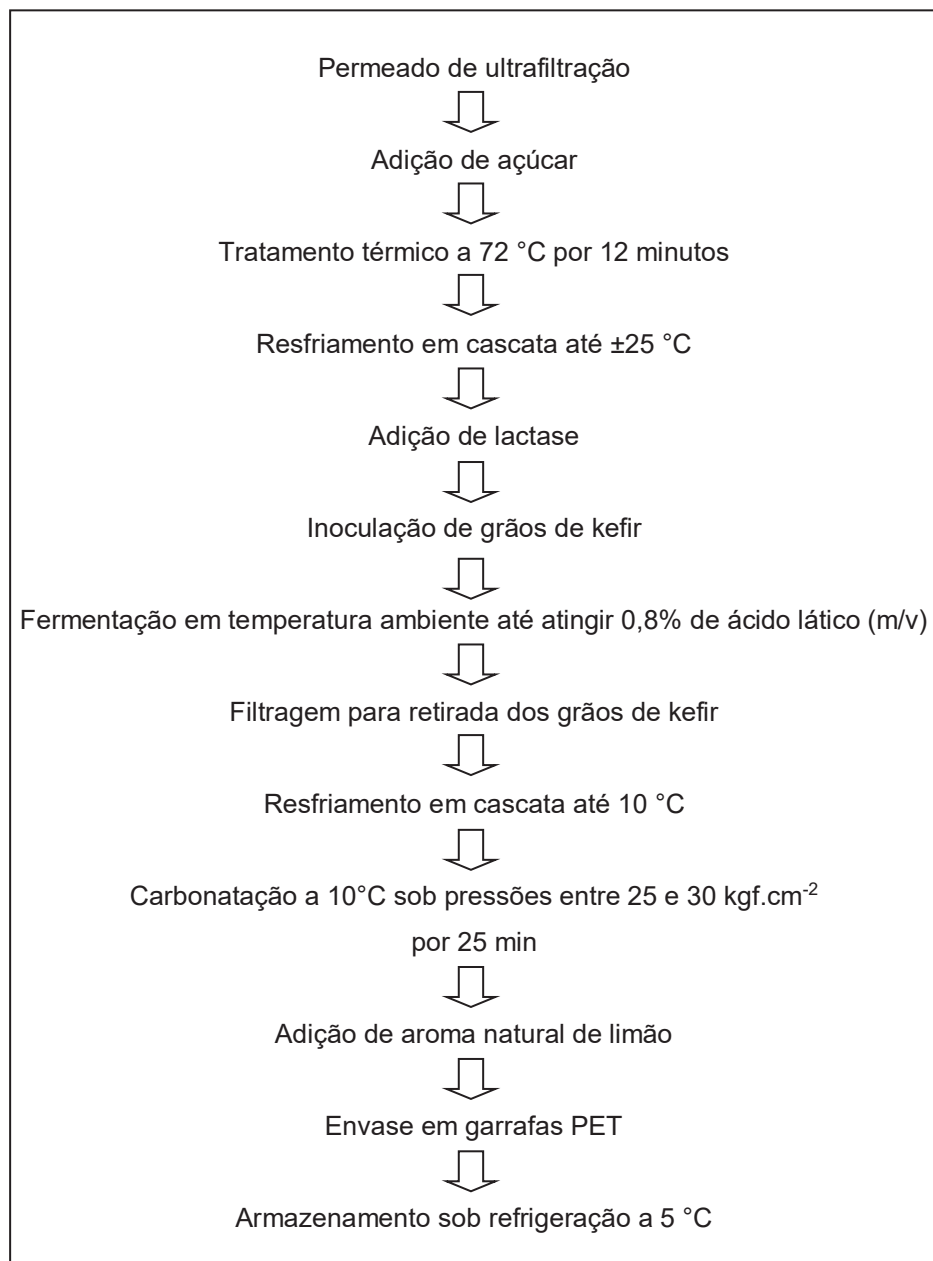


Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Outra metodologia para a fabricação de bebida fermentada a partir do permeado de ultrafiltração foi testada (Figura 7). Um volume de 10 litros de permeado foi adicionado de 1 Kg de açúcar e tratado termicamente a 72 °C por 12 minutos. Posteriormente foi resfriado até temperatura ambiente (±25 °C) e adicionado de 10 mL da enzima lactase e de 750 g de grãos de kefir de cultivo

doméstico. O processo de fermentação pelos grãos de kefir foi realizado em temperatura ambiente até que o fermentado atingisse a acidez 0,8% de ácido láctico (m/v) (aproximadamente 24h). Após procedeu-se a filtragem em dessorador para retirada dos grãos de kefir e resfriamento através de resfriador em cascata até a temperatura de aproximadamente 10 °C. A carbonatação foi realizada sob pressões entre 25 – 30 kgf.cm⁻² por 25 minutos. Em seguida a bebida foi adicionada de 6 mL de aroma natural de limão, envasada em garrafas PET e armazenada a 5 °C em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*).

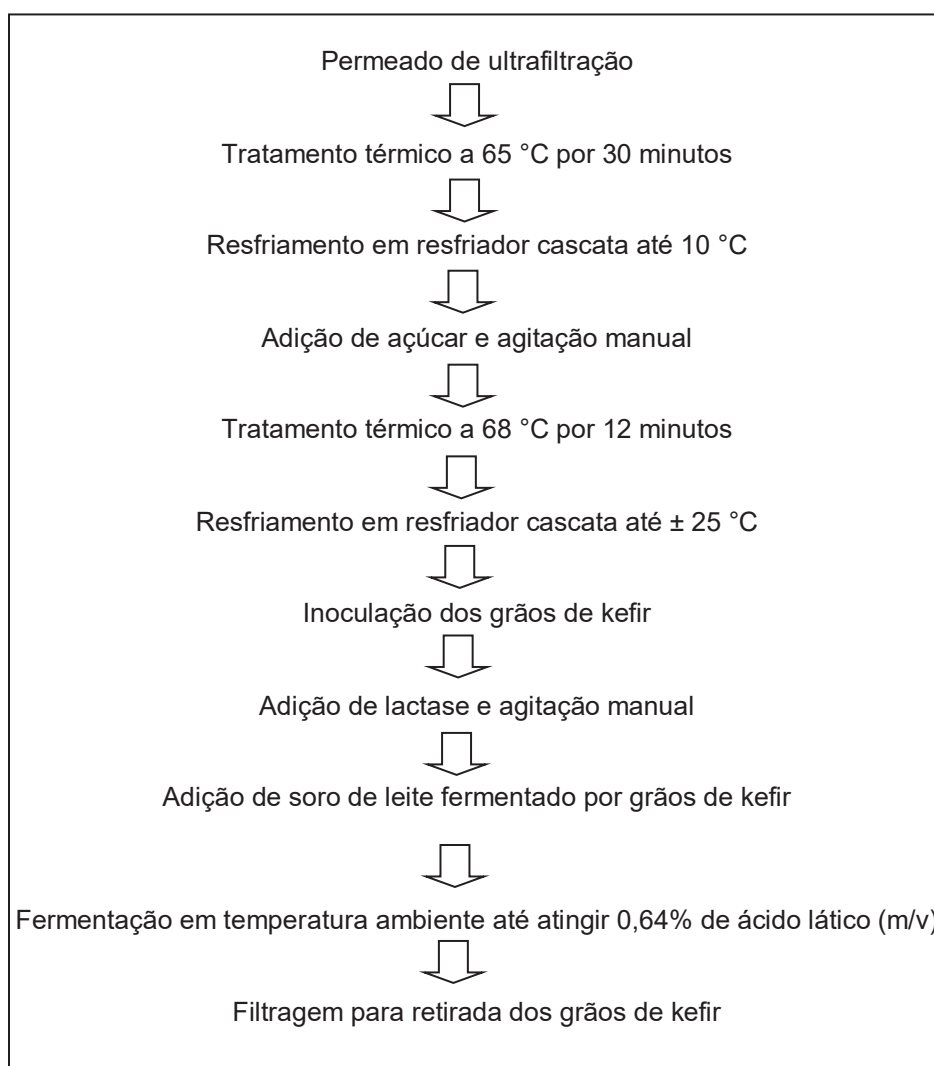
Figura 7 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Outra metodologia para a fabricação de bebida fermentada a partir do permeado de ultrafiltração foi testada (Figura 8). Um volume de 100 litros de permeado de ultrafiltração foi dividido em duas porções de 50 litros e submetido à pasteurização lenta a 65 °C por 30 minutos. Em seguida foram resfriados em resfriador em cascata até a temperatura de 10 °C e armazenados em câmara fria. Posteriormente, um volume de 50 litros do permeado foi fracionado em cubas cada uma contendo 10 litros do permeado, às quais foi adicionado 1 kg de açúcar cristal e realizado agitação manual para dissolver o açúcar. As cubas foram imersas no tacho para tratamento térmico a 68 °C por 12 minutos e ao final o permeado foi resfriado até 25 °C em resfriador em cascata, para a inoculação dos grãos de kefir de cultivo doméstico. A quantidade de grãos inoculados por cuba foi de 197g. Adicionou-se 10 mL da enzima lactase e agitou-se manualmente o permeado. As cubas foram acondicionadas em caixas de isopor com tampa e mantidas em temperatura ambiente para fermentação. A acidez dos permeados de cada cuba foi monitorada até que atingisse o valor de acidez de 0,64% de ácido láctico (m/v), a partir do qual procedeu-se a filtragem para remoção dos grãos de kefir (aproximadamente 24h). O fermentado não foi considerado adequado para seguir para o processo de carbonatação em função da baixa acidez e alto teor alcoólico e longo período para fermentação. A suspeita foi de que o permeado teve origem a partir de leite com resíduo de antibiótico.

Figura 8 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.

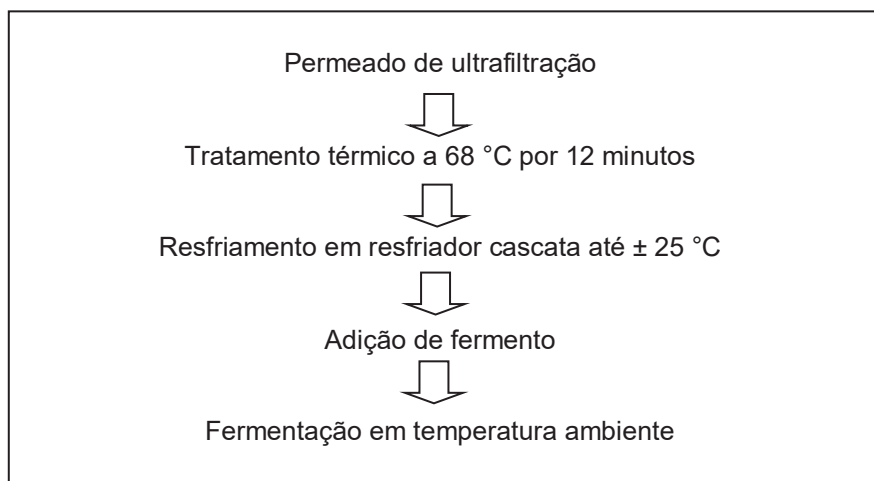


Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Outra metodologia para a fabricação de bebida fermentada a partir do permeado de ultrafiltração foi testada, utilizando fermento CHOOZIT® kefir DC (Figura 9). Um volume de 12 litros de permeado de ultrafiltração foi submetido ao tratamento térmico a 68 °C por 12 minutos. A cuba foi imersa no tacho para tratamento térmico e ao final o permeado foi resfriado até ± 25 °C em resfriador em cascata. Sob agitação lenta procedeu-se a adição de 0,4g do fermento Danisco®. A cuba foi acondicionada em caixa de isopor com tampa e mantida em temperatura ambiente para fermentação. Após 24 horas o permeado apresentou acidez de 0,48% de ácido láctico (m/v). O fermentado não foi considerado adequado para seguir para o processo de carbonatação em função longo período para fermentação. A

suspeita foi que este tipo de fermento não é apropriado para utilização em permeado de leite em função da diferença de seus constituintes em relação ao leite.

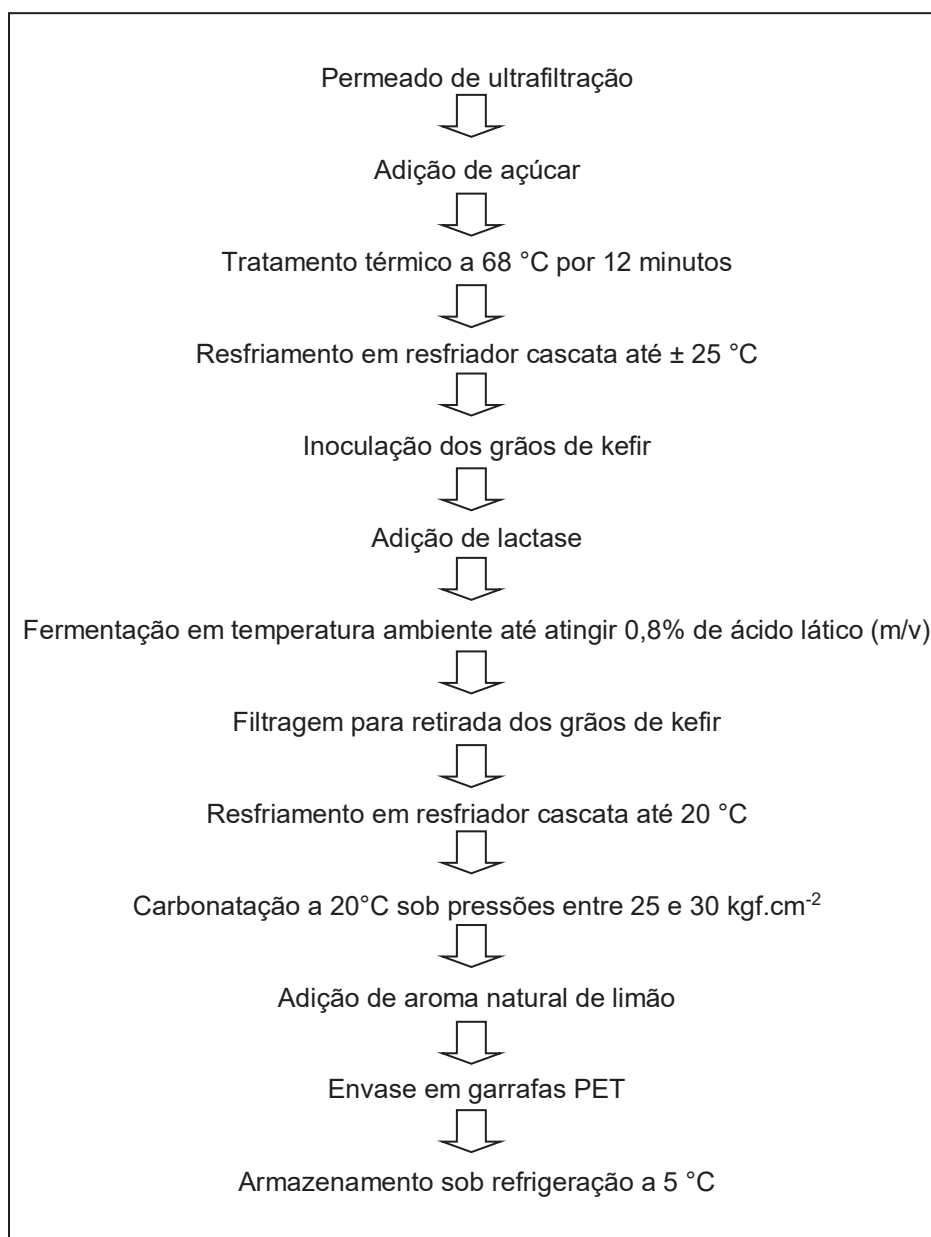
Figura 9 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com Danisco® e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Outra metodologia para a fabricação de bebida fermentada a partir do permeado de ultrafiltração foi testada (Figura 10). Um volume de 24 litros de permeado de ultrafiltração foi dividido em duas porções de 12 litros em cubas de aço inoxidável, adicionados de 1,2 Kg de açúcar e submetidos a tratamento térmico a 68 °C por 12 minutos. As cubas foram imersas no tacho para o tratamento térmico e ao final o permeado foi resfriado até 25 °C em resfriador em cascata. Em seguida foram adicionados 425g de grãos de kefir de cultivo doméstico e 10 mL da enzima lactase em cada cuba. As cubas foram acondicionadas em caixas de isopor com tampa e mantidas em temperatura ambiente para fermentação. O processo de fermentação foi mantido por 24h até que o fermentado atingisse a acidez de 0,8% de ácido láctico (m/v). Após procedeu-se a filtragem para remoção dos grãos de kefir. O resfriamento do fermentado foi feito através de resfriador em cascata até a temperatura de aproximadamente 20 °C, consecutivamente realizou-se a carbonatação sob pressões entre 25 – 30 kgf.cm⁻² durante 20 minutos. Em seguida adicionou-se 6 mL de aroma natural de limão. O permeado de ultrafiltração fermentado, carbonatado e aromatizado foi envasado em garrafas PET e armazenado a 5 °C em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*). Foram elaboradas quatro repetições da bebida.

Figura 10 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.



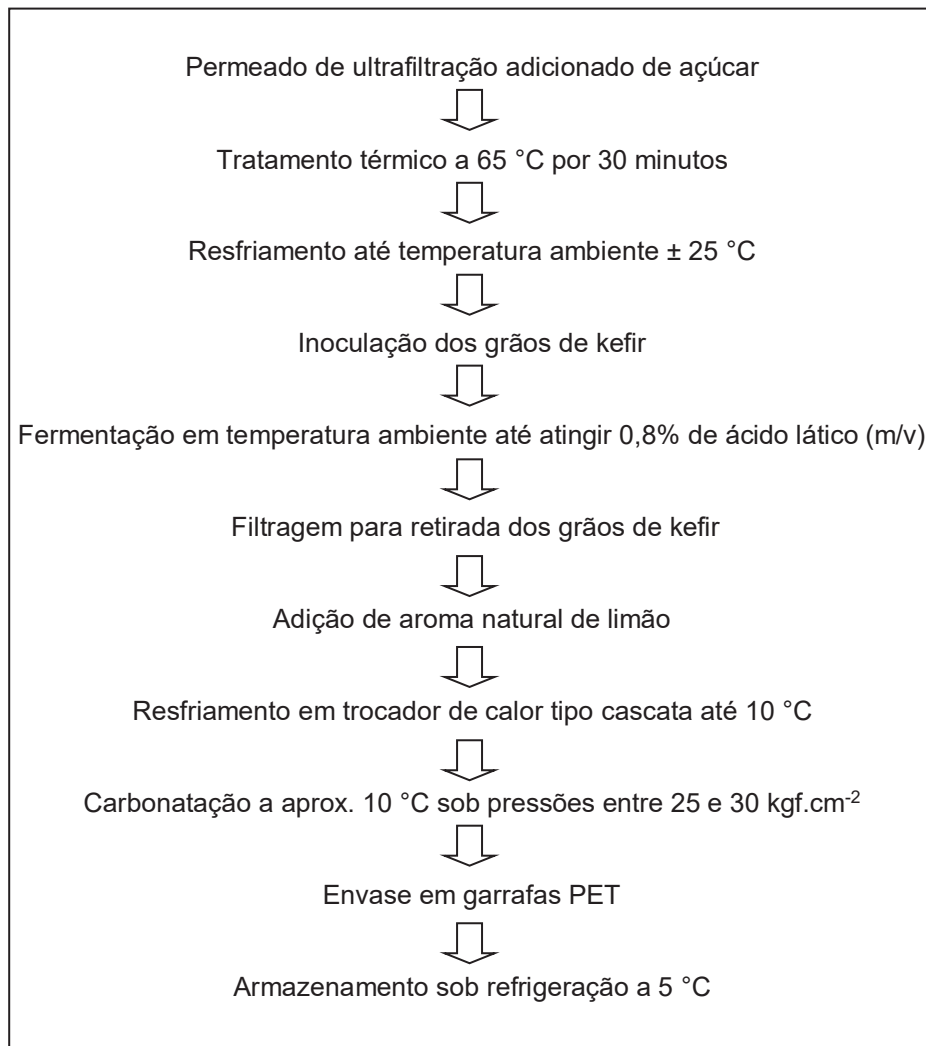
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.1.5 Método eleito para elaboração da bebida fermentada de kefir à base de permeado de ultrafiltração

Um volume de 10 litros do permeado de ultrafiltração foi adicionado de 1 Kg açúcar e submetido ao tratamento térmico de 65 °C por 30 minutos, resfriado até temperatura ambiente (25 °C) e adicionado 750g de grãos de kefir de cultivo doméstico. O processo de fermentação pelos grãos de kefir foi realizado em

temperatura ambiente até que o fermentado atingisse a acidez desejada de 0,8% de ácido lático (m/v) (aproximadamente 24h). Após, procedeu-se a filtragem em dessorador para recuperação dos grãos de kefir. Os mesmos dez litros do soro permeado fermentado foram adicionados de 6 mL de aroma natural de limão. A mistura fermentada foi resfriada em trocador de calor tipo cascata até temperatura de aproximadamente 10 °C para realização da carbonatação sob pressões entre 25 – 30 kgf.cm⁻² durante 52 minutos. O produto fermentado e carbonatado foi envasado em garrafas PET de 350 mL e armazenado a 5 °C ± 1 °C em estufa incubadora tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) (Figura 11 e 12).

Figura 11 – Fluxograma de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.



Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Figura 12 – Etapas principais do processo de fabricação da bebida fermentada com kefir e carbonatada à base de permeado de ultrafiltração.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

Legenda: A) Equipamento de concentração por ultrafiltração; B) Tratamento térmico da bebida; C) Grãos de kefir inoculados no permeado de ultrafiltração; D) Sistema de resfriamento em cascata; E) Sistema de injeção de CO₂; F) Envase.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A bebida à base de soro permeado de ultrafiltração, fermentada por kefir e carbonatada foi fabricada em quatro repetições (R1, R2, R3 e R4). Após a fabricação, a bebida foi estocada sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) para a realização das análises de composição centesimal e para avaliar a estabilidade durante o período de estocagem. Periodicamente, foram realizadas análises físico-químicas (Tabela 3), microbiológicas (Tabela 4) sensorial e colorimétrica (Tabela 5), em tempos diferentes, visando verificar possíveis alterações do produto e determinar estabilidade ao longo da estocagem das mesmas.

Tabela 3 – Análises físico-químicas realizadas no leite, soro permeado de ultrafiltração e bebida carbonatada fermentada por kefir à base de soro permeado de ultrafiltração, durante o período de estocagem.

Análises físico-químicas									
Dias	GOR	Acidez	pH	RM	EST	PTN	VS	UMID	DENS
Leite e soro permeado de ultrafiltração									
1	x	x	x	x	x	x		x	x
Bebida à base de soro permeado de ultrafiltração, fermentada e carbonatada									
1	x	x	x	x	x	x	x	x	
6		x	x						
20		x	x						
34		x	x						
50		x	x						

Legenda: GOR – Gordura; RM- resíduo mineral fixo; EST – extrato seco total; PTN - proteína; VS - viscosidade; UMID – umidade; DENS – densidade; x - análises realizadas.
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Tabela 4 – Análises microbiológicas realizadas na bebida carbonatada fermentada por kefir à base de soro permeado de ultrafiltração, durante o período de estocagem.

Análises microbiológicas				
Dias	Coliformes 30 °C e 45 °C	Aeróbios mesófilos	Bactérias ácido-láticas	Bolores e leveduras
1	x	x	x	x
11		x	x	x
20		x	x	x
35		x	x	x
48		x	x	x

Legenda: x - análises realizadas.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Tabela 5 – Análise sensorial e colorimétrica realizada na bebida carbonatada fermentada por kefir à base de soro permeado de ultrafiltração, durante o período de estocagem.

Tempo de estocagem (dias)	13	27	35	55	63
Análise sensorial	x	x	x	x	x
Tempo de estocagem (dias)	14	22	36	50	-
Análise de cor	x	x	x	x	-

Legenda: x - análises realizadas.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises de gordura, acidez total, pH, resíduo mineral fixo (RMF), extrato seco total, proteína, densidade e umidade foram realizadas em amostras de leite, soro permeado e bebida, de acordo com os métodos descritos na Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). A viscosidade aparente foi determinada pelo método instrumental utilizando viscosímetro rotatório (Brookfield® RTV), conforme descrito por PEREIRA *et al.* (2001). Todas as análises físico-químicas foram realizadas em duplicata.

4.4 ANÁLISE DE COR

A análise colorimétrica foi realizada através de leitura direta da refletância do sistema de coordenadas L^* , a^* e b^* , aplicando a escala de cor CIELAB com o iluminante D65 e um ângulo de observação de 10° . O colorímetro utilizado foi o Hunter Lab (Colorquest XE, Reston, EUA). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As contagens de coliformes a 30°C e a 45°C foram realizadas para a bebida à base de soro permeado de ultrafiltração, fermentada por kefir e carbonatada, utilizando-se as técnicas de contagem em placas *Petrifilm*, de acordo com a metodologia e material, citados a seguir, e com os procedimentos determinados pelo fabricante, sendo indicados para análises em leite e produtos lácteos (PARK, 2004):

- Contagem de coliformes a 30°C e a 45°C – *Petrifilm E.coli/Coliform Count Plate*, 3M, NM-USA (AOAC 991.14 – Contagem de Coliformes e *E. coli* em alimentos, película Reidratável Seca).

A contagem de aeróbios mesófilos, bactérias ácido-láticas e bolores e leveduras foram realizadas conforme metodologia descrita por Silva *et al.* (2010). A contagem de aeróbios mesófilos foi realizada por plaqueamento em profundidade em ágar padrão para contagem (PCA) e incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48h. A contagem de bactérias ácido-láticas foi realizada por plaqueamento em profundidade em ágar MRS (Man Rogosa e Sharpe) e M17 adicionados de Ciclohexamida (200mg/L). As placas foram incubadas a 37°C por 48h em jarros com atmosfera microaerófila. A contagem de bolores e leveduras foi realizada por plaqueamento em superfície em Agar PDA (Batata Dextrose) acidificado com ácido tartárico e incubação a 30°C por 72h. A confirmação foi realizada através de análise morfológica ao microscópio óptico.

4.6 ANÁLISE SENSORIAL

Foram realizados testes de aceitação utilizando a escala hedônica de nove pontos (Figura 13) (CHAVES; SPROESSER, 1996; MINIM, 2010). As avaliações foram realizadas no laboratório de análise sensorial da EPAMIG ILCT nos tempos 13, 27, 35, 55 e 63 dias após a fabricação da bebida. O teste de aceitação foi realizado para cada repetição (R1, R2, R3 e R4), empregando-se um número mínimo de 30 provadores não treinados e selecionados aleatoriamente por sessão totalizando 206 julgamentos durante o experimento. As amostras foram servidas refrigeradas a 5°C em copos descartáveis de 50 mL.

Figura 13 - Escala hedônica de nove pontos, usada para avaliar a aceitação da bebida desenvolvida.

ESCALA HEDÔNICA	
Nome: _____	Data: ____ / ____ / ____
Por favor, avalie a amostra utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou do produto. Marque a posição da escala que melhor reflita seu julgamento.	
Código da amostra: _____	
<input type="checkbox"/> Gostei extremamente	
<input type="checkbox"/> Gostei muito	
<input type="checkbox"/> Gostei moderadamente	
<input type="checkbox"/> Gostei ligeiramente	
<input type="checkbox"/> Indiferente	
<input type="checkbox"/> Desgostei ligeiramente	
<input type="checkbox"/> Desgostei moderadamente	
<input type="checkbox"/> Desgostei muito	
<input type="checkbox"/> Desgostei extremamente	
Comentários: _____	

Fonte: Adaptado de MINIM (2010).

4.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

O delineamento utilizado para a análise dos dados foi blocos casualizado, sendo considerado quatro tempos (1, 10, 20, 35 e 48 dias) e quatro repetições. Os dados foram submetidos ao teste de Anderson-Darling a fim de determinar o tipo de distribuição, sendo que os dados para bolores e leveduras, coordenada L da análise

de cor e análise sensorial apresentaram distribuição não-normal. Esses dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Tukey com significância $P < 0,05$. Os demais dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey com significância $P < 0,05$. As análises foram realizadas com o auxílio do programa SISVAR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as análises dos resultados obtidos neste estudo para todos os parâmetros avaliados, como análise físico-química, microbiológica, estabilidade durante estocagem e aceitação da bebida.

5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO LEITE, DO PERMEADO DE ULTRAFILTRAÇÃO E DA BEBIDA ELABORADA

Os resultados das análises físico-químicas e composição centesimal do leite e do permeado utilizado para a elaboração da bebida, assim como o resultado das análises da bebida após 14 dias de armazenamento, encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Resultados das análises físico-químicas e da composição centesimal do leite, permeado de ultrafiltração e da bebida fabricada à base de soro permeado de ultrafiltração, fermentada por kefir e carbonatada (14 dias de armazenamento). Valores médios (n=4) ± desvio padrão.

Parâmetro	Leite	Permeado	Bebida
Acidez (% m/v ácido láctico)	0,16 ± 0,06	0,07 ± 0,01	0,77 ± 0,03
pH	6,64 ± 0,06	6,39 ± 0,04	3,47 ± 0,02
Gordura (% m/v)	3,30 ± 0,10	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Densidade (g/L)	1031,70 ± 0,10	1026,70 ± 2,50	-
Proteína (% m/v)	3,22 ± 0,18	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,02
RMF (% m/v)	0,98 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,49 ± 0,00
EST (% m/v)	12,04 ± 0,10	3,94 ± 0,06	9,91 ± 0,98
Umidade (% m/v)	87,96 ± 0,10	96,07 ± 0,06	90,09 ± 0,98
Viscosidade (mPa.s)	-	-	21,00 ± 2,57

Legenda: EST = extrato seco total; RMF = resíduo mineral fixo.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

No processo de ultrafiltração do leite o material macromolecular, como proteínas e gorduras, é retido pela membrana enquanto solutos com menor peso molecular, como lactose, minerais, nitrogênio não proteico, vitaminas hidrossolúveis

e água, permeiam a membrana (ETZEL; ARUNKUMAR, 2015; KELLY, 2011, PARASHAR *et al.*, 2015). Assim o permeado consiste em uma solução com alta umidade, 0% (m/v) de gordura e baixas concentrações de proteína, resíduo mineral fixo e extrato seco total quando comparado ao leite (Tabela 6). Podemos observar também que a composição físico-química da bebida elaborada é muito similar a composição do permeado, quanto à gordura, proteína e RMF. Em relação ao extrato seco total (EST), a bebida apresentou um valor superior ao do permeado devido a inclusão de açúcar na formulação da bebida.

A bebida elaborada tem composição nutricional semelhante ao preconizado pela legislação de suplemento hidroeletrólítico, como minerais (principalmente sódio, potássio e cálcio), carboidratos (até 8% m/v) e vitaminas (BRASIL, 2010). Um fator nutricional importante que pode ser ressaltado é a presença nutrientes neste coproduto, pois segundo Fontes *et al.* (2015) o permeado é rico em vitaminas como a riboflavina (B2), niacina (B3), ácido pantotênico (B5) e biotina (B7).

No estudo realizado por Fontes *et al.* (2015), onde elaboraram uma bebida à base de permeado da ultrafiltração de leite, observou-se que os valores encontrados para a acidez, proteína, umidade e pH e foram similares aos encontrados neste estudo. Já o valor obtido para RMF foi inferior, esta variação pode estar relacionada a composição do leite utilizado para a produção do permeado, a membrana de ultrafiltração e/ou equipamento utilizado.

A Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea, no que tange ao teor de proteína, traz como teor mínimo de proteína 1,0% (m/v) para bebida láctea fermentada com adições ou bebida láctea fermentada com produto(s) ou substância(s) alimentícia(s) (BRASIL, 2005). O teor de proteína apresentado pela bebida fabricada foi de 0,12% (m/v), não atendendo ao estabelecido pela legislação de bebidas lácteas. Assim, apesar de ser uma bebida à base de leite ou laticínios o produto desenvolvido ainda não se enquadra e não possui regulamentação específica na legislação brasileira, o que não impede de pleitear registro, podendo ser registrado como uma inovação tecnológica junto serviço de inspeção federal.

5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA DURANTE A ESTOCAGEM

A bebida elaborada com soro permeado de ultrafiltração apresentou estabilidade da acidez titulável durante 34 dias de armazenamento, sem diferença significativa ($p > 0,05$) (Tabela 7). A estabilidade da acidez demonstra que o tratamento térmico, a refrigeração e a carbonatação foram eficientes para conservação da bebida impedindo a pós-acidificação do produto no armazenamento, uma vez que o aumento na acidez pode ser um indicador de crescimento microbiano. Nos estudos realizados por Fontes *et al.* (2015) e Ferreira (2017) a acidez total manteve-se estável e com valores similares aos obtidos neste estudo.

Tabela 7 – Análise da acidez total e pH da bebida fabricada à base de soro permeado de ultrafiltração, fermentada por kefir e carbonatada durante os períodos de estocagem. Valores médios (n=4) ± desvio padrão.

Período de estocagem (dias)	Acidez total (% de ácido láctico m/v)	pH
6	0,77 ± 0,03 ^b	3,47 ± 0,02 ^a
20	0,82 ± 0,04 ^b	3,46 ± 0,02 ^a
34	0,83 ± 0,05 ^b	3,47 ± 0,03 ^a
50	0,94 ± 0,04 ^a	3,42 ± 0,03 ^a

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.
Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Acidez mais elevada da bebida foi observada somente no último tempo aos 50 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Este aumento na acidez total pode estar relacionado a pós-acidificação do produto devido à fermentação dos constituintes da bebida pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir, uma vez que a bebida se manteve estável microbiologicamente. Pereira *et al.* (2015) ao analisar a acidez total da bebida elaborada a partir de permeado de ultrafiltração e fermentadas a partir da inoculação de grãos de kefir, observaram um aumento expressivo da acidez de 0,73 g de ácido láctico/100 mL para 3,20 g de ácido láctico/100 mL, nas primeiras 24h de armazenamento. Esse aumento expressivo da acidez total pode ter ocorrido devido ao fato dos autores terem adicionado concentrado de proteína de soro de leite à

bebida, produto que possui muita lactose em sua composição e pode aumentar a disponibilidade de nutrientes para fermentação e conseqüentemente aumentar a acidez total.

Em relação ao pH, a bebida elaborada com soro permeado de ultrafiltração apresentou pH igual a 3,47 após 6 dias de fabricação e manteve estabilidade durante todo o período de armazenamento (Tabela 7), sem diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Apesar do aumento significativo ($p < 0,05$) da acidez após os 50 dias de armazenamento da bebida não houve interferência no pH. Este fato se deve a forma de medição da acidez e do pH e também ao fato de o aumento na acidez não ter sido suficiente para impactar no pH. A resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010 da ANVISA e a Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), não trazem definições de valores de pH para as bebidas hidroeletrólíticas e bebidas lácteas, respectivamente (BRASIL, 2010; BRASIL, 2005). Fontes *et al.* (2015) e Ferreira (2017) obtiveram valores de pH similares em suas bebidas. Valores de pH abaixo de 7 são ideais para a manutenção da estabilidade microbiológica da bebida, uma vez que limita o crescimento da maioria dos microrganismos (JAY, 2005).

5.3 ANÁLISE DE COR

Os valores de luminosidade (L^*) (Tabela 8) indicaram que a bebida elaborada apresentou cor clara e ao longo do período de armazenamento obteve-se aumento do valor dessa coordenada. O aumento da coordenada L^* segundo Ferreira (2017) pode estar correlacionado a perda dos pigmentos carotenoides e da riboflavina, o que confere maior luminosidade e tonalidade amarela à bebida.

Tabela 8 – Resultados das análises colorimétricas da bebida durante os períodos de estocagem. Valores médios (n=4) ± desvio padrão.

Período de estocagem (dias)	L*	a*	b*
14	82,27 ± 1,35 ^c	- 1,01 ± 0,06 ^{ab}	8,95 ± 0,46 ^{ab}
22	86,43 ± 1,67 ^b	- 0,85 ± 0,12 ^a	10,44 ± 0,71 ^a
36	96,06 ± 1,19 ^a	- 1,25 ± 0,32 ^{bc}	8,90 ± 1,47 ^b
50	96,49 ± 0,57 ^a	- 1,56 ± 0,29 ^c	9,44 ± 1,32 ^{ab}

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Fontes *et al.* (2015), Ferreira (2017) e Sabioni *et al.* (2016) obtiveram valores de L* inferiores aos obtidos neste estudo, ou seja, suas bebidas à base de permeado de ultrafiltração apresentaram cores mais escuras. Ferreira (2017) e Sabioni *et al.* (2016) adicionaram extratos de pequi e açaí em sua bebida, o que pode estar correlacionado com a menor luminosidade encontrada.

A coordenada a* forneceu um valor negativo, indicando que este se aproximou mais do eixo da cromaticidade verde. Os valores para a coordenada b* foram positivos indicando que se aproximou mais do eixo da cromaticidade amarelo. Assim no espaço de cor CIELAB, os resultados obtidos indicam que a cor da bebida encontra-se entre verde e amarelo, mesmas cores do permeado utilizado para fabricação da bebida. No estudo realizado por Fontes *et al.* (2015) e Ferreira (2017), as bebidas elaboradas também apresentaram cor clara entre amarelo e verde. Já a bebida elaborada por Sabioni *et al.* (2016) apresentou cor entre o vermelho e amarelo, resultado que pode estar correlacionado ao fato da bebida ter sido adicionada de extratos naturais de açaí, que são ricos em antocianinas. Esses pigmentos variam entre o vermelho e azul.

5.4 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA

As análises microbiológicas realizadas incluíram a contagem de coliformes a 30 °C e 45 °C, aeróbios mesófilos, bolores e leveduras e bactérias ácido-láticas. A Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) traz como critério microbiológico para bebidas

láticas fermentadas a contagem de coliformes a 30 °C entre 10 UFC. mL⁻¹ e 100 UFC. mL⁻¹ em duas amostras para cada cinco analisadas (n=5; c=2; m=10; M=100). Para coliformes a 45 °C a Instrução Normativa determina a contagem entre <3 UFC. mL⁻¹ e 10 UFC. mL⁻¹ em duas amostras para cada cinco analisadas (n=5; c=2; m=<3; M=10) (BRASIL, 2005). No presente estudo nenhuma das amostras apresentou contagens de coliformes a 30 °C ou 45 °C. Logo levando-se em consideração os critérios microbiológicos para bebidas lácteas fermentadas a bebida elaborada atende à legislação vigente para este produto.

No que tange à legislação para bebidas hidroeletrólíticas, a resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010 da ANVISA não traz critérios microbiológicos (BRASIL, 2010). No entanto a resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA, que trata o Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos destinados ao consumo humano, traz padrões microbiológicos para sucos, refrescos, refrigerantes e outras bebidas não alcoólicas. Nesta resolução é definido que o produto esteja ausente de coliformes a 35 °C (BRASIL, 2001). O resultado obtido também atende aos critérios estabelecidos por esta resolução.

Em relação a contagem de aeróbios mesófilos a Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do MAPA, traz para bebidas lácteas pasteurizadas o máximo de duas amostras em cinco analisadas com a presença de aeróbios mesófilos entre $7,5 \times 10^4$ UFC.mL⁻¹ e $1,5 \times 10^5$ UFC. mL⁻¹ (n = 5; c = 2; m = $7,5 \times 10^4$ UFC. mL⁻¹; M = $1,5 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹) (BRASIL, 2005). Em Log UFC/mL, os valores determinados pela legislação estão entre 4,88 Log UFC/mL e 5,18 UFC/mL. A bebida elaborada encontrou-se acima do limite estabelecido por esta normativa (Tabela 9). Este fator relaciona-se ao fato da bebida produzida ser fermentada e permanecer com a presença de bactérias viáveis no produto final.

Tabela 9 – Análise microbiológica (contagem de aeróbios mesófilos, bolores e leveduras e bactérias lácticas) da bebida elaborada. Valores médios (n=4) ± desvio padrão.

Período de estocagem (dias)	Aeróbios mesófilos (Log UFC/mL)	Leveduras (Log UFC/mL)	Bactérias ácido-láticas (Log UFC/mL)
1	5,62 ± 0,20 ^{ab}	5,77 ± 0,24 ^b	6,39 ± 0,68 ^a
11	5,98 ± 0,33 ^a	6,64 ± 0,13 ^a	7,02 ± 0,31 ^a
20	5,86 ± 0,23 ^{ab}	6,87 ± 0,17 ^a	6,78 ± 0,20 ^a
35	5,75 ± 0,32 ^{ab}	6,67 ± 0,18 ^a	6,66 ± 0,30 ^a
48	5,46 ± 0,16 ^b	6,81 ± 0,12 ^a	6,72 ± 0,19 ^a

Médias seguidas de uma mesma letra na coluna não diferem entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Ferreira (2017) obteve em seu estudo valores inferiores a 1,52 Log UFC/mL nas contagens de aeróbios mesófilos nas diferentes condições avaliadas. O autor analisou a contagem de aeróbios mesófilos nas temperaturas de 4 °C e 25 °C e na ausência e na presença de luz, durante 30 dias de armazenamento. Já Fontes *et al.* (2015) obteve contagens inferiores a 2,63 Log UFC/mL durante os 30 dias de armazenamento, a 7 °C e 25 °C. Os resultados divergentes aos obtidos neste estudo podem estar relacionados ao fato de as bebidas produzidas pelos autores citados não serem fermentadas.

A contagem de bolores e leveduras ficou entre 5,77 e 6,87 Log UFC/mL, apresentando aumento significativo de crescimento apenas a partir do primeiro dia de armazenamento. No período de 10 a 48 dias de armazenamento a bebida manteve-se estável (Tabela 9). A Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do MAPA e as resoluções RDC nº 18, de 27 de abril de 2010 e a RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA não trazem critérios microbiológicos para bolores e leveduras (BRASIL, 2005; BRASIL, 2010; BRASIL, 2001). Pereira *et al.* (2015) que avaliaram bebidas fermentadas à base de soro permeado obtiveram contagens de leveduras acima de 6 Log UFC/mL, similar ao encontrado neste estudo.

A contagem de bactérias ácido-láticas não apresentou diferenças significativa de crescimento durante todo o período de armazenamento avaliado. As contagens variaram entre 6,39 e 7,02 Log UFC/mL (Tabela 9). Pereira *et al.* (2015) obtiveram contagens para bactérias ácido-láticas acima de 7 Log UFC/mL, com viabilidade após 14 dias de armazenamento, esta diferença entre os trabalhos pode estar relacionada à quantidade de nutriente disponíveis nos dois produtos. Conforme a Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do MAPA os microrganismos utilizados para a fermentação devem permanecer viáveis e ativos e na mesma concentração durante todo o prazo de validade do produto (BRASIL, 2005), conforme foi observado no presente estudo. A instrução também traz que as bebidas lácteas fermentadas devem apresentar uma contagem total de bactérias lácticas viáveis de no mínimo 10^6 UFC/mL. O valor corresponde a 6 Log UFC/mL, logo a bebida elaborada atendeu a este critério estabelecido pela legislação para bebidas lácteas fermentadas.

O consumo de produtos com microrganismos probióticos, como as bactérias ácido-láticas, traz benefícios quando consumidos em produtos alimentícios que contenham contagens entre 6 e 7 Log UFC/mL de microrganismos viáveis por grama de produto (FERREIRA, 2017). Assim a bebida elaborada, pode além de auxiliar na nutrição e reposição de eletrólitos, contribuir para o consumo de microrganismos probióticos que estão naturalmente presentes no Kefir.

5.5 ANÁLISE SENSORIAL

A bebida elaborada apresentou-se homogênea com coloração amarelo-esverdeada, ácida e produziram sensação refrescante devido a carbonatação e adição de aroma de limão, conforme descrição de alguns provadores e opinião dos especialistas durante o desenvolvimento do produto. O permeado de ultrafiltração, matéria-prima base da bebida, é um coproduto da indústria láctea e invariavelmente é descartado pelas indústrias. Logo, o desenvolvimento de produtos que apresentem aceitação pelos consumidores é fundamental.

A bebida elaborada foi igualmente aceita pelos provadores, independente do período de armazenamento. A análise estatística apontou que as médias de aceitação não diferiram significativamente ($p < 0,05$) independente do tempo de armazenamento (Tabela 10). A boa aceitação da bebida pelos provadores durante

todo o tempo de armazenamento deve-se a manutenção das características sensoriais e ao não desenvolvimento de sabores ou aromas indesejáveis. A manutenção da estabilidade microbiológica, do pH e a ausência do crescimento de microrganismos deteriorantes propiciaram a manutenção das características da bebida e logo, sua boa aceitação. Além disso o fato da bebida ser carbonatada, apresentando a formação de bolhas, espuma e a sensação de queimação/formigamento pode ter influenciado a percepção de aromas e sensação de sabor pelos provadores influenciando na sua boa aceitação. Ferreira (2017) em sua análise de aceitação da bebida fabricada com aroma de abacaxi e maracujá, também não encontraram diferença significativa no teste de aceitação.

Tabela 10 – Análise sensorial da bebida fabricada durante os períodos de estocagem. Valores médios (n=39) ± desvio padrão.

Período de estocagem (dias)	Notas na escala hedônica
13	7,18 ± 1,35 ^a
27	7,05 ± 1,31 ^a
35	7,76 ± 0,86 ^a
55	6,68 ± 1,91 ^a
63	7,19 ± 1,75 ^a
Média	7,17 ± 0,39

Médias não diferiram significativamente entre si pelo teste de Kruskal-Wallis. Fonte: Elaborada pelo autor (2022).

Pereira *et al.* (2015) observou em seu estudo maior aceitação para a bebida adicionada de concentrado de soro e fermentada com grãos de kefir e fermentos comerciais. As bebidas fabricadas com permeado de ultrafiltração foram em média 25% menos aceitas pelos provadores. Segundo Ferreira (2017) para predizer se um produto possui boa aceitação pelos consumidores o ideal é que o índice de aceitação do produto esteja acima de 70%. Valores acima deste percentual, que na escala hedônica seria de 6,3, indicam boa aceitação do produto. Considerando a escala hedônica utilizada a bebida obteve notas acima de 7, ficando entre os termos hedônicos “gostei moderadamente” e “gostei muito”, indicando uma boa aceitação

do produto. Logo, a bebida fabricada à base de soro permeado de ultrafiltração, fermentada por kefir e carbonatada constituiu-se em um produto atrativo para fabricação em larga escala, pois foi bem aceita pelos consumidores, além de ter como matéria-prima um coproduto da indústria de laticínios.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste estudo foi possível chegar as seguintes conclusões:

- É possível a utilização de um coproduto da indústria de laticínios, o permeado de ultrafiltração, para elaboração de uma bebida fermentada por kefir e carbonatada;
- A composição físico-química da bebida atendeu aos critérios da resolução RDC nº 18, de 27 de abril de 2010 da ANVISA;
- A bebida elaborada apresentou boa aceitação sensorial durante o período de armazenamento sob refrigeração;
- A bebida manteve os valores de acidez total e pH estáveis durante o período de 34 dias de armazenamento sob refrigeração;
- A bebida apresentou estabilidade microbiológica e contagens de bactérias ácido-láticas acima de 6 Log UFC/mL durante o armazenamento, atendendo ao disposto na Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005 do MAPA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, S.; AHMED, S. M. Application of membrane technology in food processing. *In: MALIK, A.; ERGINKAYA, Z.; AHMAD, S.; ERTEN, H. (eds) Food Processing: Strategies for Quality Assessment. Food Engineering Series. New York: Springer, 2014. p. 379-394.*
- ALTUNTAS, S.; HAPOGLU, H. Kefir-Type Drinks From Whey. *In: GRUMEZESCU, A. M.; HOLBAN, A. M. Non-Alcoholic Beverages. Elsevier, 2019. p. 185-226.*
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; RODRIGUES JÚNIOR, P. H.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 3, p. 212-226, 2014.
- ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de *Lactobacillus Delbrueckii* UFV H2b20 e de Inulina.** 2007. 54f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG, 2007.
- BALDASSO, C. **Concentração, purificação e fracionamento das proteínas do soro lácteo através da tecnologia de separação por membranas.** 2008. 163 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, p. 381–386, 2011.
- BENA, D. W. Carbonated Beverages. *In: HUI, Y. H. (Ed.) Handbook of Food Products Manufacturing.* New York: John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. 417-442.
- BARILE, D.; TAO, N.; LEBRILLA, C.B.; COISSON, J.D.; ARLORIO, M.; GERMAN, J.B. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 524–530, 2009.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 out., 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução - RDC nº 18, de 27 de abril de 2010, dispõe sobre alimentos para atletas. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 28 de abr., 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 dezembro de 2006, dispõe os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 de dez., 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 agosto de 2005, dispõe sobre o regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 de ago., 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria nº 398, 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. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 03 maio. 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). 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. Resolução nº 18, de 3 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 04 dez. 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Resolução nº 19, de 10 de dezembro de 1999. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 dez. 1999c.

CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CARVALHO, N. C. de. **Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa-MG, Editora UFV, 1995. 81 p.

CHEN, G. Q.; LEONG, T. S.H.; KENTISH, S. E.; ASHOKKUMAR, M.; MARTIN, G. J. O. Membrane Separations in the Dairy Industry. *In: GALANAKIS, C. (Ed.) Separation of Functional Molecules in Food by Membrane Technology*. Elsevier, 2019, 432p.

CHIFIRIUC, M. C.; CIOACA, A. B.; LAZAR, V. In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. **Anaerobe**, v.17, n.6, p.433-435, 2011.

- DIEZ-GONZALEZ, F.; JARVIS, G. N.; ADAMOVICH, D. A.; RUSSELL, J. B. Use of carbonate and alkali to eliminate *Escherichia coli* from dairy cattle manure. **Environmental Science and Technology**, n. 34, p. 1275–1279. 2000.
- ETZEL, M. R.; ARUNKUMAR, A. Dairy protein fractionation and concentration using charged ultrafiltration membranes. *In*: HU, K.; DICKSON, J. M. **Membrane Processing for Dairy Ingredient Separation**. John Wiley & Sons, Ltd., 2015, 279p.
- EVAGELISTA, J. **Alimentos**: um estudo abrangente. São Paulo: Atheneu, 2005.
- FAEDO, R.; BRIÃO, V.B.; CASTOLDI, S.; GIRARDELLI, L.; MILANI A. Obtenção de leite com baixo teor de lactose por processos de separação por membranas associados à hidrólise enzimática. **Revista CIATEC**, v.3, n.1, p. 44-54, 2013.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Londres, Ontário, Canadá: FAO/WHO, 2002. 11p.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Codex Standard for Fermented Milks, n°. 243. Washington, DC: FAO/WHO, 2003. 8p.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001.
- FARAG, M.A.; JOMAA, S.A.; EL-WAHED, A.A.; EL-SEEDI, H.R. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, v. 12, n.346, p.2-21, 2020.
- FARNWORTH, E. R. **Kefir – a complex probiotic**. Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods, v. 2, p. 1-17, 2005.
- FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir - A fermented milk product. *In*: FARNWORTH, E.R. (Ed.) **Handbook of fermented functional foods**. New York: Taylor & Francis Group, 2008. p. 89-127.
- FERREIRA, L.R. **Bebida isotônica formulada a base de permeado obtido da ultrafiltração do soro de leite adicionado de carotenoides em pó de pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.
- FONTES, E.A.F.; ALVES, Y.P.C.; FONTES, P.R.; MINIM, V.P.R. Bebida eletrolítica a base de permeado da ultrafiltração de leite: avaliação física, química e microbiológica durante o armazenamento. **Ciência Rural**, v.45, n.2, p.342-348, 2015.
- FRANKOWSKI, K. M.; MIRACLE, R.E.; DRAKE, M. A. The role of sodium in the salty taste of permeate. **Journal of Dairy Science**, v.97, n.9, p. 5356–5370, 2014.

- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterization of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.
- GERDES, S.K.; RICHLANDTOWN, P. A. Using lactose and permeate in baked goods. *In*: PAGE, J.; MEYER, D.; HAINES, B.; LAGRANGE, V.; KENNEY, A.; CLARK, JR., W.S. **Reference Manual for U. S. whey and lactose products**, 2011, p. 106-108.
- GRØNNEVIK, H.; FALSTAD, M.; NARVHUS, J. A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 9, p. 601–606, 2011.
- GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.1, p.25-29, 2005.
- JARDIM, F. B. B. **Desenvolvimento de bebida láctea probiótica carbonatada: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2012. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) - Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara - SP, 2012.
- JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- KELLY, P.M. Milk Protein Products: Membrane-Based Fractionation. *In*: **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2. ed. 2011. p. 864 – 872.
- KESENKAŞ, H.; GÜRSOY, O.; ÖZBAŞ, H. Kefir. *In*: **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**. 2017. p. 339 – 361.
- KOTOVA, I. B.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Russian kefir grains microbial composition and its changes during production process. **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**, v. 932, p. 93–121, 2016.
- LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341–349, 2013.
- LIBUDZISZ, Z.; PIATKIEWICZ, A. Kefir production in Poland. **Dairy Industries International**, v. 55, n. 7, p. 31-33, 1990.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 67-74, 2006.
- LOSS, C. R.; HOTCHKISS, J. H. Use of dissolved carbon dioxide to extend the shelf-life of dairy products. **Dairy Processing**. Cornell University, USA. Published by Woodhead Publishing Limited Abington Hall, Abington Cambridge CB1 6AH England. v. 1, p. 391–410, 2003.

MAGNONI, D.; CUKIER, C.; GARITA, F. S. **Manual prático em terapia nutricional**. São Paulo: Savier, 2010.

MASSARI, M.R. **Substituição de lactose em pó micronizada por permeado de soro em pó micronizado em leite condensado: efeito sobre a cristalização da lactose, características físico-químicas, reológicas e microbiológicas**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

MININ, V. P. R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa. Editora UFV. 225 p. 2006.

MOHAMMAD, A.W.; YIN NG, C.; LIM Y.P.; HONG NG, G. Ultrafiltration in Food Processing Industry: Review on Application, Membrane Fouling, and Fouling Control. **Food and Bioprocess Technology**. v.5, n. 4, p.1143 – 1156, 2012.

MOMBELLI, B.; GISMONDO, M. R. The use of probiotics in medical practice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 531-536, 2000.

MORAIS, F., P.; COLLA, L., M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

NEJATI, F.; JUNNE, S.; NEUBAUER, P. A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. **Microorganisms**, v.8, n. 192, p. 1-10, 2020.

NOĞAY, N.H. Kefir beverage and its effects on health. *In: Milk-Based Beverages: The Science of Beverages*. 2019, v.9, p.273 – 296.

OTA, A. Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic *E. coli* O-157. **Medical Hypotheses**, v. 53, n. 1, p. 87-88, 1998.

OTLES, S.; CAGINDI, O. kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, p. 54-59, 2003.

OUWEHAND, A.C; SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279-289, 2002.

PARASHAR, A.; JIN, Y.; MASON, B.; CHAE, M.; BRESSLER, D.C. Incorporation of whey permeate, a dairy effluent, in ethanol fermentation to provide a zero waste solution for the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.3, p. 1859–1867, 2015.

PARK, Y. W., KALANTARI, A., FRANK, J. F. Changes in the microflora of commercial soft goat milk cheese during refrigerated and frozen-storage. **Small Ruminant Research**, v.53, p.61-66. 2004.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG, A.H.; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171-1185, 2006.

PAULA, J. C. J. **Elaboração e estabilidade de bebida carbonatada aromatizada à base de soro de leite**. 2005. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2005.

PELCHAT, M.L.; BRYANT, B.; CUOMO, R.; DI SALLE, F.; FASS, R.; WISE, P. Carbonation: A review of sensory mechanisms and health effects. **Nutrition Today**, v. 49, n. 6, p. 308-312, 2014.

PEREIRA, D. B. C.; SILVA, P. H. F.; DE OLIVEIRA, L. L.; COSTA JUNIOR, L. C. G. C. **Físico-química do leite e derivados – Métodos analíticos**. 2. ed. revisada e ampliada. Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 234 p.

PEREIRA, C.; HENRIQUES, M.; GOMES, D.; GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; ANTONI, G. Novel Functional Whey-Based Drinks with Great Potential in the Dairy Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 53, n. 3, p.307–314, 2015.

PRUKSASRI, S. Dairy stream lactose fractionation/concentration using polymeric ultrafiltration membrane. *In: Membrane Processes for Dairy Ingredient Separation*, 2015, p. 35 – 66.

RAVINDRA, M.R.; RAO, K.J.; NATH, B.S.; RAM, C. Carbonated fermented dairy drink – effect on quality and shelf life. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 11, p. 3397-3403, 2012.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p.S105-S110, 2002.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 404-408, 2005.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILASANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v.84, p.197-215, 2000.

SABIONI, R.C.; FONTES, E.A.F.; STRINGHETA, P.C.; VIDAL, P.S.; CARVALHO, M.R. Aproveitamento do permeado da ultrafiltração do soro de leite para a produção de bebida funcional, adicionada de corantes naturais extraídos do açaí (*euterpe oleracea mart.*). *In: XXXVI ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO*, João Pessoa/PB, Brasil, de 03 a 06 de outubro de 2016.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p.91-99, 2003.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, v. 110, n. 3, p. 283-295, 2008.

SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.M. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blucher, 2017. 560 p.

SINGH, P.; WANI, A. A.; KARIM, A. A.; LANGOWSKI, H. C. The use of carbon dioxide in the processing and packaging of milk and dairy products: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 1-17, 2011.

SMITH, S.T.; METZGER, L.; DRAKE, M.A. Evaluation of whey, milk, and delactosed permeates as salt substitutes. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 11, p. 1-12, 2016.

STANTON, C. *et al.* **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003.

SULLIVAN, A.; NORD, C. E. The place of probiotics in human intestinal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 20, p. 313-319, 2002.

TAMIME, A. Y.; WSZOLEK, M.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S2-S15, 2002.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

TE GIFFEL, M. C. Good hygienic practice in milk processing. **Dairy processing: improving quality**, Cambridge England, p.68-80, 2003.

VARDJAN, T.; LORBEG, P.M.; ROGELJ, I.; MAJHENIC, A.C. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2729–2736, 2013.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714-728, 2008.

VIANNA, P.C.B.; WALTER, E.H.M.; DIAS, M.E.F.; FARIA, J.A.F.; NETTO, F.M.; GIGANTE, M.L. Effect of addition of CO₂ to raw milk on quality of UHT-treated milk. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 8, p. 4256-4262, 2012.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

VIEJO, C.G.; TORRICO, D.D.; DUNSHEA, F.R.; FUENTES, S. Bubbles, foam formation, stability and consumer perception of carbonated drinks: a review of current, new and emerging technologies for rapid assessment and control. **Foods**, v. 8, n. 596, p. 1-19, 2019.

VIGNAGA, I.R.L. **Obtenção de etanol a partir da fermentação do permeado de soro de queijo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae***. 2017. Dissertação (Mestrado em Processos químicos e biotecnológicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2017.

VINDEROLA, C.G.; GUEIMONDE, M.; DELGADO, T.; REINHEIMER, J.A.; DE LOS REYES-GAVILAHN, C.G. Characteristics of carbonated fermented milk and survival of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 10, p.213-220, 2000.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

WODROOF, J. G.; PHILLIPS, G. F. **Beverages**: carbonated and noncarbonated. Revised Edition. AVI Publishing Company, 1981.

WYK, J.V. Kefir: the champagne of fermented beverages. *In: Fermented Beverages: The Science of Beverages*. 2019, v.5, p. 473 – 527.