



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

JÉSSICA LIMA DE MENEZES

**BEBIDAS FERMENTADAS POR KEFIR DE ÁGUA A PARTIR
DE SUCOS DE RESÍDUO DE ABACAXI**

Londrina
2018

JÉSSICA LIMA DE MENEZES

**BEBIDAS FERMENTADAS POR KEFIR DE ÁGUA A PARTIR
DE SUCOS DE RESÍDUO DE ABACAXI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida
Spinosa

Coorientadora: Dr^a. Denise da Fontoura Prates

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Menezes, Jéssica Lima de.

Bebidas fermentadas por kefir de água a partir de sucos de resíduo de abacaxi / Jéssica Lima de Menezes. - Londrina, 2018.
83 f. : il.

Orientador: Wilma Aparecida Spinosa.

Coorientador: Denise da Fontoura Prates.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2018.
Inclui bibliografia.

1. *Ananas* - Tese. 2. Cultura mista - Tese. 3. Bioprocessos - Tese. 4. Probiótico não láctico - Tese. I. Spinosa, Wilma Aparecida . II. Prates, Denise da Fontoura. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

JÉSSICA LIMA DE MENEZES

**BEBIDAS FERMENTADAS POR KEFIR DE ÁGUA A PARTIR DE
SUCOS DE RESÍDUO DE ABACAXI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA:

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida
Spinosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Caroline Maria Calliari
Universidade Tecnológica Federal do Paraná-
UTFPR

Profa. Dra. Patrícia de Miranda Brusantin
Universidade Paulista- UNIP

Londrina, 28 de fevereiro de 2018

Aos meus pais, Eurides e Manoel, pelo amor, motivação, confiança, pois nunca
mediram esforços para que eu chegasse até aqui.
Aos meus irmãos Leandro e Jaqueline, minha cunhada Adriana e minha sobrinha
Yasmim, pelo amor, amizade e incentivo.
Ao meu noivo Júnior, pelo amor, incentivo e compreensão.
Amo todos vocês.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder sabedoria em minhas escolhas, por me dar forças para não desistir dos meus sonhos e por toda proteção e fé, pois sem Ele não chegaria até aqui.

À Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Spinosa, pela orientação, apoio, compreensão e incentivo a acreditar que tudo daria certo.

À Dr^a. Denise da Fontoura Prates, pela coorientação, apoio, amizade, incentivo e palavras de conforto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições acerca desta dissertação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela oportunidade.

Aos docentes e demais profissionais por todo ensinamento, disposição e apoio.

À Coordenação, Secretaria e Chefia da Pós-graduação em Ciência de Alimentos, pela disposição, colaboração e atenção.

Ao laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação e Automação Analítica (DIA), coordenado pela Prof^a Dr^a. Suzana Lucy Nixdorf, pela oportunidade de realizar as determinações cromatográficas, conduzidas pelo doutorando em Química Lycio Shinji Watanabe.

Ao Laboratório Multiusuário de Análise de Materiais e Moléculas (LAMM) pelas análises de espectrometria de massas, coordenado pela Prof^a Dr^a. Elisabete Yurie Sataque Ono, na pessoa da técnica a Cristina, e colaboração do doutorando Lycio.

À Industria Redondo Polpa de Frutas pela doação do resíduo de abacaxi.

À Empresa Duas Rodas[®] por ceder o extrato de guaraná.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos de fundamental importância para realização e desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amados pais, Eurides e Manoel, por todo incentivo, amor, apoio, dedicação, e esforços para me proporcionar a oportunidade de estudar e melhorar minha formação profissional. Pelas ligações telefônicas de todos os dias, estando assim, sempre presentes no meu dia a dia. Obrigado por tudo, amo muito vocês.

Aos meus amados irmãos, Leandro e Jaqueline, e minha cunhada Adriana, por todos os ensinamentos, incentivos, apoio, conversas e por serem meus exemplos de pessoas honestas e determinadas, mostrando que podemos alcançar nossos sonhos através de nosso próprio mérito e esforço, sem precisar desmerecer alguém. Amo muito vocês, obrigado por existirem.

À minha linda e amada sobrinha Yasmim, que só nos trouxe orgulho e amor desde a sua chegada. Obrigada pelo apoio e amor incondicional e por acreditar que a tia chegaria até aqui. Te amo muito, minha princesa.

Ao meu noivo Júnior, por todo amor, apoio, compreensão e incentivo, pois mesmo longe estive sempre presente comigo e não me deixou desistir dos meus sonhos. Obrigado por fazer parte da minha vida, te amo muito.

À toda minha família, que sempre torcerem por minha vitória, meus padrinhos e madrinhas, tios, tias, primos e primas. Obrigado pelas orações e torcida mesmo longe.

Aos meus queridos amigos que fiz durante a trajetória do mestrado, Camila, Isadora, Raíssa, Jamile, José Renato e Fernanda, pela amizade, carinho, colaboração, companheirismo e risadas diárias que ajudaram a caminhada ser mais fácil.

Aos demais colegas do programa de pós-Graduação, em especial a Carol, Ana Clara, Rebeca, Thaísa, Marcela, pela amizade, conversas e colaboração.

Aos meus grandes e eternos amigos, Érica, Aline e Luiz, que apesar da distância sempre estiveram presentes. Obrigada pelas conversas e apoio nos momentos difíceis.

À todos aqueles que, direta ou indiretamente, mesmo não mencionado aqui, contribuíram e torceram para que eu pudesse vencer mais uma etapa importante da minha vida. Obrigada de coração.

MENEZES, Jéssica Lima. **Bebidas fermentadas por kefir de água a partir de sucos de resíduo de abacaxi**. 2018. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de frutas e o abacaxi está entre as principais, consumido *in natura* e utilizado na elaboração de produtos industrializados. No processo de industrialização ocorre a geração de resíduos, como cascas, bagaço, eixo central e coroa. Tais resíduos são ricos em nutrientes, açúcares simples e hidrolisáveis e podem ser empregados em processos fermentativos, inclusive para obtenção de bebidas. Os grãos de kefir são uma cultura mista de microrganismos e são usados na elaboração de bebidas fermentadas, com possíveis atribuições probióticas. Frente a isso, objetivou-se desenvolver bebidas fermentadas por kefir, a partir do extrato de resíduo de abacaxi, com e sem extrato de guaraná, com avaliação da aceitação sensorial e avaliar suas características físico-químicas e microbiológicas durante o armazenamento. Elaborou-se uma bebida controle (FC) e duas formulações, sendo uma delas com extrato do resíduo de abacaxi (ERA) sem adição de extrato de guaraná (F1) e a outra com ERA com extrato de guaraná (F2). A fermentação para elaboração das bebidas ocorreu em duas etapas, por 48 h. Após este período as bebidas fermentadas foram armazenadas a 4 °C por 7, 14 e 21 dias. O resíduo de abacaxi foi caracterizado quanto à composição proximal. Os ERA com e sem extrato de guaraná foram avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos pH, acidez total titulável (ATT), sólidos solúveis totais (SST), compostos fenólicos totais (CFT) e perfil de açúcares, ácidos orgânicos e etanol. Esses mesmos parâmetros, exceto CFT, foram avaliados em quatro tempos, durante a elaboração das formulações FC, F1 e F2, até ficarem prontas. Também foram avaliados os CFT e as atividades antioxidantes (FRAP e DPPH) nas bebidas prontas (FC, F1 e F2) e durante o período de armazenamento. As avaliações do resíduo de abacaxi e dos ERA evidenciaram que os mesmos puderam ser utilizados satisfatoriamente em processos fermentativos. Os resultados obtidos dos parâmetros pH, ATT e SST indicaram que os microrganismos presentes nos grãos de kefir adaptaram-se aos substratos do ERA. No armazenamento a 4 °C, para F1 e F2, o pH, ATT mantiveram-se estáveis por 7 e 14 dias, enquanto SST mantiveram-se estáveis por 21 dias. As bebidas F1 e F2 foram classificadas como alcoólicas. O teor de CFT das bebidas F1 e F2 foram significativamente ($p < 0,05$) maiores comparadas a FC e isso refletiu na atividade antioxidante. As contagens de bactérias do ácido láctico (BAL) mantiveram $\geq 10^7$ UFC.mL⁻¹ por 21 dias de armazenamento a 4 °C. As bebidas desenvolvidas foram sensorialmente aceitas em relação aos atributos avaliados. Conclui-se que é possível desenvolver bebidas fermentadas com kefir a partir dos ERA, e que as mesmas têm potencial para serem uma nova bebida não láctica apresentada ao mercado.

Palavras-Chave: Ananas. Cultura mista. Bioprocessos. Probiótico não láctico.

MENEZES, Jéssica Lima. **Pineapple residue in the development of fermented beverages by kefir**. 2018. 82 p. Dissertation (Master's degree in Food Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Brazil is among the world's largest fruit producers and pineapple is among the main ones, consumed *in natura* and used in the elaboration of industrialized products. In the process of industrialization occurs the generation of waste, such as bark, bagasse, central axis and crown. Such residues are rich in nutrients, simple sugars and hydrolysable and can be used in fermentation processes, including for obtaining beverages. The kefir grains are a mixed culture of microorganisms and are used in the elaboration of fermented beverages, with possible probiotic assignments. The objective of this study was to develop kefir fermented beverages from the extract of pineapple residue, with and without guarana extract, with evaluation of the sensorial acceptance and to evaluate its physico-chemical and microbiological characteristics during storage. A control drink (FC) and two formulations were prepared, one of which was with pineapple residue extract (PRE) without the addition of guarana extract (F1) and the other with EPR with guarana extract (F2). The fermentation to elaborate the drinks occurred in two stages, for 48 h. After this time the fermented beverages were stored at 4 °C for 7, 14 and 21 days. The pineapple residue was characterized for the proximal composition. The PRE with and without guarana extract were evaluated for physical and chemical parameters pH, total titratable acidity (TTA), total soluble solids (TSS), total phenolic compounds (TPC) and sugar, organic acids and ethanol profiles. These same parameters, except for TPC, were evaluated at four times during the elaboration of formulations FC, F1 and F2 until they were ready. TPC and antioxidant activities (FRAP and DPPH) in ready-to-drink (FC, F1 and F2) and during the storage period were also evaluated. The evaluations of the pineapple residue and the PRE showed that they could be used satisfactorily in fermentative processes. The results obtained from the pH, TTA and TSS parameters indicated that the microorganisms present in the kefir grains adapted to the substrates of the PRE. At storage at 4 °C, for F1 and F2, pH, TTA remained stable for 7 and 14 days, while TSS remained stable for 21 days. The F1 and F2 beverages were classified as alcoholic. The TPC content of F1 and F2 beverages were significantly ($p < 0.05$) higher compared to FC and this reflected the antioxidant activity. Lactic acid bacteria (BAL) counts maintained $\geq 10^7$ CFU.mL⁻¹ for 21 days of storage at 4 °C. The drinks developed were sensorially accepted in relation to the evaluated attributes. It is concluded that it is possible to develop kefir fermented beverages from the PRE, and that they have the potential to be a new non-lactic beverage presented to the market.

Keywords: *Ananas*. Mixed culture. Bioprocesses. Probiotic non-dairy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Abacaxizeiro	15
Figura 2 - Esquema frontal (a) e corte longitudinal (b) das partes do abacaxi.....	16
Figura 3 - Guaraná: (A) bastão; (B) sementes e (C) em pó.....	21
Figura 4 - Grãos de kefir de água (A) e grãos de kefir de leite (B)	24
Figura 5 - Fluxograma da elaboração das bebidas fermentadas por kefir.....	31

ARTIGO - DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS FERMENTADAS POR KEFIR DE ÁGUA A PARTIR DO SUCO DE RESÍDUO DE ABACAXI

Figure 1 - Fluxograma de elaboração das bebidas fermentadas por kefir.....	55
Figure 2 - Percentagem de bactérias (A) e leveduras (B) isoladas dos grãos de kefir de água.....	58
Figure 3 - Perfil de carboidratos das bebidas durante o processo de fermentação e tempo de armazenamento. A) Sacarose, B) Glicose e C) Frutose.....	65
Figure 4 - Perfil de etanol durante o processo de fermentação e tempo de armazenamento à 4 °C.....	66
Figure 5 - Viabilidade das BAL durante o tempo de armazenamento à 4 °C das bebidas fermentadas F1 e F2.....	68
Figure 6 - Intenção de compra para as bebidas fermentadas.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição de abacaxi cru em 100 gramas da parte comestível	17
Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos das cascas e dos bagaços de abacaxi.....	19
Tabela 3 - Bactérias e leveduras isoladas de kefir de água	25
Tabela 4 - Formulações para elaboração das bebidas fermentadas por kefir	30

ARTIGO - DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS FERMENTADAS POR KEFIR DE ÁGUA A PARTIR DO SUCO DE RESÍDUO DE ABACAXI

Tabela 1 - Formulações das bebidas fermentadas por kefir.....	54
Tabela 2 - Composição proximal do resíduo de abacaxi (RA).....	60
Tabela 3 - Caracterização do extrato do resíduo de abacaxi (ERA) e extrato do resíduo de abacaxi com extrato de guaraná (ERAEG).....	61
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e caracterização do perfil de ácidos orgânicos avaliados nas etapas de fermentação e durante o período de armazenamento	64
Tabela 5 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das bebidas prontas e durante o tempo de armazenamento de F1 e F2	67
Tabela 6 - Avaliação sensorial pelo teste de aceitação e índice de aceitação das bebidas elaboradas	69

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos específicos.....	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1.	Abacaxi.....	15
3.1.1.	Resíduo de abacaxi	18
3.2.	Extrato de guaraná	20
3.3.	Kefir	22
3.3.1.	Grãos de kefir	23
3.3.2.	Microbiota dos grãos de kefir.....	24
3.3.3.	Identificação dos microrganismos do kefir.....	26
3.3.4.	Elaboração do kefir de água.....	27
4.	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.	Materia.....	28
4.2.	Métodos.....	28
4.2.1.	Manutenção e preparo do inóculo	28
4.2.2.	Preparo dos substratos fermentescíveis.....	29
4.2.3.	Desenvolvimento das bebida fermentadas por kefir de água	29
4.2.4.	Análises físico-químicas	31
4.2.5.	Análises cromatográficas.....	37
4.2.6.	Avaliação da Capacidade antioxidante.....	39
4.2.7.	Análises microbiológicas	40
4.2.8.	Análise sensorial.....	42
4.2.9.	Análise estatística.....	42
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	Artigo: Desenvolvimento de bebidas fermentadas por kefir de água a partir de extrato de resíduo de abacaxi	50

6. CONCLUSÕES GERAIS.....	78
APÊNDICES	79
Apêndice A – Ficha de Avaliação Sensorial.....	80
Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	81
Apêndice C – Especificação Técnica do Material.....	83

1. INTRODUÇÃO

O abacaxi é um fruto tropical utilizado como matéria-prima para a fabricação de diversos produtos alimentícios industrializados, tais como suco, conservas e, minimamente processados. Aproximadamente, 65 a 75 % dos frutos são desperdiçados durante a industrialização ainda que possam ser utilizados para obtenção de produtos alimentícios através de processos biotecnológicos. Além disso, há um aumento crescente da produção de frutas tropicais e subtropicais e, em particular, na produção anual de abacaxi (KOBORI; JORGE, 2005; COSTA et al., 2007; LEONEL; LEONEL; SAMPAIO, 2014; CONESA et al., 2016).

O resíduo de abacaxi apresenta altos teores de carboidratos, tais como celulose, hemicelulose e pequena quantidade de pectina, que são potencialmente hidrolisáveis em mono e dissacarídeos, e glicose, frutose e sacarose, podendo ser empregados em processos fermentativos na elaboração de novos produtos que podem agregar valor à cadeia de processamento de frutos (SOUSA, 2009; CANTERI et al., 2012; CONESA et al., 2016).

Novas bebidas, além das tradicionalmente disponibilizadas para comercialização, são foco de pesquisas de desenvolvimento de novos produtos. A exemplo dessas, estão as bebidas fermentadas não lácteas, produzidas a partir de uma variedade de substratos, incluindo vegetais, sucos de frutas exóticas, extrato de soja, cereais, resíduos de vegetais (cascas, bagaços) e outros (MARSH et al., 2014).

As bebidas fermentadas são uma alternativa para a obtenção de produtos com maior vida útil e valor agregado. Algumas bebidas fermentadas proporcionam efeitos benéficos através da ação probiótica/microbiana direta e indireta pela produção de metabólitos, tais como ácidos orgânicos e quebra de proteínas complexas (MUNIZ et al., 2002; MARSH et al., 2014).

O kefir de água é uma bebida fermentada levemente ácida contendo etanol e dióxido de carbono (CO₂), seus grãos fermentam os açúcares dando origem à bebida. Estes grãos são constituídos por polissacarídeos em associação com uma simbiose de microrganismos e, consistem principalmente de diferentes leveduras e BAL (WALDHERR et al., 2010).

As bebidas com adição de componentes estimulantes foram lançadas no mercado em 1987 e desde então, vem crescendo em todo o mundo. O guaraná

(*Paullinia cupana*) é um fruto com ação estimulante, devido ao alto conteúdo de cafeína (2,5 a 6 %) e possui propriedades adstringentes e antioxidantes, por ter em sua composição taninos condensados ou proantocianidinas (polímeros de catequina e/ou epicatequinas). O conteúdo de cafeína do extrato de guaraná é 4 vezes maior que o do café, 10 vezes maior do que o do chá, e 30 vezes maior do que o do cacau (CARVALHO et al., 2006; RIBEIRO; COELHO, 2012).

A procura por bebidas com apelo saudável vem se tornando crescente, devido à preocupação com a saúde e corpo. Contudo, no Brasil as categorias saudáveis ainda são dependentes dos consumidores contínuos, concentrados principalmente na região Sudeste (NILSEN, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Desenvolver bebidas fermentadas por kefir, a partir do extrato de resíduo de abacaxi, com e sem extrato de guaraná, com aceitação sensorial e monitorar suas características físico-químicas e microbiológicas durante o armazenamento.

2.2. Objetivos específicos

Caracterizar o resíduo de abacaxi e os extratos deste quanto à composição proximal e os parâmetros: pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, compostos fenólicos totais, teor de ácidos orgânicos, açúcares e etanol;

Identificar os microrganismos presentes na cultura mista dos grãos de kefir;

Desenvolver bebidas fermentadas por kefir, a partir do extrato de resíduo de abacaxi, com e sem extrato de guaraná e avaliar as bebidas fermentadas por kefir, quanto à composição físico-química, pH, sólidos solúveis totais, acidez total titulável, perfil de carboidratos, ácidos orgânicos e teor de etanol, durante seu processo de fermentação;

Avaliar o teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante das bebidas fermentadas por kefir;

Monitorar a estabilidade físico-química e a viabilidade celular das BAL das bebidas F1 e F2 durante 7, 14 e 21 dias de armazenamento, a 4°C;

Avaliar a aceitação sensorial das bebidas F1 e F2 refrigeradas a 4° C, por 4h, logo após o término da segunda etapa de fermentação;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Abacaxi

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de frutas e a maior parte de sua produção é absorvida pelo mercado interno. Dentre as principais frutas produzidas estão bananas, maçãs, uvas, melões e frutas tropicais, como manga, abacate e abacaxi. A expansão de áreas e as melhorias nas produções contribuíram para o aumento de produção, das principais variedades de frutas. O abacaxi é uma das frutas mais importantes, em relação ao volume total de expansão de produção. Na última década, sua produção variou entre 2,2 e 2,7 megatoneladas (Mt), podendo aumentar para 2,9 Mt na próxima década, devido à crescente demanda interna (OCDE-FAO, 2015).

O abacaxi (*Ananas comosus (L) Merrill*) é uma fruta de região tropical, proveniente do abacaxizeiro (Figura 1), caracterizado por ser uma planta monocotiledônea, herbácea perene, da família Bromeliaceae. Esse vegetal pode ser dividido em dois grupos: as epífitas, que crescem sobre outras plantas, e as terrestres, dos gêneros *Ananas* e *Pseudananas*, que crescem próximas ao solo. Na família das Bromeliaceae são conhecidos cerca de 50 gêneros e 2000 espécie de abacaxis (EMBRAPA, 2000).

Figura 1 - Abacaxizeiro



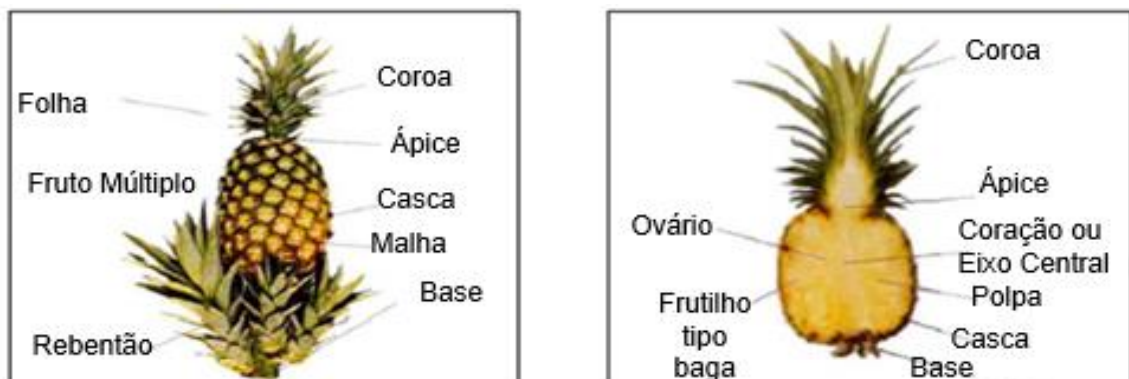
Fonte: EMBRAPA (2000)

O abacaxi possui formato cilíndrico ou ligeiramente cônico, constituído por pequenas bagas fundidas entre si sobre o eixo central, formado por várias flores

que iniciam seu desenvolvimento na base do fruto e progride até o ápice (ALVARENGA, 2014). A Figura 2 apresenta as partes que compõem o abacaxi. A polpa do abacaxi possui coloração branca, amarela ou laranja-avermelhada, dependendo da espécie. Seu peso é aproximadamente 1,450 kg por fruto, mas é variável dependendo da cultivar, sendo que apenas 22,5 % correspondem à polpa comestível e utilizada pelas indústrias (BOTELHO et al., 2002; FACUNDO, 2009).

No Brasil, as cultivares de maior importância econômica plantadas são Pérola (e sua variante *Jupi*) e *Smoth Cayenne* (*Caiene*, *havaiano* ou *ananás*). Sendo que a Pérola é responsável por 88 % da produção nacional e quase 100 % da produção comercial no Nordeste e Norte do país. A *Smoth Cayenne* com plantios concentrados no Sul e Sudeste (Paraná, Triângulo mineiro e São Paulo) representa 12 % da produção nacional (EMBRAPA, 2013).

Figura 2 - Esquema frontal (a) e corte longitudinal (b) das partes do abacaxi



Fonte: FAEP (2008) apud ALVARENGA (2014)

Em relação a composição centesimal do abacaxi, esta varia conforme o cultivar e sazonalidade. No verão os frutos obtêm maiores teores de açúcares e menor acidez. O seu valor nutritivo é atribuído à presença de sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e de vitaminas (ácido ascórbico, tiamina, riboflavina e niacina), além de sua casca ser rica em fibras (LEMOS et al., 2010).

Em relação as proteínas do abacaxi, a bromelina se destaca, podendo ser encontrada inclusive na casca e caule dessa fruta (GEORGE et al., 2014). A bromelina pode apresentar propriedades bioativas e ação proteolítica. Suas aplicações terapêuticas incluem o auxílio no tratamento de doenças relacionadas

com a coagulação do sangue e inflamatórias, modulação do crescimento de tumor, queimaduras de terceiro grau, melhoria da ação antibiótica, angina *pectoris*, bronquite, sinusite, traumas cirúrgicos, tromboflebite e pielonefrite. Todavia, a estabilidade da bromelina é afetada por elevadas temperaturas e acidez, por determinados solventes orgânicos e produtos químicos. Isso pode acarretar na diminuição de sua atividade enzimática, limitando assim, os seus benefícios para a saúde e, conseqüentemente, as suas aplicações farmacológicas (GEORGE et al., 2014; BERNELA et al., 2016).

A composição da polpa crua de abacaxi por 100 g, segundo Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO (2011), está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição de abacaxi cru em 100 gramas da parte comestível

Parâmetros	Valores
Umidade (%)	86,30
Valor energético (kcal)	48,00
Proteínas (g)	0,90
Lipídios (g)	0,10
Colesterol (mg)	NA*
Carboidratos (g)	12,30
Fibra alimentar (g)	01,00
Cinzas (g)	0,40
Cálcio (mg)	22,00
Magnésio (mg)	18,00
Manganês (mg)	01,62
Fósforo (mg)	13,00
Ferro (mg)	0,30
Sódio (mg)	Tr**
Potássio (mg)	131,00
Cobre (mg)	0,11
Zinco (mg)	0,10
Retinol (µg)	NA*
Tiamina (mg)	0,17
Riboflavina (mg)	0,02
Piridoxina (mg)	Tr**
Niacina (mg)	Tr**
Vitamina C (mg)	34,60

*NA: não aplicável; **Tr: traços

Fonte: TACO (2011)

O abacaxi além de consumido *in natura* é empregado na fabricação de doces em calda, cristalizados, geleias, licores, bebidas "tipo" vinho, aguardentes, vinagres e sucos, sendo estes, produtos tradicionalmente conhecidos por seus aromas e sabores agradáveis (LEMOS et al., 2010; SILVA et al., 2013).

3.1.1. Resíduo de abacaxi

A partir da industrialização de frutas e hortaliças há a geração de resíduos agrícolas e estes devem ter um destino adequado, para não impactarem na poluição ambiental e desperdício (CONESA et al., 2016).

No ano de 2016, a produção mundial de abacaxi atingiu 25,81 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2017), em que 50 à 80 % (m/m) foi desperdiçado com a industrialização (CONESA et al., 2016).

As cascas, coroas e eixo central do abacaxi são considerados rejeitos ou resíduos, pela indústria de polpa de frutas. No entanto, esses resíduos apresentam nutrientes, inclusive açúcares, simples e hidrolisáveis (SARZI et al., 2002). De encontro a isso, por ser uma fruta de formato desuniforme, parte da polpa pode ficar aderida na casca, quando o descascamento não é realizado adequadamente, sendo parte da polpa descartada junto com a casca.

Alguns estudos tem demonstrado que, resíduos de certas frutas possuem atividade antioxidante, devido a presença de compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos (SILVA et al., 2013, SOUSA, VIEIRA, LIMA, 2011; INFANTE et al., 2013). A presença de antioxidantes naturais torna-se importante, pois são substâncias que podem atuar a favor da estabilidade de produtos alimentares e até mesmo são capazes de prevenir ou inibir processos de oxidação no corpo humano, quando ingeridos, a exemplo tem-se ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonoides, entre outros (SILVA et al., 2013).

A partir da industrialização do resíduo do abacaxi já são obtidos rações para animais, extração de ácidos cítrico, málico, ascórbico, extração de bromelina (LEMOS et al., 2010).

A Tabela 2 apresenta a composição físico-química do resíduo de abacaxi.

Gondim et al. (2005) indicam que o resíduo de abacaxi possui potencial para elaboração de produtos ou coprodutos, com valor nutricional agregado. Pois, foram encontrados teores de proteínas de $1,45 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$, lipídeos $0,55 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$, fibras $3,89 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ e cálcio $76,44 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$ nas cascas, sendo quantidades maiores que as encontradas na polpa da fruta, com teores de $1,0 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$, $0,0 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$, $1,0 \text{ g.}100\text{g}^{-1}$ e $22,0 \text{ mg.}100\text{g}^{-1}$, respectivamente dos mesmos nutrientes avaliados na casca.

Tabela 2 - Parâmetros físico-químicos das cascas e dos bagaços de abacaxi

Parâmetros (% b.s.)	Casca de abacaxi	Bagaço de abacaxi
Umidade (%)	09,92 ^a ± 0,54	08,05 ^a ± 0,25
Proteína (% N x 6,25)	03,27 ^a ± 0,13	03,18 ^a ± 0,25
Lipídeos (%)	01,60 ^a ± 0,47	0,72 ^b ± 0,16
Fibras (%)	07,52 ^a ± 0,89	05,89 ^b ± 1,00
Cinzas (%)	02,03 ^a ± 0,32	02,15 ^a ± 0,06
pH	03,98 ^a ± 0,02	03,66 ^b ± 0,02
Acidez (% ác. cítrico)	02,53 ^a ± 0,06	02,98 ^b ± 0,04
Sólidos solúveis totais (°Brix à 20°C)	60,38 ^a ± 0,00	60,71 ^b ± 0,00
Açúcares redutores (% glicose)	18,95 ^a ± 1,06	32,94 ^b ± 0,63
Açúcares não redutores (% sacarose)	18,38 ^a ± 1,41	03,11 ^b ± 0,42
Açúcares totais (%)	37,33 ^a ± 0,35	36,05 ^b ± 0,21
Vitamina C (mg 100 ⁻¹ g)	27,07 ^a ± 0,10	18,61 ^b ± 0,25

b.s.: base seca. Os resultados estão expresso como média±desvio padrão. Valores médios numa mesma linha com letras minúsculas iguais, não diferem significativamente entre si em nível de 5 % de probabilidade pelo Teste de *Tukey*.

Adaptado de COSTA et al. (2007)

Alvarenga (2014) avaliou a utilização do resíduo de abacaxi juntamente com a polpa para produção de fermentado alcoólico e acético. Para fermentação alcoólica utilizou polpa de abacaxi adicionada de 0, 10, 20 ou 30 % de resíduo (casca) ao mosto. Para fermentação acética, foram utilizados os fermentados alcoólicos com adição de 10 e 30 % de casca. O estudo evidenciou que a adição de 10 % de resíduo para o fermentado alcoólico não interferiu em sua qualidade físico-química. O fermentado acético com 30 % de resíduo obteve maior teor de compostos fenólicos e conseqüentemente, maior atividade antioxidante. A obtenção de vinagre a partir de formulação com resíduo de abacaxi mostrou-se como alternativa, diminuindo o desperdício e complementação a renda de pequenos produtores rurais.

Oliveira (2014) desenvolveu um chá à partir das cascas secas do abacaxi, do qual fez-se análises físico-químicas e sensorial, em que obteve-se aceitação entre "gostei ligeiramente" e "gostei muito".

No estudo de Selani (2015) o resíduo de abacaxi foi utilizado como substituto parcial de gordura, em hambúrguer bovino e como fonte de fibras em extrusado de milho. Nos hambúrgueres, a adição do resíduo de abacaxi promoveu considerável capacidade de retenção de água e melhorou as propriedades de cozimento. A análise sensorial mostrou que os tratamentos não foram afetados

pela adição de resíduo de abacaxi. Em relação aos extrusados, a adição de 10,5 % de resíduo de abacaxi não promoveu alterações significativas sobre as propriedades do produto final.

Lima et al. (2017) elaboraram doces e geleias empregando resíduos de frutas, os produtos que tiveram resíduo de abacaxi em suas formulações obtiveram maiores teores nutricionais e maiores percentuais de aceitação sensorial, quando comparados a produtos elaborados com resíduos de outras frutas.

Pesquisas promissoras foram encontradas na literatura utilizando resíduo de abacaxi no desenvolvimento de novos produtos (GONDIM et al. 2005; LEMOS, 2010; OLIVEIRA, 2014; ALVARENGA, 2014; SELANI, 2015; LIMA et al., 2017). Contudo, mais pesquisas podem ser exploradas, especialmente para o desenvolvimento de bebidas, já que o resíduo de abacaxi apresenta teores de açúcares e outros nutrientes. Uma opção é a geração de produtos oriundos da biotecnologia (SOUSA, 2009), empregando os resíduos em processos fermentativos.

3.2. Extrato de guaraná

O guaraná (*Paullinia cupana*), pertencente à família Sapindaceae tem um importante e tradicional papel no Estado do Amazonas. Apesar de algumas pequenas regiões amazônicas da Venezuela e do Peru possuírem plantações do guaranazeiro, o Brasil é considerado praticamente o único produtor do mundo.

No Brasil o guaraná é comercializado como rama (sementes torradas) (EMBRAPA, 2005a). A produção do guaraná em grãos em 2016 foi de 3288 t (CONAB, 2017).

A forma mais antiga de comercialização do guaraná é em bastão, na região amazônica, ele é normalmente ralado para ser transformado em pó e consumido. A Resolução CNNPA nº 12, de 1978, classifica o guaraná em três formas, guaraná em sementes, em pó e em bastões (BRASIL, 1978).

O guaraná em rama é utilizado na produção de xaropes e extratos de guaraná. E o pó, obtido das sementes torradas e moídas, é utilizado para o preparo de bebidas, sorvetes, cremes e outros alimentos, sendo um produto de valor agregado mais alto, pouco utilizado pelos produtores para comercialização,

e é a forma mais encontrada no comércio varejista (EMBRAPA, 2005b). A Figura 3 apresenta as três formas de comercialização do guaraná.

Figura 3 - Guaraná: (A) bastão; (B) sementes e (C) em pó



Fonte: (A) e (C) próprio autor. (B) EMBRAPA (2005a)

Além de ser comercializado no mercado interno, o guaraná é exportado como xarope, pó, bastão, extrato e outras formas. As sementes também são usadas na indústria farmacêutica e o guaraná em pó é empregado para elaboração de produtos com apelo energizante (EMBRAPA, 2005a; VEIGA et al., 2014).

O guaraná é um composto estimulante utilizado em bebidas, visto que contém altos teores de cafeína, que são do grupo das xantinas metiladas, ou metilxantinas e apresentam efeitos fisiológicos. Os teores de cafeína podem variar de acordo com a procedência da matéria-prima e as condições de cultivo (região de plantio, método de cultivo, presença de contaminantes químicos e métodos de secagem). Também apresentam em sua composição química taninos, ácido gálico, catequinas, epicatequinas entre outros componentes em menor concentração (CARVALHO et al., 2006; MARTINS, 2010).

Além disso, o guaraná possui propriedades benéficas à saúde comprovadas cientificamente, sendo usado como antitérmico, antineurálgico, antidiarreico, estimulante, analgésico e antigripal. Este fruto também foi analisado quanto a sua utilização no combate à fadiga e depressão associada com o tratamento do câncer (MOUSTAKAS et al., 2015).

O uso do extrato de guaraná no desenvolvimento de formulações, justifica-se pelo fato de ser uma matéria-prima capaz de promover características físico-

químicas e sensoriais particulares ao produto desenvolvido. O novo produto pode conter efeito estimulante, com ação anti o desgaste físico e mental.

3.3. Kefir

A origem da palavra kefir vem da Turquia, deriva de *Kef* ou *Keif* e significa “bem-estar”. Os grãos de kefir são uma cultura mista iniciadora, empregada na elaboração de bebidas fermentadas (ANFITEATRO, 2000).

O interesse científico e de produção industrial pelo kefir é crescente, devido aos seus benefícios. Os consumidores estão conscientizando-se que, os alimentos além de nutrir, podem conter compostos bioativos com promoção à saúde e prevenção de doenças (CORONA et al., 2016).

Os efeitos benéficos associados ao consumo da bebida kefir já descritos na literatura envolvem: atividades antimicrobianas, de cicatrização, efeitos anti-inflamatórios (HSIEH et al., 2012; CORONA et al., 2016; FIORDA et al., 2017); atividades antiedematogênicas, propriedades antioxidantes (FIORDA et al., 2017) e melhoria do perfil de risco de doença cardiovascular de jovens adultos de 18 a 24 anos (SAADI et al., 2017). Muitos desses benefícios são atribuídos aos microrganismos probióticos presentes no kefir, que trazem melhoria principalmente na saúde intestinal do consumidor (SAADI et al., 2017).

A legislação brasileira do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define o kefir como sendo "o produto resultante da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, ácido acético, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são ainda constituídos por leveduras (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), e outros microrganismos tais como *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*" (BRASIL, 2007). Ainda, de acordo com o MAPA, o kefir de leite deve apresentar certas características, tais como homogeneidade e consistência cremosa, sabor acidulado (acidez menor que 1,0 g de ácido láctico por 100 g de produto), picante e ligeiramente alcoólico (5 a 15 g.L⁻¹) (BRASIL, 2007).

Atualmente, tem-se aumentado a utilização de grãos de kefir para fermentar substratos não lácticos, como em frutas, mel, legumes, chás, sucos, produzindo bebidas probióticas funcionais com diferentes características sensoriais (FIORDA et al., 2016). Dependendo do substrato utilizado na fermentação, pode haver o desenvolvimento preferencial de certas espécies microbianas. Esse fato é interessante no contexto biotecnológico, pois podem ser explorados na obtenção de bebidas fermentadas, não lácteas, com características sensoriais e nutritivas particulares.

Kefir de água é uma bebida fermentada, feita pela adição dos grãos de kefir em uma mistura de água, açúcar (sacarose) e outros ingredientes e incubados à temperatura ambiente em processo anaeróbio durante 2-4 dias. A bebida fermentada obtida é amarelada, espumante (presença de gás carbônico), com sabor e aroma frutado, ácido, ligeiramente doce e alcoólica. Apesar de estar disponível em todo o mundo, sua origem é desconhecida. “Grãos de kefir de água” são conhecidos por outros nomes e dependem da localização geográfica, como exemplo, “ginger beer plants”, “Tibicos”, “Tibi grains”, “California bees”, “African bees”, “ale nuts”, “balm of Gilead”, “Bèbéés”, “Japanese beer seeds” e “sugary kefir grains” (LAUREYS; VUYST, 2014).

O kefir de água torna-se uma opção viável de bebida fermentada, para consumidores que possuam alergia e/ou intolerância a produtos lácteos. Além disso, estabelece uma importância mundial sobre produtos probióticos não lácteos, procurados por um nicho de mercado formado por pessoas vegetarianas e/ou veganas (CORONA et al., 2016).

Randazzo et al. (2016) desenvolveu bebidas fermentadas com kefir a partir de suco de frutas do mediterrâneo, tais como, maçã, marmelo, uva, kiwi, pera espinhosa e romã. Fiorda et al. (2016) estudou o processo de fermentação do mel com grãos de kefir. Corona et al. (2016) utilizou como substratos fermentescíveis sucos de cenoura, erva-doce, melão, cebola, tomate e morango para produzir bebidas fermentadas a partir do kefir.

3.3.1. Grãos de kefir

A bebida kefir é obtida através dos grãos do kefir. Os grãos de kefir são constituídos por polissacarídeos, em associação com uma microbiota complexa

entre bactérias e leveduras, que funcionam como cultura *Starter* para a fermentação (FIORDA et al., 2016). A Figura 4 mostra o aspecto visual dos diferentes grãos de kefir.

Figura 4 - Grãos de kefir de água (A) e grãos de kefir de leite (B)



Fonte: Próprio autor

Os grãos de kefir quando cultivados em água, com açúcar mascavo são denominados de dextrano (HSIEH et al., 2012). O dextrano é um homopolissacarídeo, composto de glicose. As moléculas de glicose na cadeia principal de dextrano, estão ligadas por ligações glicosídicas α -1-6 e a ramificação pode ocorrer nas posições 2, 3 ou 4 (DAVIDOVIĆ et al., 2015). Já os grãos de kefir quando cultivados em leite, são denominados de kefirano. O kefirano é um glucogalactano ramificado polar, composto por quantidades iguais de resíduos de D-glicose e D-galactose. É um polímero resistente à hidrólise e forma géis em soluções aquosas contendo etanol (HSIEH et al., 2012).

3.3.2. Microbiota dos grãos de kefir

As espécies e concentrações microbianas presentes na cultura mista do kefir, podem variar conforme a origem dos grãos, substrato e método de fermentação empregado (HSIEH et al., 2012; MARSH et al., 2014).

Normalmente, a concentração das BAL nos grãos de kefir são predominantes, em relação a presença das leveduras (LAUREYS, VUYST, 2014). Todavia, Fiorda et al. (2017), relataram que a simbiose de microrganismos presente nos grãos de kefir de água são semelhantes aos encontrados no kefir de leite, mas algumas espécies podem ser estimuladas. Como o caso da *Saccharomyces*,

obtendo-se uma concentração final de etanol mais elevada. Em que se estimula o aumento de bactérias do ácido acético (BAC), que metaboliza o etanol para produção de ácido acético.

A Tabela 3 apresenta um compilado de espécies microbianas já identificadas em kefir de água.

Tabela 3 - Bactérias e leveduras isoladas de kefir de água

Espécie	Literatura
Bactérias	
<i>Lactobacillus brevis</i>	(Moinas et al.,1980)
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	(Pidoux, 1989; Waldherr, 2010)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	(Pidoux, 1989; Galli et al.,1995)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	(Pidoux, 1989)
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Pseudoplanctarum</i>	(Galli et al.,1995)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	(Pidoux, 1989)
<i>Lactobacillus buchneri</i>	(Galli et al.,1995)
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	(Galli et al.,1995)
<i>Lactobacillus collinoides</i>	(Galli et al.,1995)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	(Moinas et al.,1980; Pidoux,1989; Waldherr, 2010)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremonis</i>	(Pidoux, 1989)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	(Galli et al.,1995; Waldherr, 2010)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranicum</i>	(Pidoux, 1989)
<i>Enterobacter hormachei</i>	(Waldherr, 2010)
<i>Gluconobacter frateuri</i>	(Waldherr, 2010)
Leveduras	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	(Waldherr, 2010)
<i>Saccharomyces florentinus</i>	(Galli et al.,1995)
<i>Saccharomyces pretoriensis</i>	(Galli et al.,1995)
<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	(Pidoux, 1989; Neve; Heller, 2002)
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	(Pidoux, 1989; Galli et al.,1995; Neve and Heller, 2002)
<i>Hanseniaspora vinae</i>	(Pidoux, 1989; Galli et al.,1995)
<i>Hanseniaspora yalbensis</i>	(Franzetti et al.,1998)
<i>Kloeckera apiculata</i>	(Pidoux, 1989; Franzetti et al., 1998)
<i>Candida lambica</i>	(Pidoux, 1989)
<i>Candida lambica</i>	(Pidoux, 1989)
<i>S. cerevisiae</i>	(Laureys et al., 2016)

Fonte: Adaptado de WALDHERR et al. (2010)

3.3.3. Identificação dos microrganismos do kefir

Por muito tempo, a identificação dos microrganismos presentes no kefir foi realizada por métodos convencionais de cultivo. Entretanto, técnicas mais sofisticadas e independentes de cultivo estão sendo utilizadas (ZANIRATI, 2012), tais como ARDRA – Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (GOLOWCZYC et al., 2008), RAPD – Reação de Amplificação Polimórfica de DNA (GOLOWCZYC et al., 2008), PCR/DGGE – Reação em Cadeia da Polimerase/Electroforese em Gel Gradiente Desnaturante (CHEN; WANG; CHEN, 2008; WANG et al., 2008), dentre outras técnicas.

Os métodos tradicionais baseiam-se em características morfológicas, metabólicas e fisiológicas diferenciais. Para isso, faz-se o isolamento e o cultivo de microrganismos em meios seletivos e a avaliação é com base na morfologia das colônias, na turvação da cor do meio ou da cultura. Porém, há a possibilidade de existir células viáveis, mas não cultiváveis. Dessa maneira, o método dependente de cultivo pode subestimar a composição microbiana real da amostra analisada. Além de ser um método que pode levar dias a semanas para que o resultado seja obtido, e, acaba elevando o custo da análise (ZHU; AL-MONIEE, 2017, GANDRA et al., 2008).

Técnicas moleculares independente de cultivo foram desenvolvidas nas últimas décadas, sendo baseadas na extração direta de ácidos nucleicos das amostras, obtendo um resultado mais detalhado e abrangente da composição microbiana, uma vez que não é necessário o cultivo dos microrganismos no laboratório (ZHU; AL-MONIEE, 2017).

Análises independentes de cultivo, como a MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight*), tem sido empregada como técnica para métodos independentes de cultivo. O MALDI-TOF consiste em uma aplicação de espectrometria de massas (PASTERNAK, 2012). A análise metagenômica, visa de maneira simplificada, o isolamento de DNA proveniente de uma amostra, e *screening* das células recombinantes (PESSOA-FILHO, 2010).

O DMD (Diagnóstico Microbiológico Digital) é capaz de identificar os microrganismos diretamente da amostra, por meio de seu DNA, sem a necessidade de etapa de cultura. O princípio da técnica baseia-se na utilização

de marcadores genéticos para a identificação de microrganismos, utilizando como base as tecnologias de sequenciamento de DNA em larga escala e análises de bioinformática e a implementação dos dados na plataforma de visualização (NEOPROSPECTA, 2018).

3.3.4. Elaboração do kefir de água

Na elaboração do kefir de água o principal substrato utilizado pelos microrganismos são preferencialmente os carboidratos, especialmente a glicose e a sacarose (HARTA et al., 2004). Conforme a população microbiana dos grãos, demais substratos podem ser metabolizados (MARSH et al., 2014). Para elaboração das bebidas fermentadas por kefir, normalmente utiliza-se entre 3 a 10 % (m.v⁻¹) de açúcar (HARTA et al., 2004), sendo comumente esse mascavo ou demerara.

O principal processo que envolve a elaboração da bebida kefir é a fermentação, promovida pela ação dos grãos de kefir no substrato presente. O tempo de fermentação, geralmente varia, entre 12 e 72 h. A temperatura de fermentação mais comumente utilizada é entre 20 e 25 °C (ALSAYADI et al., 2014; SILVA et al., 2009). A bebida resultante ao final do processo de fermentação dos grãos de kefir utilizando açúcares pode ser turva, com cor palha, sabor levemente ácido e doce, com baixo ou médio teor alcoólico, gaseificada. Tendo em vista que as propriedades sensoriais são inerentes aos ingredientes das formulações, qualidade do inóculo e métodos de elaboração.

A fermentação envolve um conjunto de reações complexas. Resumidamente, a glicose é oxidada, através da glicólise e é reduzida a ácido pirúvico. Conforme a molécula orgânica que é produzida, a partir do ácido pirúvico, a fermentação é classificada como láctica (via do ácido láctico) ou alcoólica (via do etanol), sendo que este pode ser oxidado e vir a formar ácido acético, pelas BAC, sob condições aeróbias (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014). Os principais metabólitos produzidos durante a fermentação do kefir de água são ácidos orgânicos (láctico, acético), etanol, compostos formadores de aroma, como 2-metil-1-propanol, álcool isoamílico, acetato de etila, acetato isoamílico, hexanoato etílico, octanoato etílico, dentre outros (LAUREYS, VUYST, 2014).

Os diferentes ingredientes utilizados na elaboração da bebida de kefir, como frutas e especiarias, podem influenciar o processo fermentativo e contribuir com as características nutricionais e sensoriais do produto final.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos - DCTA, da Universidade Estadual de Londrina (UEL, Londrina-PR).

4.1. Material

Para a elaboração das bebidas fermentadas por kefir foi utilizado resíduo úmido de abacaxi, os quais eram compostos por partes finas da casca e bagaço, da variedade *Smooth cayenne*, cultivada durante a safra de verão do ano de 2016. Estes foram cedidos pela Indústria Redondo Polpa de Frutas, localizada no município de Cambé – PR.

Também foram utilizados açúcar mascavo, hortelã e água, provenientes do comércio local, da cidade de Londrina-PR.

O extrato de guaraná foi cedido pela empresa Duas Rodas®, cujas especificações estão no Anexo C.

Os grãos de kefir de água utilizados como inóculo no processo fermentativo foram obtidos por meio de doação, proveniente de cultivo artesanal no município de Londrina – PR.

4.2. Métodos

4.2.1. Manutenção e preparo do inóculo

O inóculo (grãos de kefir) foi mantido em substrato estéril, feito com água filtrada adicionada de 10 % de açúcar mascavo. A cada 48 h era realizada a manutenção do inóculo, realizado repiques. Onde os grãos eram escoados e transferidos para um novo substrato com água filtrada adicionada de 10 % de

açúcar mascavo, estes eram mantidos à 25 °C. No momento de realizar os experimentos, utilizava-se sempre inóculo com 24 h de incubação à 25 °C.

4.2.2. Preparo dos substratos fermentescíveis

4.2.2.1. Elaboração dos extratos de resíduo de abacaxi

O processamento do abacaxi para obtenção do suco inicia com a higienização dos frutos, seguido da retirada da coroa. Então o fruto é cortado em quatro partes e transportado via esteiras para o maquinário extrator do suco. De onde é obtido o suco e dois tipos de resíduos, o resíduo grosso formado pela casca e o resíduo fino composto pelo bagaço e pequena porcentagem de casca, este último foi utilizado no presente estudo.

O resíduo fino de abacaxi foi fracionado em porções de 200 g e mantidos congelados (-18 °C) em pacotes de polietileno até o momento do uso.

O extrato foi preparado utilizando-se o resíduo de abacaxi congelado e água filtrada na proporção 2:1 (m.m⁻¹), adicionados de 1,3 % (m.m⁻¹) de hortelã fresca. Todos os ingredientes foram misturados em liquidificador (Bermar, BM 43 NR) por 2 min. A mistura foi filtrada. Obteve-se o extrato do resíduo de abacaxi e este foi porcionado para frascos de vidro reagentes com tampa e pasteurizados a 60 °C por 60 min (MARTINS et al., 2011) e arrefecidos a 25 °C.

4.2.2.2. Elaboração do xarope

O xarope foi preparado a partir da dissolução do açúcar mascavo em água (10 % (m.m⁻¹) de açúcar mascavo em relação ao total da bebida – Tabela 4), o mesmo foi acondicionado em frascos reagentes de vidro, com volume útil de 500 ml, com tampa de rosca e esterilizados a 121 °C por 15 min e arrefecidos a 25 °C.

4.2.3. Desenvolvimento das bebida fermentadas por kefir de água

4.2.3.1. Formulações das bebidas

Elaborou-se uma bebida controle (FC) com a adição do xarope, contendo água e açúcar mascavo. E duas formulações, utilizando como substratos o extrato do resíduo de abacaxi e o xarope. Uma dessas formulações foi desenvolvida sem adição de extrato de guaraná (F1) e a outra com adição de extrato de guaraná (F2) (Tabela 4).

Tabela 4 - Formulações para elaboração das bebidas fermentadas por kefir

Ingredientes	Etapa de adição do ingrediente no processo de elaboração	Formulações (g)		
		FC	F1	F2
Água	1ª } Xarope	205	205	205
Açúcar		45	45	43
Grãos de kefir	1ª	22,5	22,5	22,5
ERA	2ª	na	200	200
Água	2ª	200	na	na
EG	2ª	na	na	2
Total*		450	450	450

FC: controle; F1: sem adição de extrato de guaraná; F2: com extrato de guaraná; na: não adicionado. ERA: extrato do resíduo de abacaxi. EG: extrato de guaraná. *Total: balanço de massas sem a adição dos grãos de kefir.

4.2.3.2. Fermentação das bebidas

O processo fermentativo para elaboração das bebidas ocorreu em duas etapas.

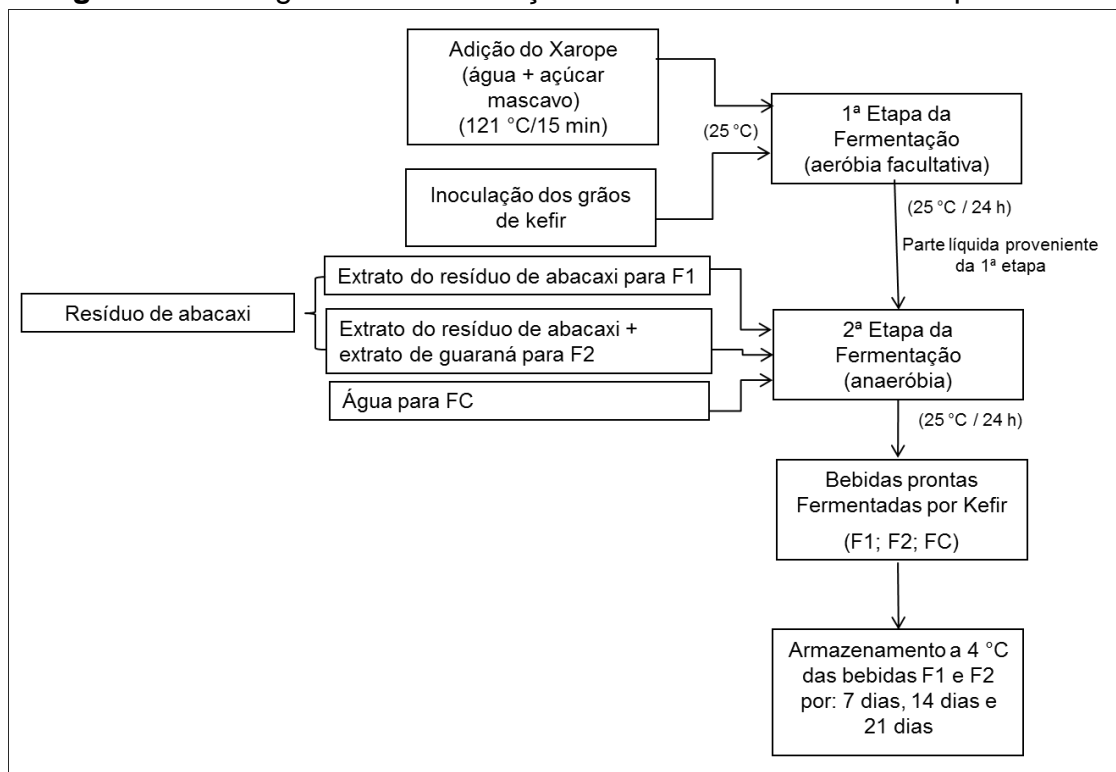
Para primeira etapa, os grãos de kefir foram transferidos assepticamente para os frascos reagentes Schott contendo o xarope. No momento da incubação as tampas dos frascos foram mantidas semiabertas. A fermentação ocorreu em câmara BOD termostaticada (J. Prolab, JP 1000, Brasil) a 25 ± 1 °C, por 24 h.

Para a segunda etapa o produto obtido através da primeira etapa foi filtrado para garrafas de vidro âmbar (500 ml) providas de tampas tipo *flip top*, para separar os grãos de kefir do xarope fermentado. Prosseguiu-se com a adição diretamente nas garrafas, da água para elaboração da FC para padronizar as quantidades adicionadas, do extrato do resíduo de abacaxi para elaboração da F1 e do extrato do resíduo de abacaxi com extrato de guaraná para elaboração da F2. Todos utensílios utilizados nessa etapa estavam secos e foram

previamente sanitizados, com ácido peracético ($500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) e enxaguados à quente. A fermentação foi conduzida nas garrafas, com suas tampas totalmente fechadas e as mesmas foram incubadas por mais 24 h à $25 \text{ }^\circ\text{C}$ em câmara BOD termostaticada (J. Prolab, JP 1000, Brasil).

A Figura 5 apresenta o fluxograma de processamento para elaboração das bebidas fermentadas por kefir.

Figura 5 - Fluxograma da elaboração das bebidas fermentadas por kefir



FC: formulação controle; F1: formulação 1; F2: formulação 2.

4.2.4. Análises físico-químicas

O resíduo de abacaxi foi caracterizado quanto a composição proximal (umidade, cinzas totais, proteínas totais, lipídeos totais, fibra totais, e carboidratos).

Os substratos fermentescíveis, extrato de resíduo de abacaxi com e sem extrato de guaraná utilizados para elaboração das bebidas fermentadas por kefir foram avaliados quanto aos parâmetros físico-químicos: pH, ATT, SST, CFT e perfil de açúcares, ácidos orgânicos e etanol por cromatografia. Esses mesmos parâmetros, exceto CFT, foram avaliados em quatro tempos, durante a

elaboração das formulações FC, F1 e F2 até as mesmas ficarem prontas. Além desses parâmetros físico-químicos, foram avaliados os CFT e atividade antioxidante (FRAP e DPPH) nas bebidas prontas (FC, F1 e F2) e no período de armazenamento a 4 °C das bebidas prontas F1 e F2, em 7, 14 e 21 dias.

Foi realizada a identificação molecular da microbiota dos grãos de kefir.

A análise de presença de *Salmonella* sp., contagem de Coliformes totais e Coliformes à 45°C, foi realizada nas bebidas F1 e F2, antecedendo a análise sensorial.

A contagem em placas de BAL fez-se nas bebidas F1 e F2 após o término da segunda etapa de fermentação e durante o tempo de armazenamento.

Após o término da segunda etapa de fermentação das formulações F1 e F2, as mesmas foram refrigeradas a 4 °C, por 4h e prosseguiu com a análise sensorial.

4.2.4.1. pH

As determinações de pH foram feitas através de potenciômetro digital (Gehaka, PG2000, Brasil), previamente calibrado com soluções tampões de pH 4,00 e 7,00, conforme metodologia descrita pela AOAC (2012).

4.2.4.2. Sólidos solúveis totais

As determinações dos sólidos solúveis totais, expressos em °Brix, foram medidas em refratômetro de bancada (Metler Toledo - LiquiPhysics™ Excellence RM40, Reino Unido) de acordo com o método da AOAC (2012).

4.2.4.3. Acidez total titulável

A acidez total titulável foi determinada por volumetria potenciométrica com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (padronizada), conforme o Instituto Adolfo Lutz (2008). A acidez foi expressa em g de ácido cítrico.L⁻¹. A Equação 1 foi utilizada para o cálculo.

$$Acidez(\%) = \frac{V \times F \times M \times MM}{10 \times P \times n} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação

F = fator de correção da solução de hidróxido de sódio

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

MM = massa molecular do ácido correspondente (ácido cítrico= 192)

P = massa da amostra em g ou volume pipetado

n = número de hidrogênios ionizáveis (ácido cítrico= 3)

4.2.4.4. Teor de Umidade

Os teores de umidade foram determinados pela metodologia descrita pela AOAC (2012). O conteúdo de umidade foi obtido em estufa a 105 °C, onde as amostras foram submetidas a esta temperatura até massa constante. Os cálculos foram obtidos através da Equação 2.

$$Umidade(\%) = \left(\frac{MAU - MAS}{MAU} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

MAU= massa da amostra úmida (g)

MAS= massa da amostra seca (g)

4.2.4.5. Determinação de cinzas totais

Os teores de cinzas totais foram determinados pela metodologia descrita pela AOAC (2012). As amostras foram incineradas em bico de Bunsen e após foram transferidas para o forno mufla a 550 °C por 5 h. O teor de cinzas foi obtido de acordo com a Equação 3, através da determinação da perda de peso do material submetido à queima em temperatura de 550 °C. A perda da massa fornece o teor de matéria orgânica e a diferença entre a massa da amostra utilizada e a massa da matéria orgânica fornece a quantidade de cinzas presentes na amostra.

$$Cinzas(\%) = \frac{MC}{MA} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

MC= massa das cinzas (g)

MA= massa da amostra (g)

4.2.4.6. Proteínas totais

As determinações de proteínas totais foram realizadas pelo método de micro kjeldahl, conforme recomendações da AOAC (2012).

Pesaram-se 0,2 g de cada uma das amostras em tubos de Kjeldahl previamente identificados, adicionaram-se a estas 1 g de catalisador misto (sulfato de cobre e sulfato de potássio) e 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram homogeneizados e colocados em bloco digestor com elevação gradual de temperatura até 400 °C.

Após completa digestão das amostras, as mesmas foram acrescidas de 10 ml de água destilada. Procedeu-se a destilação com hidróxido de sódio a 50 %, até neutralização da amostra. O produto da destilação foi recolhido em erlenmeyers contendo 10 ml de ácido bórico 2 % e 3 gotas do indicador misto. O borato de amônio formado, após processo de destilação foi titulado com ácido sulfúrico padronizado 0,02 N, até ponto de viragem do indicador.

Para o cálculo utilizou-se a equação 4.

$$Proteinas(\%) = \frac{V \times N \times F \times 0,014 \times 6,25 \times 100}{M} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

V = volume gasto de ácido sulfúrico na titulação (ml)

N = normalidade do ácido sulfúrico

F= fator de correção

M= massa da amostra (g)

4.2.4.7. Lipídeos totais

A análise de lipídeos totais foi determinada por extração direta em Soxhlet, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008).

As amostras foram pesadas em papeis filtros, os quais foram fechados e passados para cartuchos desengordurados. Os cartuchos foram transferidos para aparelho extrator tipo Soxhlet, acoplados a balões de fundo chato, cujas taras foram previamente anotadas. As amostras ficaram em extração contínua por 8 h, sendo utilizado éter de petróleo como solvente extrator. Após o término do período das extrações, os balões de fundo chato foram levados para evaporador rotativo à 40-45 °C para evaporação do solvente. Após esta operação os balões permaneceram em estufa à 105 °C por 2 h, após arrefecimento os balões foram pesados. Para o cálculo utilizou-se a Equação 5.

$$LipídeosTotais(\%) = \left(\frac{(MB + L) - (MB)}{MAU} \right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

MB= massa do balão (g)

L= lipídeos (g)

MAU= massa da amostra úmida (g)

4.2.4.8. Fibra alimentar total

A análise de fibra alimentar total foi realizada conforme descrito pela AOAC (2012). Amostras foram tratadas com α -amilase termo estável em tampão MES/TRIS 0,05M (0,05M MES- ácido 2-N-(morpholino) etanosulfonico; 0,05M TRIS – Tris hidroximetil aminometano), a fim de hidrolisar os amidos presentes, sendo, em seguida, enzimaticamente digeridas com protease e amiloglucosidase para remover proteínas e amido. Nesta solução, estão contidas as fibras solúveis e as insolúveis. Para o cálculo da fibra total, os resíduos resultantes da digestão com protease e amiloglucosidase foram filtrados e os precipitados foram lavados com água morna, etanol 95 % e acetona, secos em estufa e pesados, em que se obteve o valor de fibra alimentar insolúvel (FI). O filtrado e a água de lavagem são tratados com álcool 95 % (4 volumes do total) para precipitar os componentes solúveis. Os resíduos obtidos foram filtrados, lavados com álcool 78 e 95 % e acetona, secos em estufa e pesados. Estes corresponderam aos valores de fibra alimentar solúvel (FAS). Realizou-se a correção para proteínas e cinzas de cada resíduo obtido, isto é, os resíduos FAI

e FAS. O resíduo medido como fibra alimentar por este método consiste de NSP (*non-starch polysaccharides*), algum amido retrogradado, lignina, produtos resultantes da reação de Maillard e um número de compostos não identificados de origem animal e vegetal. Para os cálculos de fibra alimentar total (FAT), utilizou a Equação 6.

$$FAT(\%) = (FAI - P - C) + (FAS - P - C) \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

P= percentual de proteínas de cada resíduo obtido

C= percentual de cinzas de cada resíduo obtido

4.2.4.9. Carboidratos

O teor de carboidratos (C) do resíduo de abacaxi foi determinado por diferença, de acordo com a AOAC (2012), conforme Equação 7.

$$C(\%) = (100 - (\%U + \%L + \%P + \%C)) \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

U= Percentual de umidade encontrado no resíduo de abacaxi.

L= Percentual de lipídeos totais encontrados no resíduo de abacaxi.

P= Percentual de proteínas totais encontradas no resíduo de abacaxi.

C= Percentual de cinzas totais encontrados no resíduo de abacaxi.

4.2.4.10. Compostos fenólicos totais

As amostras analisadas tiveram seus extratos fenólicos extraídos conforme a metodologia descrita por Rufino et al. (2010). Para as extrações foram pesados 5 g de amostra em béquer de 100 ml, adicionados de 20 ml de metanol à 50 % (v.v⁻¹). Estes foram homogeneizados e mantidos em repouso por 60 min a temperatura ambiente. Transcorrido o tempo, a mistura foi centrifugada à 15.000 rpm durante 15 min e o sobrenadante transferido para um balão volumétrico de 50 ml. O precipitado foi homogeneizado em 20 ml de acetona à 70 % (v.v⁻¹) e repousado por 60 min a temperatura ambiente. Após foi novamente centrifugado

a 15.000 rpm por 15 min e o sobrenadante transferido para o balão volumétrico contendo o primeiro sobrenadante obtido, o volume do balão foi completado para 50 ml com água destilada.

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método espectrofotométrico descrito por Swain; Hills (1959), utilizando ácido gálico como padrão de referência. Uma alíquota de 0,5 ml dos extratos das amostras foi transferida para tubo com tampa de rosca e adicionada de 2,5 ml do reagente de Folin-Ciocalteu a uma concentração de 10 % e 2,0 ml de carbonato de sódio a 7,5 %. Estes ficaram em repouso por 5 min à 50 °C ao abrigo da luz. Na sequência, foi feita a leitura da absorbância a 760 nm. Um branco, contendo apenas os reagentes, foi conduzido nas mesmas condições. A quantificação foi realizada através de curva analítica padrão contendo 0,1 a 0,5 mM de ácido gálico e os resultados expressos em mM equivalente de ácido gálico (EAG).ml⁻¹ de amostra.

4.2.5. Análises cromatográficas

4.2.5.1. Preparação das amostras para as análises cromatográficas

Para a identificação e quantificação dos carboidratos e ácidos orgânicos, fez-se as diluições das amostras em que se utilizou água ultrapura (Milli-Q®, Billerica, MA, EUA) na proporção 1:3 (v.v⁻¹) (amostra: água), seguida por homogeneização em vortex por um minuto. Posteriormente, transferiu-se para centrífuga a rotação de 15.000 rpm durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram passados em Sep-Pak C18® (Waters, Milford, EUA) e filtrados em membrana filtrante de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µm (Millipore® – Millex, Billerica, MA, EUA) em frasco âmbar de 2,0 ml (Agilent, Walsdorf, Alemanha) (REUTER, 2017; PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011).

Para análise dos teores de etanol, as amostras foram apenas diluídas em água ultrapura (Milli-Q®, Billerica, MA, EUA) 1:5 (v.v⁻¹) (amostra: água) (BAGEWADI, MULLA, NINNEKAR, 2016).

4.2.5.2. Perfil de ácidos orgânicos

A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos padrões de ácido acético, cítrico, láctico e succínico, com os observados nas amostras analisadas sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg.ml^{-1} .

Os ácidos orgânicos foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em sistema instrumental Shimadzu LC 20 A (Kyoto, Japão). O equipamento é constituído por bomba de alta pressão LC-20AT, injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Para as análises utilizou-se coluna cromatográfica Luna C18 (Phenomenex, 250 x 4,6 mm, 5 μm de partícula). A fase móvel consistiu em solução tampão fosfato de sódio 25 mM, com pH ajustado para 2,5 na vazão de $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$, a temperatura da coluna foi mantida à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e o volume de injeção em $20 \mu\text{L}$. A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores de índice de refração (RID-10A) e arranjo de fotodiodos (SPD-M20A), programado em comprimento de onda fixo de 215 nm e no modo de varredura de 200 a 400 nm. A aquisição e processamento dos dados foram realizados com o auxílio do Software Shimadzu LCsolution (Kyoto, Japão) (REUTER, 2015).

4.2.5.3. Perfil de carboidratos

A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos padrões de sacarose, glicose e frutose com os observados nas amostras analisadas sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg.ml^{-1} .

O perfil de carboidratos foi analisado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O equipamento é composto de bomba de alta pressão (LC-20AT), injetor automático (SIL-20AC HT), com vazão de $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ e com volume de injeção ajustado para $20 \mu\text{L}$, detector por índice de refração (RID-10A), forno de coluna (CTO-20A), mantido em temperatura constante de $85 \text{ }^\circ\text{C}$, módulo de controle (CBM-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm na forma iônica Pb^{+2} , Biorad, CA, EUA). Para esta análise, utilizou-se como fase móvel água ultrapura (Mili-Q[®]) por apresentar melhor resolução cromatográfica e melhor simetria de picos. A aquisição de

dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas com o auxílio do *software* LC Solutions (Shimadzu corporation, Kyoto, Japão) (PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011).

4.2.5.4. Teor de Etanol

A análise de etanol foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrometria de massas – CG-MS (Shimadzu QP 2010 Plus), conforme metodologia descrita por Bagewadi; Mulla; Ninnekar (2016). Para realizar a análise, as amostras foram diluídas (1:5) em água ultrapura (Milli-Q®, Billerica, MA, EUA). O CG-MS foi equipado com um amostrador automático e acelera a análise do etanol com sua separação e identificação simultâneas. O CG-MS possuía um filtro de massa quádruplo Rtx-5MS, coluna capilar (30 m 9 0,25 mm), intervalo de varredura 0,5 s e intervalo de massa 40-500 m/z. A temperatura da coluna foi mantida a 50 °C durante 1 min e esta aumentou gradativamente em 20 °C por min até uma temperatura final de 280 °C, durante 14,5 min. Já a temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. O gás Hélio foi utilizado como transportador, no cromatógrafo de gás, com volume de injeção de 1 µL. O CG-MS foi operado com energia de ionização eletrônica de 70 eV. A amostra foi processada durante 20 min. Etanol absoluto foi usado como padrão, em que foram feitas diluições para traçar uma curva, cuja faixa foi 0,01 à 1,6 % de etanol. Os resultados foram expressos em porcentagem de etanol presente na amostra.

4.2.6. Avaliação da Capacidade antioxidante

4.2.6.1. Capacidade antioxidante - DPPH•

Os extratos fenólicos foram preparados conforme a metodologia descrita por Rufino et al. (2010), descrito anteriormente no item 4.2.5.10, para análises dos CFT.

A capacidade antioxidante foi medida pela capacidade de sequestrar radicais DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), seguindo a metodologia utilizada por Casagrande et al. (2007). Foi adicionado 50 µL do extrato da amostra em 1 ml

de tampão acetato (pH 5,5), 1 ml de etanol absoluto e 0,5 ml de solução de DPPH 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, armazenados durante 10 min na ausência de luz. A leitura foi realizada em espectrofotômetro à 517 nm. A quantificação foi feita através da curva padrão de Trolox (Sigma). A solução de DPPH foi utilizada como controle. Os resultados foram expressos como a percentagem de inibição de radicais livres pela amostra (IRL %), calculada utilizando a equação 8.

$$IRL(\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

A= absorbância do controle

B= absorbância da amostra

4.2.6.2. Capacidade antioxidante - FRAP

Os extratos fenólicos utilizados foram obtidos conforme metodologia descrita por Rufino et al. (2010), descrito anteriormente no item 4.2.5.10, para análises dos CFT.

A capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) foi realizada conforme Rufino et al. (2007). Em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 90 μL de cada extrato para tubos de ensaio, acrescentou 270 μL de água destilada, misturou com 2,7 ml do reagente FRAP, homogeneizou-se em agitador de tubos e manteve-se em banho-maria à 37°C por 30 min. Transcorrido o tempo, realizou-se leitura em espectrofotômetro à 595 nm, utilizando o reagente FRAP como branco para calibrar o equipamento. A quantificação foi feita através da curva padrão de sulfato ferroso, e os resultados expressos em μM de sulfato ferroso por ml da amostra.

4.2.7. Análises microbiológicas

4.2.7.1. Identificação molecular da microbiota dos grãos de kefir

A análise de identificação molecular dos microrganismos presentes nos grãos de kefir foi realizada pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies,

localizada em Florianópolis-SC, em que utilizou o método DMD – Diagnóstico Microbiológico Digital.

A identificação de bactérias foi realizada utilizando o sequenciamento de alto desempenho das regiões V3/V4 do gene 16S rDNA, de acordo com Wang; Qian (2009) e Caporaso et al. (2012). Enquanto que a identificação das leveduras utilizou os *primers* ITS1 e ITS2, conforme metodologia descrita por White et al. (1999) e Schmidt et al. (2013).

4.2.7.2. Contagem de bactérias do ácido láctico

Para contagem de BAL, utilizou-se o ágar MRS (Man, Rogosa e Sharpe - MERCK) através da técnica de *pour plate*. Primeiramente fez-se as diluições seriadas, 25 ml de cada amostra foi diluída em 225 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-1}) em erlenmeyer de 250 ml. Dessa diluição 10^{-1} , transferiu-se 1 ml para um tubo contendo 9 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10^{-2}), e assim sucessivamente até diluição 10^{-9} . Foram inoculados 1 ml de cada diluição em placas estéreis, em seguida verteu-se 20 ml de ágar MRS já esterilizado e resfriado, e fez-se movimentos em forma de “8”. Após o meio solidificado, incubou-se em estufa bacteriológica à 37°C por 72 h, em condições anaeróbicas, conforme descrito por ISO 15214 (1998).

4.2.7.3. Coliformes totais e termotolerantes

As bebidas fermentadas por grãos de kefir antes de serem submetidas a avaliação sensorial foram avaliadas quanto a quantidade de coliformes totais e termotolerantes (à 45 °C). A avaliação foi realizada através da técnica dos tubos múltiplos, com 3 tubos por diluição. Os resultados foram expressos em número mais provável (NMP) por ml segundo a metodologia descrita por APHA (2001).

4.2.7.4. *Salmonella* sp.

As bebidas fermentadas por grãos de kefir antes de serem submetidas a avaliação sensorial foram avaliadas quanto a presença ou ausência de

Salmonella sp. A pesquisa desse microrganismo foi realizada através de teste rápido, empregando o kit Reveal 2.0 para *Salmonella* (NEOGEN® Corporation, Canadá- EUA).

4.2.8. Análise sensorial

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (1.790.802) envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina.

O teste foi realizado segundo a metodologia recomendada por Brasil (2005), utilizando teste de aceitação (aparência, aroma, sabor doçura e corpo/textura) com escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei extremamente) e intenção de compra com escala hedônica estruturada de 5 pontos, variando 1 (certamente não compraria) a 5 (certamente compraria). Modelo de ficha no Apêndice A.

A análise contou com a participação de 100 avaliadores não treinados adultos saudáveis (maiores de 18 anos), que tinham vínculo com a Universidade Estadual de Londrina/PR, entre estes, estudantes, servidores e professores. Antes da aplicação dos testes, os avaliadores foram esclarecidos quanto ao produto a ser avaliado e quanto à dinâmica da avaliação, conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice B).

4.2.9. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, exceto para as análises cromatográficas, que foram realizadas em duplicata. As análises de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey* para comparação múltipla das médias foram realizadas considerando o nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), foram feitas empregando-se o software *Statistica*®.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, L. M. **Fermentados alcoólico e acético de polpa e casca de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill): cinética das fermentações e caracterização dos produtos**. 2014, 142 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

ALSAYADI, M.; JAWFI, Y. A.; BELARBI, M.; SOUALEM-MAMI, Z.; MERZOUK, H.; SARI, D. C.; SABRI, F.; GHALIM, M. Evaluation of anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities of water kefir as probiotic on streptozotocin- induced diabetic wistar rats. **Journal of Diabetes Mellitus**, v. 4, p. 85-95, 2014.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC., 676 p. 2001.

ANFITEATRO, D. N. Kefir, a probiotic gem cultured with probiotic jewels. South Australia, Thanmere North Post Office, 37 p., 2000.

AOAC. **Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC international**. 19 ed. Gaithersburg: AOAC International; 2012.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification and characterization of endo b-1,4-D-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. **Journal 3 Biotech**, v.6, n.101, 2016.

BERNELA, M.; AHUJA, M.; THAKUR, R. Enhancement of anti-inflammatory activity of bromelain by its encapsulation in katira gum nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, 143 p. 18–24, 2016.

BOTELHO, L.; CONCEIÇÃO, A.; CARVALHO, V. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi 'smooth cayenne'. **Ciência e Agrotecnologia**, v.26, n.2, p.362-367, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. Brasília, DF, 2005. 1018 p.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados** de 23 de Outubro de 2007.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Normas Técnicas Especiais**. Resolução CNNPA nº 12, de 1978.

CANTERI, M. H. G.; MORENO, L.; WOSIACKI, G.; SCHEER, A. P. Pectina: da matéria-prima ao produto final. **Polímeros**, v.22, n.2, p.149-157, 2012.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.;

HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **International Society for Microbial Ecology**, v.6, p.1621–1624, 2012.

CARVALHO, J. M.; MAIA, G.A.; SOUSA, P. H. M.; RODRIGUES, S. Perfil dos principais componentes em bebidas energéticas: cafeína, taurina, guaraná e glucoronolactona. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.65, n.2, p.78-85, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; JUNIOR, W. A. V.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, p.183-190, 2007.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v.25, p.492–501, 2008.

CONAB – Análise Mensal – Guaraná, 2017. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_08_22_17_16_07_guarana_2_-_julho_de_2017.pdf. Acesso em: 16 de fevereiro de 2018.

CONESA, C.; SEGUI, L.; LAGUARDA-MIRO, N.; FITO, P. Microwaves as a pretreatment for enhancing enzymatic hydrolysis of pineapple industrial waste for bioethanol production. **Food and Bioproducts Processing**, v.100, p.203–213, 2016.

COSTA, J. M. C.; FELIPE, E. M. F.; MAIA, G. A.; BRASIL, I. M.; HERNANDEZ, F. F. H. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.2, p.228-232, 2007.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **Food Science and Technology**, v.66, p.572–581, 2016.

DAVIDOVIĆ, S. Z.; MILJKOVIĆ, M. G.; ANTONOVIĆ, D. G.; RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, M. D.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. I. Water Kefir grain as a source of potent dextran producing lactic acid bacteria. **Journal Hemijska Industrija**, v.69, n.6, p. 595–604, 2015.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Abacaxi: O Produtor Pergunta, a Embrapa Responde. 2 ed. revisada, 196 p. Brasília, 2013.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Abacaxi – Produção: Aspectos Técnicos. **Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia**, 77 p., Brasília, 2000.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultura do Guaranazeiro no Amazonas. **Embrapa Amazônia Ocidental**, 4 ed., 40 p., Manaus, 2005a.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Cultura do Guaranazeiro em Rondônia. Embrapa Rondônia, ISSN 1807-1805 Versão eletrônica, Rondônia, 2005b. Disponível em: <https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Guarana/CultivodoGuaranazeiroRO/importecon.htm>. Acesso em: 23 de agosto de 2016.

FACUNDO, H. V. V. **Mudanças no perfil sensorial e de voláteis do suco de abacaxi concentrado durante o processamento**. 2009, 82 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

FAOSTAT (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics Division. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso: 05 de janeiro de 2018.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, G. V. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p.86-95, 2017.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; SOCCOL, C. R. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, p.1–11, 2016.

GANDRA, E. A.; GANDRA, T. K. V.; MELLO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, v. 30, n.1, p.109-118, 2008.

GEORGE, S.; BHASKER, S.; MADHAV, H.; NAIR, A.; CHINNAMMA, M. Functional Characterization of Recombinant Bromelain of Ananas comosus Expressed in a Prokaryotic System. **Molecular Biotechnology**, v.56, p.166-174, 2014.

GONDIM, J. M.; MOURA, M. F. V.; DANTAS, A. S.; MEDEIROS, R. L. S.; SANTOS, K. M. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.825-827, 2005.

GOLOWCZYC, M. A.; GUGLIADA, M. J.; HOLLMANN, A.; DELFEDERICO, L.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; SEMORILE, L.; ANTONI, G. Characterization of homofermentative lactobacilli isolated from kefir grains: potential use as probiotic. **Journal of Dairy Research**, v.75, n.2, p.211–217, 2008.

HARTA, O.; ICONOMOPOULOU, M.; BEKATOROU, A.; NIGAM, P., KONTOMINAS, M.; KOUTINAS, A. A. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. **Food Chemistry**, v. 88, p. 237–242, 2004.

HSIEH, H. H.; WANG, S. Y.; CHEN, T. L.; HUANG, Y. L.; CHEN, M. J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.73–81, 2012.

INFANTE, J.; SELANI, M. M.; TOLEDO, N. M. V.; SILVEIRA-DINIZ, M. F.; ALENCAR, S. M.; SPOTO, M. H. F. Atividade antioxidante de resíduos agroindustriais de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n.1, p. 87-91, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Edição, 1ª Edição Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria.

KOBORI, C. N. AND JORGE, N. Caracterização dos Óleos de Algumas Sementes de Frutas como Aproveitamento de Resíduos Industriais, **Ciência e Agrotecnologia**, v.29, n.5, p.1008-1014, 2005.

LAUREYS, D.; VUYST, L. D. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.8, p.2564–2572, 2014.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 6th ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

LEMOS, D. M.; OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; SOUSA, E. P.; MATIAS, M. L. Composição físico-química de resíduos de abacaxi in natura e desidratado. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.4, n.2, p.53-56, 2010.

LEONEL, S.; LEONEL, M.; SAMPAIO, A. C. Processamento de frutos de abacaxizeiro cv Smooth cayenne: perfil de açúcares e ácidos dos sucos e composição nutricional da farinha de cascas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.36, n.2, p.433-439, 2014.

LIMA, P. C. C.; SOUZA, B. S.; SANTINI, A. T.; OLIVEIRA, D. C. Aproveitamento agroindustrial de resíduos provenientes do abacaxi 'pérola' minimamente processado. **HOLOS**, v. 02, p.122-136, 2017.

MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v.38. p.113-124, 2014.

MARTINS, C. A. **Avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo do guaraná (Paullinia cupana) em pó**. 2010, 130 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARTINS, R. C.; CHIAPETTA, S. C.; PAULA, F. D.; GONÇALVES, E. C. B. A. Avaliação da vida de prateleira de bebida isotônica elaborada com suco concentrado de frutas e hortaliças congelado por 30 dias. *Alimentos Nutricionais Araraquara*, v.22, n.4, p.623-629, 2011.

MOUSTAKAS, D.; MEZZIO, M.; RODRIGUEZ, B. R.; CONSTABLE, M.A.; MULLIGAN, M. E.; VOURA, E. B. Guarana provides additional stimulation over caffeine alone in the planarian model. **Plos One**, v.10, n.4, p.1-17, 2015.

MUNIZ, C. R.; BORGES, M. F.; ABREU, F. A. P.; NASSU, R. T.; FREITAS, C. A. S. Bebidas fermentadas a partir de frutos tropicais. **Boletim CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 309-322, 2002.

NEOPROSPECTA, Diagnóstico microbiológico digital. 2018. Disponível em: <https://neopropecta.com/tecnologias/#tecnologia1>. Acesso em: 11 de janeiro de 2018.

NILSEN. Quatro fatores essenciais que movem o mercado de bebidas. 2016. Disponível em: <http://www.nielsen.com/br/pt/press-room/2016/4-fatores-essenciais-que-movem-o-mercado-de-bebidas.html>. Acesso em: 25 de agosto de 2016.

OCDE-FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. Perspectivas Agrícolas 2015-2024. v.11, 54 p, 2015. Disponível em: <https://www.fao.org.br/download/PA20142015CB.pdf>. Acesso em 19 de agosto de 2016.

OLIVEIRA, A. S. B. **Estudo da secagem de casca de abacaxi visando desenvolvimento de chá a partir do produto seco**. 2014, 100 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2014.

PASTERNAK, J. Novas metodologias de identificação de micro-organismos: o MALDI-TOF. **Einstein**, v.10, n.1, p.118-119, 2012.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v.34, n.4, p.689–694, 2011.

PESSOA-FILHO, M. A. C.P. Metagenômica e sua aplicação no estudo de diversidade e função de microrganismos de solos do cerrado. EMBRAPA – Cerrado, 29 p., 2010.

RANDAZZO, W.; CORONA, O.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; GERMAN, M. A.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v.54, p.40-51, 2016.

REUTER, W. M. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection. **Perkin Elmer**, 2015.

- RIBEIRO, B. D. COELHO, M. A. Z. Obtenção de extratos de guaraná ricos em cafeína por processo enzimático e adsorção de taninos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, n.3, p.261-270, 2012.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121, p.996–1002, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA Comunicado Técnico**, v.127, p.1-4, 2007.
- SAADI, L. O.; ZAIDI, F.; OOMAH, BB. D.; HAROS, M.; YEBRA, M. J.; HOSSEINIAN, F. Pulse ingredients supplementation affects kefir quality and antioxidant capacity during storage. **LWT -Food Science and Technology**, v. 86, p. 619-626, 2017.
- SARZI, B.; DURIGAN, J. F.; ROSSI JUNIOR, O. D. Temperatura e tipo de preparo na conservação de produto minimamente processado de abacaxi “Pérola”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.376-380, 2002.
- SELANI, M. M. **Caracterização e aplicação de subprodutos de frutas no desenvolvimento de hambúrguer bovino e extrusado de milho**. 2015, 125 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2015.
- SCHMIDT, P. A.; BÁLINT, M.; GRESHAKE, B.; BANDOWA, C.; RÖMBKE, J.; SCHMITT, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology & Biochemistry**, p.15, 2013.
- SILVA, D. I. S.; NOGUEIRA, G. D. R.; DUZZIONI, A. G.; BARROZO, M. A. S. Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. **Industrial Crops and Products**, v.50, p.557–562, 2013.
- SILVA, K. R.; RODRIGUES, S. A.; XAVIER FILHO, L.; LIMA, A. S. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, n. 152, n. 2, p. 316–325, 2009.
- SOUSA, B. A. A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.)**. 2009, 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.
- SOUSA, M. S. B.; VIEIRA, L. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.14, n.3, p. 202-210, 2011.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p. 63-68, 1959.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas: NEPA-UNICAMP, 4a edição ampliada e revisada, 2017.

VEIGA, L. L. A.; AMORIM, H.; MORAES, J.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; QUITERIO, S. L. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in toasted guaraná (*Paullinia cupana*) by high performance liquid chromatography with a fluorescence detector. **Food Chemistry**, v.152, p.612–618, 2014.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEIBNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v.27, p.672-678, 2010.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v.4, n.10, 2009.

WANG, S. Y.; CHEN, H. C.; LIU, J. R.; LIN, Y. C.; CHEN, M. J. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters. **Journal of Dairy Science**, v.91, n.10, p.3798-805, 2008.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. **PCR Protocols**, p. 315–322, 1999.

ZANIRATI, D. F. **Caracterização de bactérias lácticas da microbiota de grãos de kefir cultivados em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo**. 2012, 87 p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

ZHU, X.; AL-MONIEE, M. A. Molecular microbiology techniques. **Trends in Oil and Gas Corrosion Research and Technologies**. p.513–536, 2017.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão foram descritos na forma de artigo científico, o qual será submetido a um periódico científico para publicação.

- 5.1. Artigo: Desenvolvimento de bebidas fermentadas por kefir de água a partir de sucos de resíduo de abacaxi

ARTIGO

DESENVOLVIMENTO DE BEBIDA FERMENTADA POR KEFIR DE ÁGUA A PARTIR DE SUCOS DE RESÍDUO DE ABACAXI

MENEZES^a, J. L., PRATES^a, D. F.; SPINOSA^{a*}, W. A.

^aUniversidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 86057-970, Londrina, PR, Brasil. *Autor correspondente. Tel.: +55 43 3371 5971; fax: +55 43 3371 4585. *E-mail: wilma.spinosa@uel.br

RESUMO

Resíduo de abacaxi reúne uma série de nutrientes e biocompostos, inclusive açúcares simples e hidrolisáveis, podendo ser empregados em processos fermentativos. A fermentação de resíduos, a partir de grãos de kefir, pode ser uma opção saudável, visto que, o kefir é tido como uma bebida probiótica. Objetivou-se desenvolver bebidas fermentadas por grãos de kefir aceitáveis sensorialmente, utilizando como substratos os extratos de resíduo de abacaxi, com e sem extrato de guaraná. Avaliou-se as características físico-químicas e microbiológicas durante sua elaboração e armazenamento a 4°C por até 21 dias de armazenamento. Os microrganismos identificados nos grãos de kefir foram diversificados e com presença de cepas com potencial probiótico. Houve estabilidade de sólidos solúveis totais (SST), compostos fenólicos totais (CFT) durante os 21 dias, e pH e acidez total titulável (ATT), foram estáveis até 14 dias. Conclui-se que é possível desenvolver as bebidas e que estas podem ser uma opção de bebidas não lácticas com presença de microrganismos com potencial probiótico. As bebidas desenvolvidas tiveram aceitação sensorial, além de apresentarem características físico-químicas e microbiológicas desejáveis durante o tempo de armazenamento, como baixo teor de açúcar, e contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) mínima de 10^7 UFC.ml⁻¹ até 21 dias.

Palavras-chave: *Ananas comosus (L) Merril*. Cultura mista. Bioprocessos. Probiótico não láctico.

1. INTRODUÇÃO

O resíduo de abacaxi resultante do seu processamento, tais como bagaços e cascas reúnem uma série de nutrientes e biocompostos. Açúcares, fibras e moléculas do grupo dos fenóis e ácidos orgânicos se destacam e são passíveis de apresentarem propriedades antimicrobianas e de antioxidantes. Salienta-se que, os resíduos de algumas frutas, podem

apresentar-se com compostos bioativos mais concentrados quando comparados aos de suas polpas (REZENDE, NOGUEIRA, NARAIN, 2017; PLAZA et al., 2016; ROCHELLE et al., 2016).

Estudos tem demonstrado que o aproveitamento de resíduo de abacaxi para o desenvolvimento de novos produtos é uma alternativa viável além de produzir uma consequente diminuição no impacto ambiental e desperdício (OLIVEIRA, 2014; ALVARENGA, 2014; SELANI, 2015; LIMA et al., 2017). Estes resíduos apresentam nutrientes, inclusive açúcares simples e hidrolisáveis (SARZI et al., 2002), e podem ser empregados para produtos obtidos de processos oriundos da biotecnologia (SOUSA, 2009), tais como processos fermentativos para elaboração de bebidas.

A fermentação de frutas, vegetais e seus resíduos, a partir de grãos de kefir, pode ser uma opção para o mercado de consumo, além de minimizar as perdas de produção, aumenta a renda dos agricultores e introduz novas opções de produtos (RANDAZZO et al., 2016).

O kefir é conhecido como uma bebida probiótica que traz diversos benefícios a saúde. Os grãos de kefir podem ser utilizados para fermentar diferentes substratos, como soro de queijo, sucos de frutas, melaços ou xaropes açucarados (FIORDA et al., 2016a). Kefir é um consórcio de microrganismos, que consiste em uma simbiose de bactérias, especialmente lácticas e acéticas e leveduras (NIKOLAOU et al., 2017) associadas em uma matriz polissacarídica, conhecida como dextrano, quando fermentado em solução açucarada (HSIEH et al., 2012).

Devido aos vários efeitos benéficos do kefir, bem como uma alternativa para utilização de resíduo de abacaxi, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver bebidas fermentadas por kefir, a partir dos extratos de resíduo de abacaxi, com e sem extrato de guaraná, e avaliar aceitação sensorial, características físico-químicas e microbiológicas durante o armazenamento.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Inóculo

Utilizou-se grãos de kefir de água, na concentração 5 %, m.m⁻¹, conforme Otles; Cagindi (2003). Os grãos de kefir foram mantidos em substrato estéril, constituído de água filtrada adicionada de 10 % (m.m⁻¹) de açúcar mascavo (MARSH et al., 2013), incubados à 25 °C. Antecedendo as 24 h do processo fermentativo, para o desenvolvimento das bebidas, os grãos de kefir eram repicados para o substrato estéril e se utilizava apenas os grãos.

2.2 *Substratos fermentescíveis*

2.2.1 *Elaboração do xarope*

O xarope foi preparado em frascos reagentes Schott com tampa, a partir da dissolução de açúcar mascavo em água filtrada (10 %, m.m⁻¹, de açúcar mascavo em relação ao total de bebida produzida) de acordo com Marsh et al. (2013), os mesmos foram esterilizados (121 °C, 2,1 bar, 15 min) e resfriados até 25 °C.

2.2.2 *Elaboração dos extratos do resíduo de abacaxi*

O resíduo utilizado para elaboração do extrato compunham parte úmida da casca e bagaço, da variedade *Smoth cayenne*, cultivada e colhida na safra de verão de 2016, no município de Cambé/PR. Os extratos do resíduo de abacaxi foram elaborados utilizando-se o resíduo de abacaxi congelado e água filtrada na proporção 2:1 (m.m⁻¹), adicionados de 1,3 % (m.m⁻¹) de hortelã fresca. Todos os ingredientes foram misturados em liquidificador (Bermar, BM 43 NR, Brasil) por 2 min. O extrato do resíduo foi filtrado, sendo a porção líquida transferida para frascos reagentes Schott com tampa e pasteurizados a 60 °C por 30 min e arrefecidos a 25 °C. Para elaboração da formulação com extrato de guaraná, adicionou-se ao extrato do resíduo de abacaxi 0,15 % (m.m⁻¹) de extrato de guaraná (DUAS RODAS®), respeitando a quantidade permitida de cafeína, conforme a Resolução RDC n°273 (BRASIL, 2005a).

2.3 *Formulações das Bebidas Fermentadas por Kefir*

Elaborou-se uma formulação denominada controle (FC), com a adição somente do xarope. Duas formulações foram desenvolvidas tendo como substrato fermentescível o extrato do resíduo de abacaxi e o xarope. Uma formulação foi sem adição de extrato de guaraná (F1) e a outra com adição de extrato de guaraná (F2) (Tabela 1).

Tabela 1 - Formulações das bebidas fermentadas por kefir

Ingredientes	Etapa de adição do ingrediente no processo de elaboração	Formulações (g)		
		FC	F1	F2
Água	Xarope	205	205	205
Açúcar		45	45	43
Grãos de kefir	1 ^a	22,5	22,5	22,5
ERA	2 ^a	na	200	200
Água	2 ^a	200	na	na
Extrato de guaraná	2 ^a	na	na	2,0
Total*		450	450	450

FC: controle; F1: sem adição de extrato de guaraná; F2: com extrato de guaraná; ERA: Extrato do resíduo de abacaxi; na: não adicionado. *Total: balanço de massas sem a adição dos grãos de kefir.

2.4 Fermentação e armazenamento das bebidas

O processo fermentativo para elaboração das bebidas ocorreu em duas etapas (Figura 1): na primeira etapa, os grãos de kefir foram transferidos assepticamente para os frascos reagentes Schott de 500 ml, com tampa de rosca, contendo o xarope. A fermentação ocorreu em câmara BOD termostaticada (J. Prolab, JP 1000, Brasil) à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h, com as tampas dos frascos semiabertas. Para a segunda etapa, os grãos de kefir foram filtrados e somente o líquido obtido através da primeira etapa foi transferido para garrafas de vidro âmbar (500 ml) com tampas tipo *flip top*. Nessa segunda etapa, prosseguiu-se com a adição nas garrafas, da água para elaboração da FC, do extrato do resíduo de abacaxi para elaboração da F1 e extrato do resíduo de abacaxi com extrato de guaraná para elaboração da F2. A fermentação foi conduzida nas garrafas com as

O resíduo de abacaxi foi avaliado quanto a composição proximal, teor de umidade, cinzas totais, proteínas totais, fibra totais, carboidratos (AOAC, 2012) e lipídeos totais (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Os teores de pH, SST (AOAC, 2012), ATT (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), CFT (SWAIN; HILLS, 1959), perfil de carboidratos (PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011), ácidos orgânicos (REUTER, 2015) e teor de etanol (BAGEWADI, MULLA, NINNEKAR, 2016) por cromatografia, foram avaliados nos extratos do resíduo de abacaxi com e sem extrato de guaraná.

2.5.3 Avaliação das bebidas fermentadas por kefir durante armazenamento a 4°C

Teores de pH, SST (AOAC, 2012), ATT (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), perfil de carboidratos (PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011), ácidos orgânicos (REUTER, 2015) e etanol (BAGEWADI, MULLA, NINNEKAR, 2016) por cromatografia, foram avaliados antes e após cada uma das duas etapas de fermentação, para as três formulações e durante o tempo de armazenamento à 4 °C por 7 dias, 14 dias e 21 dias, das bebidas F1 e F2.

As bebidas fermentadas por kefir (FC, F1 e F2) e as formulações F1 e F2 foram avaliadas quanto aos seus teores de CFT (SWAIN; HILLS, 1959), atividade antioxidante por FRAP (RUFINO et al., 2007) e DPPH (CASAGRANDE et al., 2007), logo após o término da segunda fermentação e ao longo do período de armazenamento, respectivamente.

2.5.4 Viabilidade das bactérias do ácido láctico (BAL)

As BAL foram analisadas nas bebidas F1 e F2 logo após o término da segunda fermentação e monitoradas durante o período de armazenamento à 4°C por 7 dias, 14 dias e 21 dias. Para contagem de BAL, utilizou-se o ágar MRS - Man, Rogosa e Sharpe (MERCK), através da técnica de *pour plate* conforme protocolo da ISO 15214 (1998).

2.5.5 Análise microbiológica

As bebidas fermentadas, antecedendo a avaliação sensorial, foram submetidas às análises de presença de *Salmonella* sp., através do kit Reveal 2.0 para *Salmonella* (NEOGEN® Corporation, Canadá- EUA) e contagem de coliformes totais e termotolerantes à 45 °C, de acordo com a metodologia de número mais provável (NMP) descrita na APHA (2001).

2.5.6 Análise sensorial

As bebidas fermentadas F1 e F2, após o término da segunda fermentação e refrigeração por 4h à 4° C, foram avaliadas sensorialmente, por meio da aplicação de teste de aceitação por escala hedônica (BRASIL, 2005b). Utilizou-se uma escala estruturada de nove pontos (1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente), pela qual foram avaliados cinco atributos (aparência, aroma, sabor, doçura e corpo/textura). Foi avaliada a intenção de compra com escala hedônica estruturada de 5 pontos (1= certamente não compraria e 5=certamente compraria). Estas avaliações foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa, envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. As amostras foram codificadas utilizando-se números de três dígitos ao acaso, servidas aleatoriamente em taças de plástico transparente, com aproximadamente 30 ml, à temperatura de refrigeração. Os provadores foram instruídos a enxaguar a boca com água entre as provas das amostras, para evitar a possível interferência de sabor residual das bebidas. A equipe sensorial contou com 100 avaliadores, não treinados, adultos saudáveis (maiores de 18 anos), que tinham vínculo com a Universidade Estadual de Londrina/PR, entre estes estudantes, servidores e professores. Antes da aplicação dos testes, os avaliadores foram esclarecidos quanto ao produto a ser avaliado e quanto à dinâmica da avaliação, conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.5.7. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, exceto para as análises cromatográficas, que foram realizadas em duplicata. As análises de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey* para comparação múltipla das

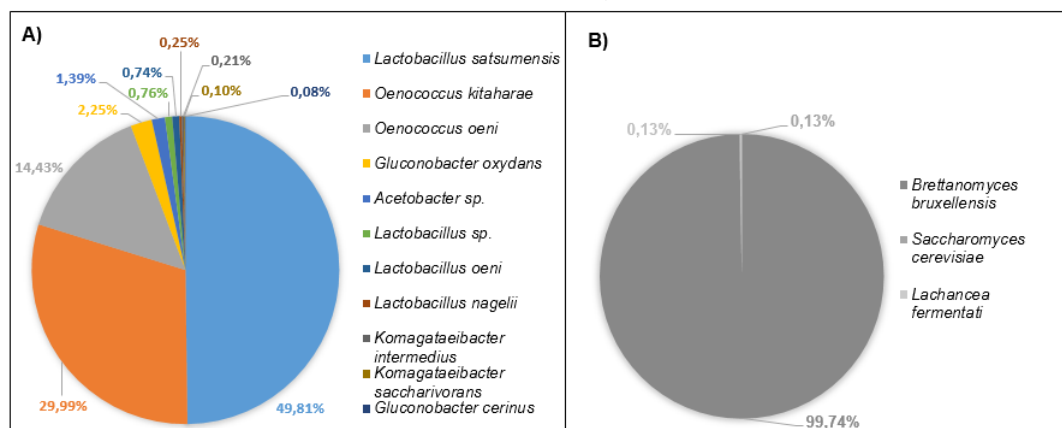
médias foram realizadas considerando o nível de 5 % de significância ($p < 0,05$), foram feitas empregando-se o software *Statistica*®.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação da microbiota do kefir

Os grãos de kefir utilizados como inóculo neste estudo apresentaram uma microbiota diversificada, foi possível identificar 11 espécies bacterianas (Figura 2-A) e 3 espécies de leveduras (Figura 2-B). O gênero *Lactobacilos* foi predominante entre as bactérias, com destaque para espécie de *Lactobacillus satsumensis* (49,81 %). *Gluconobacter oxydans* esteve presente em 2,25 %, sendo esta uma bactéria do ácido acético (BAA). Em relação as leveduras, *Brettanomyces bruxellensis* esteve presente em maior proporção (99,74 %).

Figura 2 - Percentagem de bactérias (A) e leveduras (B) isoladas dos grãos de kefir de água



A diversidade microbiana dos grãos de kefir de água tem sido observada em pesquisas recentes, tanto por técnicas dependentes, quanto independentes de cultivo. Os microrganismos presentes em grande parte da microbiota dos grãos de kefir e também encontrados nesse estudo, são espécies de BAL, bactérias do ácido acético (BAA) e leveduras (LAUREYS et al., 2017). A composição e a proporção dos microrganismos possam

variar conforme o país de origem, a região e manutenção dos grãos (MONAR et al., 2014).

Os resultados demonstram a presença de espécies potencialmente probióticas, podendo-se inferir que a utilização desses grãos de kefir produziram bebidas com possível potencial probiótico.

Lactobacillus sp. apresentam atributos probióticos, como descrito no estudo de Shuhadha et al. (2017). Algumas cepas de *Oenococcus oeni* também foram sugeridas como bactéria probiótica (FOLIGNÉ et al., 2010). Estes microrganismos foram identificados neste trabalho (Figura 2).

S. cerevisiae é frequentemente associada ao kefir de água (LAUREYS, VUYST, 2014; MARSH et al., 2013; LEITE et al., 2012, HSIEH et al., 2012; GULITZ et al., 2011; MIGUEL et al., 2011; WALDHERR et al., 2010). Entretanto, estudos tem demonstrado a presença de outras leveduras, tais como *B. bruxellensis* (LAUREYS, VUYST, 2014; MARSH et al., 2013; HSIEH et al., 2012), assim como *L. fermentati* (Fiorda et al., 2016a).

3.2 Caracterização físico-química do resíduo de abacaxi e dos extratos do resíduo

De acordo com a composição proximal (Tabela 2), os carboidratos totais foram os nutrientes majoritários encontrados no resíduo de abacaxi, indicando que os mesmos podem ser empregados como substrato fermentescível.

Além disso, o resíduo apresentou considerável teor de fibra alimentar total, que tem efeitos positivos para o organismo humano. A fibra alimentar é resistente à ação das enzimas digestivas humanas, e são classificadas como fibra alimentar solúvel (facilmente fermentadas pela microflora do intestino grosso) e insolúvel (causam aumento do bolo fecal), devido à essas características, as fibras são classificadas como prebióticas, pois favorecem a multiplicação de microrganismos benéficos (BERNAUD; RODRIGUES, 2013). Este é mais um fator favorável para utilização do resíduo de abacaxi como matéria-prima para o desenvolvimento de novas bebidas.

Tabela 2- Composição proximal do resíduo de abacaxi (RA)

Parâmetros(g.100g⁻¹)	RA (b.u.)
Carboidratos totais*	8,525±0,00
Cinzas Totais	0,51±0,02
Fibra alimentar total	3,05±0,01
Lipídeos Totais	0,02±0,01
Proteínas Totais	1,16±0,03
Umidade	86,74±0,74

*Carboidratos por diferença. Os resultados expressam a média±desvio padrão. b.u.: base úmida.

Os teores de proteína totais, cinzas totais e fibra alimentar total do resíduo de abacaxi foram 1,29, 1,28 e 3,05 vezes maiores, respectivamente, comparados aos teores de polpa *in natura* de abacaxi (TACO, 2011). Ao passo que os valores de umidade são próximos e o valor de lipídeos é 5 vezes menor do que o obtido na polpa.

Sousa (2009) encontrou teores de 3,37±0,04 g.100g⁻¹ de proteína, 1,60±0,07 g.100g⁻¹ de cinzas e 0,15±0,15 g.100g⁻¹ de lipídeos para os resíduos, sendo estes superiores aos encontrados neste estudo. Vega-Castro et al. (2016) encontraram teores de umidade (70,97±0,84 g.100g⁻¹) e proteínas totais (0,63± 0,02 g.100g⁻¹) inferiores ao resíduo utilizado neste estudo, já o teor de cinzas totais (1,10±0,08 g.100g⁻¹) foi superior. Gil; Maupoey (2018) encontraram valores de umidade (85,0±3,0 g.100g⁻¹) para resíduo de abacaxi próximos aos obtidos neste trabalho.

A diferença dos teores nutricionais obtidos entre os estudos reportados na literatura podem ser justificados pelo fato de que os resíduos obtidos de variedades e cultivos sazonais diferentes de abacaxis apresentam diferentes composições (LEMOS et al., 2010).

Em relação a caracterização físico-química dos extratos do resíduo de abacaxi, sem extrato de guaraná (ERA) e com extrato de guaraná (ERAEG), estes apresentaram diferença significativa (Tabela 3) nos teores de SST, ATT, pH, CFT, sacarose, glicose, láctico, cítrico e succínico. As diferenças nos extratos do resíduo se devem, provavelmente, a adição de extrato de guaraná no ERA para elaboração de F2.

Tabela 3 - Caracterização do extrato do resíduo de abacaxi (ERA) e extrato do resíduo de abacaxi com extrato de guaraná (ERAEG)

Parâmetros	ERA	ERAEG
SST	5,13±0,06 ^b	5,28±0,07 ^a
ATT	4,55±0,01 ^a	4,48±0,01 ^b
pH	3,52±0,01 ^b	3,64±0,01 ^a
CFT	2,86±0,12 ^b	3,16±0,09 ^a
Etanol	<0,01	<0,01
Carboidratos (mg.ml⁻¹)		
Sacarose	0,22±0,01 ^b	0,36±0,01 ^a
Glicose	23,97±0,11 ^a	21,60±0,14 ^b
Frutose	24,62±0,13 ^a	24,12±0,04 ^a
Ácidos orgânicos (mg.ml⁻¹)		
Láctico	<0,01	0,09±0,01 ^a
Acético	0,04±0,00 ^a	0,05±0,01 ^a
Cítrico	4,30±0,01 ^a	3,96±0,01 ^b
Succínico	<0,01	0,09±0,00 ^a

SST: sólidos solúveis totais (°Brix). ATT: acidez titulável total (g ácido cítrico.100g⁻¹). CFT: compostos fenólicos totais (mM EAG.g⁻¹). Etanol (%). Os resultados expressam a média±desvio padrão. Médias na mesma linha com letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste de *Tukey*.

Em ambos os extratos do resíduo, com e sem extrato de guaraná, o perfil de carboidratos apresentou 3 açúcares fermentescíveis (Tabela 3), que podem ser metabolizados pela microbiota dos grãos de kefir, sendo a frutose o monossacarídeo em maior concentração. A sacarose está em maior concentração no ERAEG, visto que o extrato de guaraná comercial, usado neste estudo, tem carboidratos em sua composição.

Os CFT mostraram-se em maior concentração no extrato do resíduo preparado com extrato de guaraná, visto que o guaraná possui compostos fenólicos em sua composição (MARTINS, 2010).

Não foi detectado etanol nos extratos do resíduo de abacaxi, sugerindo que os mesmos não estavam fermentados.

A utilização de substratos alternativos, como o extrato do resíduo de abacaxi, para o desenvolvimento de bebidas fermentadas por kefir é uma maneira para converter açúcares em ácidos orgânicos e álcool. Os substratos alternativos podem ajudar a manter e/ou melhorar as propriedades de segurança alimentar, nutrição, sensoriais e vida útil das bebidas fermentadas (FIORDA et al., 2016a).

Dessa maneira, a utilização de extrato de resíduo de abacaxi poderá melhorar as características sensoriais e nutricionais obtidas em bebidas de kefir, visto que os extratos possuem ácidos orgânicos, açúcares, CFT, entre outros nutrientes.

3.3 Avaliações das bebidas fermentadas por kefir, durante sua elaboração e período de armazenamento à 4°C

Em relação ao pH e SST, durante as etapas de fermentação, todas as bebidas (FC, F1 e F2) tiveram decréscimo nesses teores, e aumento da ATT (Tabela 4). A diminuição nos valores de pH e SST está associada ao catabolismo dos açúcares pelos microrganismos presentes, convertendo os substratos em ácidos orgânicos, etanol, dióxido de carbono e outros compostos voláteis (FIORDA, et al., 2016a). Além disso, a adição de extrato de resíduo de abacaxi, na segunda etapa de fermentação, nas formulações F1 e F2, contribuíram para o decréscimo no pH e elevação da ATT.

As bebidas fermentadas por kefir, após o término da segunda etapa de fermentação (bebida pronta), F1 e F2, não obtiveram diferença significativa entre si em relação aos teores de pH, ATT e SST, e as mesmas diferiram significativamente da FC, em relação aos mesmos parâmetros. Em que, F1 e F2 tiveram os menores valores de pH e maiores valores de ATT, indicando que os microrganismos de kefir metabolizaram os açúcares e produziram ácidos orgânicos em maior quantidade que em FC (Tabela 4), além de ter influência da adição do extrato de resíduo de abacaxi, que é uma fruta ácida.

Os perfis de pH, ATT e SST indicam que os microrganismos presentes nos grãos de kefir foram capazes de se adaptarem aos substratos do extrato do resíduo de abacaxi. Além disso, F1 e F2 obtiveram valores de pH abaixo de 4,5, sendo consideradas bebidas ácidas, o que dificulta a proliferação de microrganismos patogênicos durante o armazenamento das mesmas.

Corona et al. (2016) desenvolveram bebidas de kefir com vegetais, em que para o pH, a bebida a partir de suco de morango obteve valor similar

ao deste estudo ($3,60\pm 0,00$) e para ATT o suco de melão ($5,33\pm 0,31$) foi similar.

Durante o tempo de armazenamento à 4 °C, o pH, ATT e SST de F1 e F2 não diferiram estatisticamente, mostrando estabilidade por 7 e 14 dias para pH e ATT, e durante os 21 dias para SST. Isso mostra o potencial para o desenvolvimento de bebida com kefir de água e aproveitamento de resíduo, para uma nova opção de bebida não láctea, possivelmente probiótica e com reduzido teor de açúcar.

A variação no perfil dos ácidos orgânicos durante as etapas de fermentação e período de armazenamento das bebidas foi observada. Essa variação é resultante da adição dos extratos do resíduo com e sem extrato de guaraná na segunda etapa da fermentação e complementadas pela ação da microbiota diversificada dos grãos de kefir capazes de produzir tais ácidos.

O perfil de ácidos orgânicos nas formulações FC, F1 e F2, identificados ao longo das etapas de fermentação evidenciaram que, os ácidos acético e láctico foram quantificados após as 24 h da primeira etapa de fermentação (Tabela 4). Na amostragem inicial (0 h) da primeira etapa de fermentação, os ácidos presentes foram o cítrico e o succínico, oriundos provavelmente do açúcar da cana, matéria-prima utilizada para elaboração do xarope. O ácido cítrico foi majoritário para as bebidas F1 e F2, e ácido láctico para FC.

Durante o período de armazenamento, houve um aumento na concentração de todos os ácidos mesmo em baixas temperaturas, evidenciando ação das BAL e BAA.

Fiorda et al. (2016b) ao produzir bebida de kefir a partir de mel, obteve ácido cítrico como majoritário ($69,86 \text{ mg.mL}^{-1}$), e foram detectados outros ácidos orgânicos, como láctico, acético e succínico, sendo estes os mesmos perfis de ácidos encontrados neste estudo.

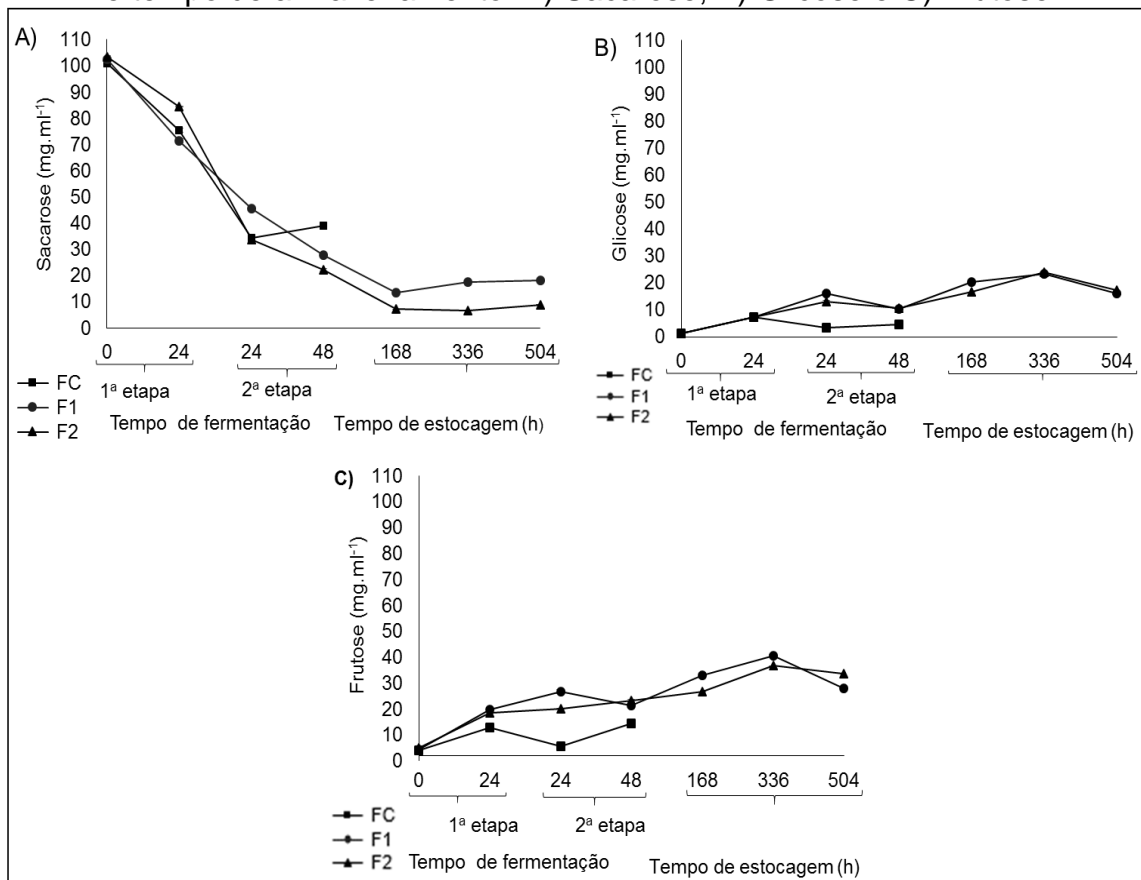
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos e caracterização do perfil de ácidos orgânicos avaliados nas etapas de fermentação e durante o período de armazenamento

	1ª etapa de fermentação		2ª etapa de fermentação		Armazenamento das bebidas à 4 °C			
	0 h (inicial)	24 h	0 h	24 h*	7 dias	14 dias	21 dias	
pH								
FC	7,66±0,11 ^{aA}	4,76±0,03 ^{aC}	5,10±0,03 ^{aB}	4,66±0,01 ^{aD}	nd	nd	nd	
F1	7,64±0,01 ^{aA}	4,75±0,03 ^{aB}	3,81±0,01 ^{bC}	3,67±0,01 ^{bD}	3,54±0,07 ^{aE}	3,50±0,01 ^{aE}	3,73±0,00 ^{aCD}	
F2	7,61±0,01 ^{aA}	4,76±0,02 ^{aB}	3,87±0,01 ^{bC}	3,61±0,01 ^{bD}	3,49±0,00 ^{aE}	3,43±0,01 ^{aE}	3,66±0,00 ^{aD}	
Acidez Total Titulável (g ácido cítrico. L⁻¹)								
FC	0,13±0,00 ^{aC}	1,17±0,01 ^{aA}	0,50±0,00 ^{bBC}	0,96±0,01 ^{bAB}	nd	nd	nd	
F1	0,13±0,00 ^{aE}	1,21±0,01 ^{aD}	3,71±0,01 ^{aC}	5,42±0,02 ^{aB}	7,06±0,03 ^{aA}	7,69±0,04 ^{aA}	5,69±0,03 ^{bB}	
F2	0,13±0,00 ^{aF}	1,21±0,06 ^{aE}	3,71±0,06 ^{aD}	5,46±0,12 ^{aC}	7,38±0,02 ^{aAB}	7,94±0,07 ^{aA}	6,94±0,03 ^{aB}	
Sólidos Solúveis Totais (°BRIX)								
FC	18,55±0,08 ^{aA}	17,32±0,09 ^{aB}	9,29±0,04 ^{bC}	9,07±0,01 ^{bC}	nd	nd	nd	
F1	18,62±0,05 ^{aA}	17,36±0,07 ^{aB}	12,58±0,01 ^{aC}	10,71±0,15 ^{aD}	9,96±0,23 ^{aE}	10,18±0,09 ^{aE}	10,08±0,14 ^{aE}	
F2	17,92±0,08 ^{bA}	16,81±0,16 ^{bB}	12,81±0,07 ^{aC}	10,90±0,07 ^{aD}	10,02±0,14 ^{aE}	10,17±0,08 ^{aE}	10,04±0,08 ^{aE}	
Perfil de ácidos orgânicos (mg.ml⁻¹)								
FC		<0,01	0,18±0,02 ^{aA}	0,08±0,02 ^{aA}	0,15±0,00 ^{bA}	nd	nd	nd
F1	Acético	<0,01	0,15±0,01 ^{aE}	0,10±0,00 ^{aE}	0,37±0,03 ^{aD}	1,41±0,03 ^{aB}	2,46±0,05 ^{aA}	1,14±0,03 ^{bC}
F2		<0,01	0,20±0,01 ^{aE}	0,10±0,02 ^{aE}	0,42±0,01 ^{aD}	1,06±0,08 ^{bC}	1,36±0,12 ^{bB}	3,03±0,05 ^{aA}
FC	Cítrico	0,05±0,00 ^{aA}	0,04±0,00 ^{aA}	0,01±0,00 ^{cA}	0,02±0,00 ^{cA}	nd	nd	nd
F1		0,05±0,00 ^{aF}	0,01±0,00 ^{bF}	2,55±0,00 ^{aC}	2,13±0,02 ^{aE}	2,42±0,03 ^{aD}	4,83±0,04 ^{aA}	2,96±0,01 ^{aB}
F2		0,05±0,00 ^{aD}	0,04±0,00 ^{aD}	2,08±0,00 ^{bBC}	1,99±0,00 ^{bC}	2,17±0,06 ^{bB}	2,79±0,12 ^{bA}	2,89±0,01 ^{aA}
FC	Láctico	<0,01	0,51±0,00 ^{aA}	0,17±0,01 ^{bB}	0,22±0,00 ^{cB}	nd	nd	nd
F1		<0,01	0,44±0,01 ^{bD}	0,20±0,03 ^{abE}	0,79±0,00 ^{bC}	1,31±0,02 ^{aB}	1,57±0,05 ^{aA}	1,41±0,03 ^{aB}
F2		<0,01	0,41±0,01 ^{bD}	0,24±0,01 ^{aE}	1,10±0,03 ^{aC}	1,09±0,04 ^{bC}	1,52±0,11 ^{aA}	1,32±0,01 ^{aB}
FC	Succínico	0,07±0,00 ^{aA}	0,05±0,00 ^{aA}	0,02±0,00 ^{aA}	0,03±0,00 ^{cA}	nd	nd	nd
F1		0,07±0,00 ^{aE}	0,06±0,00 ^{aE}	0,03±0,01 ^{aE}	0,36±0,02 ^{aD}	0,67±0,05 ^{aC}	1,53±0,03 ^{aA}	0,81±0,01 ^{aB}
F2		0,07±0,00 ^{aE}	0,16±0,00 ^{bDE}	0,08±0,00 ^{bE}	0,24±0,01 ^{bCD}	0,32±0,08 ^{bBC}	0,45±0,07 ^{bB}	0,83±0,00 ^{aA}

FC: formulação controle, somente o xarope. F1: formulação com extrato do resíduo de abacaxi sem adição de extrato de guaraná. F2: formulação com extrato do resíduo de abacaxi com extrato de guaraná. *Bebida pronta. nd: não determinado. Os resultados expressam a média±desvio padrão. Médias na mesma coluna com letras minúsculas iguais não diferem entre as formulações ($p>0,05$) pelo teste de *Tukey*. Médias na mesma linha com letras maiúsculas iguais não diferem entre as etapas da fermentação e período de armazenamento si ($p>0,05$) pelo teste de *Tukey*.

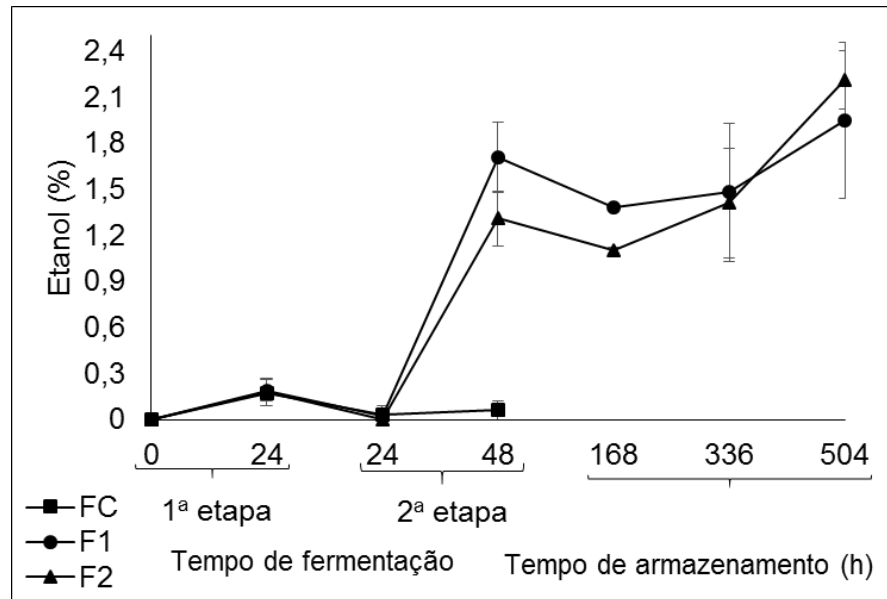
Em relação ao perfil de carboidratos, houve uma redução do total de carboidratos inicial até o final do processo de fermentação e tempo de armazenamento (Figura 3). Em contrapartida, pode-se inferir que houve uma correlação entre a diminuição dos carboidratos e aumento dos ácidos orgânicos e etanol.

Figure 3 - Perfil de carboidratos das bebidas durante o processo de fermentação e tempo de armazenamento. A) Sacarose, B) Glicose e C) Frutose.



Em relação ao teor de etanol, este variou entre 0,06 e 1,71 % (v.v⁻¹) para as bebidas prontas (Figura 4), sendo para FC a menor concentração, diferindo significativamente ($p < 0,05$) das formulações F1 e F2. Durante o tempo de armazenamento houve um aumento no teor de etanol.

Figure 4 - Perfil de etanol durante o processo de fermentação e tempo de armazenamento à 4 °C



As bebidas F1 e F2 são classificadas como alcoólicas, conforme a legislação brasileira (BRASIL, 2009), uma vez que o teor de etanol foi superior a 0,5 % (v/v), enquanto que FC é classificada como não alcóolica.

Alguns estudos mostram baixo teor de etanol para bebidas de kefir utilizando diferentes substratos (MAGALHÃES et al., 2011a, MAGALHÃES et al., 2011b). Entretanto, outros estudos que utilizaram sucos de diferentes vegetais obtiveram níveis maiores de etanol (CORONA et al., 2016; RANDAZZO et al., 2016) do que os obtidos nesse estudo. Isso mostra que, dependendo do substrato fermentescível utilizado e as condições da fermentação, os teores de etanol podem ser variáveis.

Os produtos finais da fermentação de levedura são etanol e CO₂. Algumas espécies dentro do grupo das BAL também têm a capacidade de produzir etanol, uma vez que possuem atividade de álcool desidrogenase, uma enzima capaz de converter acetaldeído em etanol (RANDAZZO et al., 2016).

O processo de fermentação em meio ácido favorece a produção de etanol, pois restringem o crescimento das leveduras (MIRANDA, PEREIRA, ARAÚJO, 2014), assim como em meio anaeróbio (ARAÚJO, 2012). Isso pode ser observado no presente estudo, em que, na segunda etapa de fermentação, após adicionar os ERA e ERAEG, em F1 e F2, respectivamente, e conduzir a

fermentação em anaerobiose, houve um aumento no teor de etanol, bem como durante o armazenamento.

3.3.1. Compostos fenólicos totais e avaliação da capacidade antioxidante

O teor de CFT das bebidas F1 e F2 foram significativamente ($p < 0,05$) maiores comparadas a FC. Isso refletiu na atividade antioxidante, conseqüentemente F1 e F2 obtiveram atividades mais elevadas que a FC, tanto para FRAP quanto para DPPH (Tabela 5). Provavelmente, isso ocorreu pela adição de extrato de resíduo de abacaxi, pois os mesmos possuem compostos fenólicos, bem como devido aos produtos oriundos do metabolismo fermentativo.

Tabela 5 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante das bebidas prontas e durante o tempo de armazenamento de F1 e F2

Formulação	CFT (mM EAG.ml ⁻¹)			
	Bebida pronta	7 dias	14 dias	21 dias
FC	1,37±0,09 ^b	nd	nd	nd
F1	2,17±0,18 ^{aA}	2,17±0,06 ^{aA}	2,03±0,03 ^{aA}	2,14±0,03 ^{aA}
F2	2,17±0,15 ^{aA}	2,28±0,04 ^{aA}	2,14±0,03 ^{aA}	2,14±0,03 ^{aA}
FRAP (µM sulf. ferroso.ml ⁻¹)				
FC	22,16±1,37 ^b	nd	nd	nd
F1	48,02±1,51 ^{aA}	45,92±0,23 ^{bA}	43,06±0,27 ^{bA}	47,22±4,65 ^{aA}
F2	54,56±0,79 ^{aA}	51,33±0,19 ^{aA}	50,51±0,90 ^{aA}	42,98±1,65 ^{aB}
DPPH (% inibição)				
FC	0,30±0,28 ^b	nd	nd	nd
F1	7,31±0,95 ^{aAB}	5,42±0,11 ^{bB}	8,41±0,73 ^{aA}	7,92±0,53 ^{bA}
F2	8,53±0,42 ^{aAB}	7,98±0,69 ^{aB}	10,18±1,78 ^{aAB}	10,48±0,59 ^{aA}

nd: não determinado. Os resultados expressam a média±desvio padrão. Médias na mesma coluna com letras minúsculas iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de *Tukey*. Médias na mesma linha com letras maiúsculas iguais não diferem entre si ($p > 0,05$) pelo teste de *Tukey*.

Nos tempos de armazenamento, as bebidas não diferiam em relação ao teor dos CFT, mas tiveram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação a atividade antioxidante. F2 com 21 dias de armazenamento, obteve-se a maior porcentagem de inibição do radical DPPH, mas não diferiu de F2 com 14 dias e nem F2 pronta. Enquanto que, para o radical FRAP, o maior atividade antioxidante foi evidenciada para F2 no 7º dia de armazenamento, que não diferiu ($p > 0,05$) F2 com 14 dias e nem da F2 pronta.

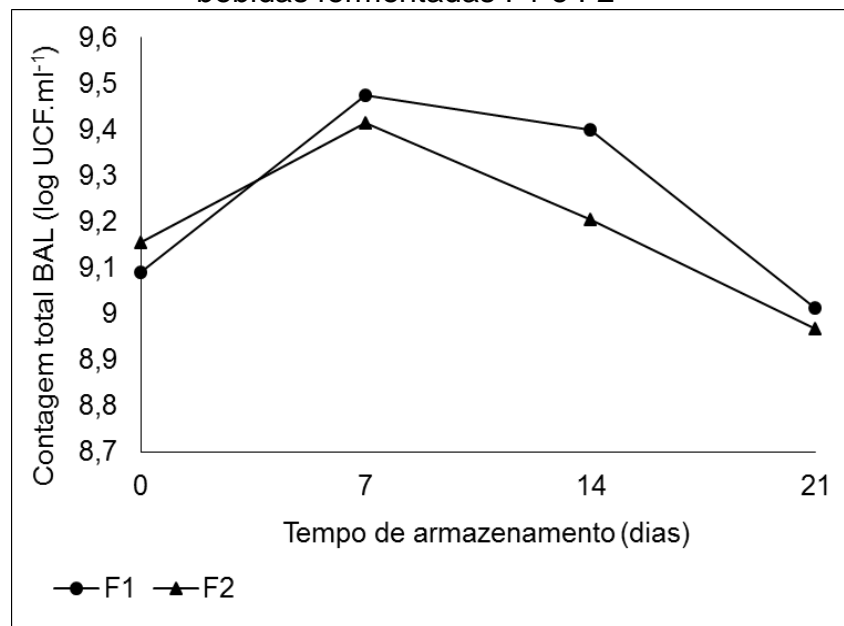
As propriedade antioxidantes podem melhorar o estado de saúde e reduzir os riscos de desenvolver doenças, através de ações positivas nas funções

biológicas do corpo humano. Além disso, podem preservar a vida útil das bebidas industrializadas e prevenir o desenvolvimento de *off-flavors* (FIORDA et al., 2016a).

3.3.2 Viabilidade das bactérias ácido lácticas- BAL

As bebidas fermentadas F1 e F2 prontas apresentaram contagens respectivamente, $1,23 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ e $1,43 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ de BAL. Os resultados da viabilidade das BAL durante o período de armazenamento (Figura 5) mostram que houve um aumento das mesmas, até o 7º dia de armazenamento, e mantiveram-se na ordem de 9 log UFC.ml⁻¹ até 21º dia, exceto F2, que teve sua concentração reduzida em 1 ciclo log UFC.ml⁻¹. Contudo, as contagens de BAL no 21º dia de armazenamento à 4°C mantiveram-se em 10^7 UFC.ml⁻¹ para F2 e em 10^8 UFC.ml⁻¹ para F1.

Figure 5 – Viabilidade das BAL durante o tempo de armazenamento à 4 °C das bebidas fermentadas F1 e F2



De acordo com FAO/WHO (2006), bebidas probióticas devem conter pelo menos 10^7 UFC.ml⁻¹ de contagem de BAL até o final do período de armazenamento, portanto, as bebidas fermentadas por kefir a partir dos extratos de resíduo de abacaxi enquadram-se dentro desta especificação.

Com esses resultados, pode-se inferir que as bebidas elaboradas neste estudo, possuem potencial para serem consideradas probióticas, salvo que as mesmas devem passar por outros testes descritos na Res. nº18 (BRASIL, 1999).

3.4. Análise sensorial

As bebidas submetidas a avaliação sensorial, estavam em condições microbiológicas satisfatórias, apresentando contagem $<1,0$ NMP.ml⁻¹ para coliformes totais e termotolerantes à 45 °C e ausência de *Salmonella* sp. em 25 ml das bebidas fermentadas por kefir.

As médias dos escores para todos os atributos sensoriais analisados não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre F1 e F2, indicando que as amostras foram igualmente aceitas, e variaram entre “gostei ligeiramente” (6,0) a “gostei muito” (8,0) (Tabela 6), apresentando assim, notas de aceitação acima da média.

Tabela 6 - Avaliação sensorial pelo teste de aceitação e índice de aceitação das bebidas elaboradas

	Atributos Sensoriais (Notas)				
	Aparência	Aroma	Sabor	Doçura	Corpo/textura
F1	6,50±1,56 ^a	7,02±1,37 ^a	7,65±1,27 ^a	7,54±1,34 ^a	7,75±1,20 ^a
F2	6,52±1,57 ^a	6,79±1,45 ^a	7,33±1,36 ^a	7,31±1,52 ^a	7,61±1,35 ^a
	Índice de aceitação (%)				
F1	72 ^a	78 ^a	85 ^a	84 ^a	86 ^a
F2	72 ^a	75 ^a	81 ^a	81 ^a	85 ^a

Os resultados expressam a média±desvio padrão das notas atribuídas para cada atributo. Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem entre si ($p>0,05$) pelo teste de Tukey.

As notas individuais de cada avaliador são extremamente variáveis, a preferência e o gostar ou não, de certos alimentos e bebidas são influenciadas por vários fatores (BAPTISTA, 2010).

De acordo com Dutcosky (2012) os produtos com índice de aceitação (IA), acima de 70 % são considerados aceitos, dessa maneira, observa-se que todos os atributos sensoriais dos tratamentos avaliados foram aceitos (Tabela 6).

A aparência foi o atributo que recebeu a menor nota, provavelmente devido a presença de pequenas partículas formadas durante a fermentação, visto que as bebidas não foram filtradas após a segunda fermentação, contudo, ainda obteve

índice de aceitação acima de 70 %. A filtração das bebidas após a segunda etapa de fermentação poderia ser um parâmetro a ser estudado, para buscar uma melhora na avaliação desse atributo, através de notas mais elevadas para a “aparência”.

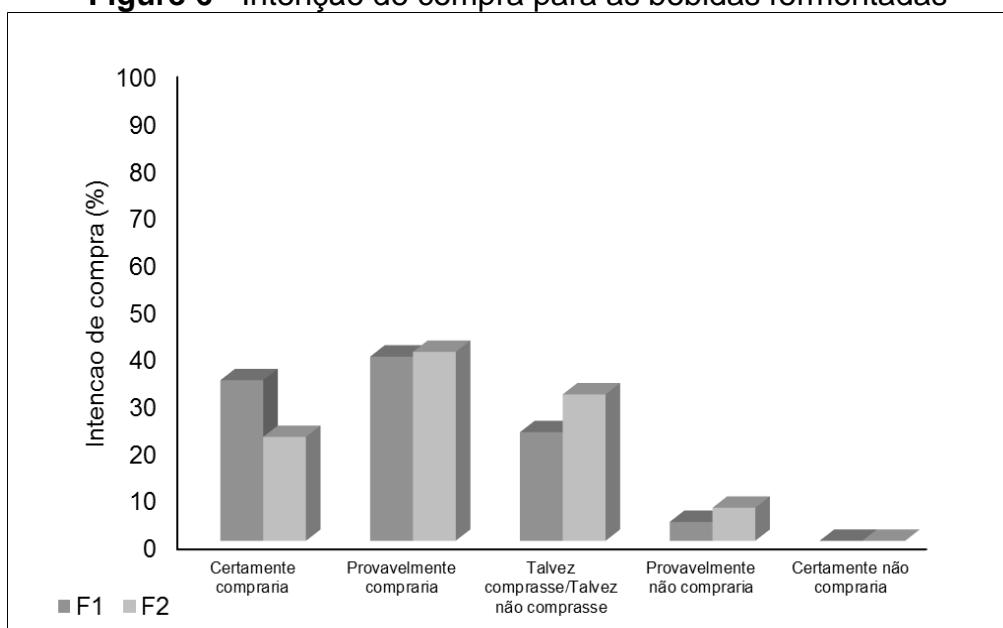
A adição do extrato de guaraná em F2, está relacionada aos benefícios do guaraná, como estimulante, combate à fadiga e depressão, dentre outros (MOUSTAKAS et al., 2015) e a análise sensorial mostrou que a bebida foi aceita, podendo ser uma opção para os consumidores.

Os açúcares e ácidos orgânicos são frequentemente utilizados como aditivos alimentares em bebidas, tais como refrigerantes e vinhos, pois contribuem para uma acidez suave e refrescante, aumentando a aceitação sensorial, além de contribuir para estabilidade microbológica (FIORDA et al, 2016b). Isso reflete significativamente nos resultados obtidos nesta pesquisa, visto que os ácidos orgânicos são metabólitos da fermentação do kefir, e provavelmente a presença dos mesmos foram fundamentais para aceitação das bebidas analisadas.

Os escores para os atributos sensoriais obtidos nesta pesquisa foram superiores aos já descritos em outros estudos, que desenvolveram bebidas fermentadas por grãos de kefir utilizando sucos de vegetais e frutas, como Marchi; Palezi; Pietta (2015), Corona et al. (2016), Randazzo et al. (2016).

A intenção de compra para as bebidas fermentadas elaboradas (Figura 6) evidencia que as bebidas têm potencial para estarem nas prateleiras dos supermercados, visto que o somatório dos escores “certamente compraria + provavelmente compraria” está acima de 70 e 60 % para F1 e F2, respectivamente. Além do mais, observa-se baixo percentual do escore “provavelmente não compraria” e ninguém assinalou o escore “certamente não compraria”.

Pase et al. (2017), ao pesquisarem refrigerantes e bebidas não carbonatadas com alto teor de açúcar, como sucos de frutas e bebidas de frutas, puderam concluir que o consumo de refrigerante artificialmente adoçado foi associado a um maior risco de Acidente Vascular Cerebral (AVC) e demência.

Figure 6 - Intenção de compra para as bebidas fermentadas

Frente a isso, a utilização de grãos de kefir para obter bebidas fermentadas a partir de extratos de resíduo de abacaxi, pode ser uma alternativa para substituição de refrigerantes, pois as mesmas foram aceitas, mesmo com teor reduzido de açúcar. Além de obter uma bebida refrescante, naturalmente gaseificada, com potencial probiótico, presença de ácidos orgânicos, compostos fenólicos, entre outras substâncias e nutrientes, apresentando vantagens frente aos refrigerantes.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que as bebidas desenvolvidas no presente trabalho podem ser uma alternativa para a utilização de resíduo de abacaxi, adicionadas ou não de extrato de guaraná.

Além de uma opção de bebida não láctica com potencial probiótico, visto que obtiveram aceitação sensorial, além de características físico-químicas e microbiológicas desejáveis durante 21 dias de armazenamento, baixo teor de açúcar, contagem de bactérias do ácido láctico mínima de 10^7 UFC.ml⁻¹ e estabilidade nos teores de SST até 21 dias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, L. M. **Fermentados alcoólico e acético de polpa e casca de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill): cinética das fermentações e caracterização dos produtos**. 2014, 142 p. Tese (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC international**. 19 ed. Gaithersburg: AOAC International; 2012.

APHA – AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, DC., 676 p. 2001.

ARAÚJO, L. T. **Estudo da produção e do envelhecimento do vinagre de laranja lima**. 2012, 123 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, ALAGOAS, 2012.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification and characterization of endo b-1,4-D-glucanase from *Trichoderma harzianum* strain HZN11 and its application in production of bioethanol from sweet sorghum bagasse. **Biotech**, v.6, n.101, 2016.

BAPTISTA, E. V. **Desenvolvimento de ingrediente simbiótico por fermentação de soro de leite e do subproduto da agroindústria de suco de laranja por grãos de Kefir e cultura probiótica**. 2010, 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2010.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.57, n.6, 2013.

BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico para Misturas para o Preparo de Alimentos e Alimentos Prontos para o Consumo**. Resolução - RDC nº 273, de 22 de setembro de 2005a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. 1018 p. Brasília, DF, 2005b.

BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas**. Decreto N° 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, 2009.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.** Resolução nº18 de 30 de abril de 1999.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C.L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; HUNTLEY, J.; FIERER, N.; OWENS, S. M.; BETLEY, J.; FRASER, L.; BAUER, M.; GORMLEY, N.; GILBERT, J. A.; SMITH, G.; KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **International Society for Microbial Ecology**, v.6, p.1621–1624, 2012.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; JUNIOR, W. A. V.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.328, p.183-190, 2007.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **Food Science and Technology**, v.66, p.572–581, 2016.

DUTCOSKY, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos.** 3 ed. Curitiba: Champagnat. 2012.

FAO/WHO. Probiotic in foods. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Vol. 85. FAO Food and Nutrition Paper, Rome, Italy, 2006.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, G. V. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p.86-95, 2017.

FIORDA, F. A.; MELO, V. G. , THOMAZ-SOCCOL, V., MEDEIROS, A.P., RAKSHIT, S.K., SOCCOL, C.R., Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey, **LWT - Food Science and Technology**, v.68, p. 690-697, 2016a.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, V. G. M, THOMAZ-SOCCOL, V., RAKSHIT, S.K., SOCCOL, C. R. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, 2016b.

FOLIGNÉ, B.; DEWULF, J.; BRETON, J.; CLAISSE, O.; LONVAUD-FUNEL, A.; POT. B. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: Immunomodulation by *Oenococcus oeni*. **International Journal of Food Microbiology**, v.140, p.136–145, 2010.

GIL, L. S. MAUPOEY, P. F. An Integrated Approach for Pineapple Waste Valorisation. Bioethanol Production and Bromelain Extraction from Pineapple Residues. **Journal of Cleaner Production**, v.172, n.20, p.1224-1231, 2018.

GULITZ, A.; STADIE, J.; WENNING, M.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v.151, n.3, p.284-288, 2011.

HSIEH, H. H.; WANG, S. Y.; CHEN, T. L.; HUANG, Y. L.; CHEN, M. J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p.73–81, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4ª Edição, 1ª Edição Digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria.

LAUREYS, D.; JEAN A. V.; DUMONT, J.; VUYST, L. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.101, p.2811–2819, 2017.

LAUREYS, D.; VUYST, L. D. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Journal Applied and Environmental Microbiology**, v.80, n.8, p.2564–2572, 2014.

LEMOES, D. M.; OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C.; SOUSA, E. P.; MATIAS, M. L. Composição físico-química de resíduos de abacaxi in natura e desidratado. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.4, n.2, p.53-56, 2010.

LEITE, A. M. O.; MAYO, B.; RACHID, C. T. C. C.; PEIXOTO, R. S.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v.31, p.215-221, 2012.

LIMA, P. C. C.; SOUZA, B. S.; SANTINI, A. T.; OLIVEIRA, D. C. Aproveitamento agroindustrial de resíduos provenientes do abacaxi 'pérola' minimamente processado. **HOLOS**, ano.33, v.02, p.122-136, 2017.

MAGALHÃES, K.T.; DIAS, D.R.; PEREIRA, G.V. M.; OLIVEIRA, J.M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; SCHWAN, R.F. Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. **International Journal of Food Science and Technology**, v.46, n.4, p.871-878, 2011a.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. D.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal Microbiology**, v.42, n.2, p.693–702, 2011b.

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

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R.P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS Microbiology**, v.348, n.1, p.79-85, 2013.

MARTINS, C. A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* do guaraná (*Paullinia cupana*) em pó**. 2010, 130 p. Dissertação (Mestrado em Nutrição em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MIGUEL, M. G. D. P.; CARDOSO, P. G.; MAGALHAES, K. T.; SCHWAN, R. F. Profile of microbial communities present in Tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian states. **World Journal Microbiology Biotechnol**, v.27, p.1875–1884, 2011.

MIRANDA, R. F.; PEREIRA, C. S. S.; ARAÚJO, I. O. Análise da fermentação alcoólica do kefir em biorreator. **Revista Teccen**, v.7,n.1/2, p.21-26, 2014.

MONAR, M.; DÁVALOS, I.; ZAPATA, S.; CAVIEDES, M.; CÁRDENAS, L. R. Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. **Avances en Ciencias e Ingenierías**, v. 6, n.1, p. B60-B66, 2014.

MOUSTAKAS, D.; MEZZIO, M.; RODRIGUEZ, B. R.; CONSTABLE, M.A.; MULLIGAN, M. E.; VOURA, E. B. Guarana provides additional stimulation over caffeine alone in the planarian model. **Plos One**, v.10, n.4, p.1-17, 2015.

NIKOLAOU, A.; GALANIS, A.; KANELLAKI, M.; TASSOU, C.; AKRIDA-DEMERTZI, K.; KOURKOUTAS, Y. Assessment of free and immobilized kefir culture in simultaneous alcoholic and malolactic cider fermentations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 67-78, 2017.

OLIVEIRA, A. S. B. **Estudo da secagem de casca de abacaxi visando desenvolvimento de chá a partir do produto seco**. 2014, 100 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro, 2014.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.2, n.2, p.54-59, 2003.

PASE, M. P.; HIMALI, J. J.; BEISER, A. S.; APARICIO, H. J.; SATIZABAL, C. L.; VASAN, R. S.; SESHADRI, S.; JACQUES, P. F. Sugar- and artificially sweetened Beverages and the risks of incident stroke and Dementia: a prospective cohort study. **Stroke**, 2017.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v.34, n.4, p.689–694, 2011.

PLAZA, M.; BATISTA, G. A.; CAZARIN, C. B. B.; SANDAHL, M.; TURNER, C.; ÖSTMAN, E.; = MARÓSTICA-JÚNIOR, M. R. Characterization of antioxidant polyphenols from *Myrciaria jaboticaba* peel and their effects on glucose metabolism and antioxidant status: A pilot clinical study. **Food Chemistry**, v. 211, p. 185-197, 2016.

RANDAZZO, W.; CORONA, O.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; GERMAN, M. A.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v.54, p.40-51, 2016.

REUTER, W. M. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection. **Perkin Elmer**, 2015.

REZENDE, Y. R. R. S.; NOGUEIRA, J. P.; NARAIN, N. Comparison and optimization of conventional and ultrasound assisted extraction for bioactive compounds and antioxidant activity from agro-industrial acerola (*Malpighia emarginata* DC) residue. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 158-169, 2017.

ROCHELLE, S. L. A.; SARDI, J. C. O.; FREIRES, I. A.; GALVÃO, L. C. C.; LAZARINI, J. G.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. The anti-biofilm potential of commonly discarded agro-industrial residues against opportunistic pathogens. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 150–160, 2016.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA Comunicado Técnico**, v.127, p.1-4, 2007.

SARZI, B.; DURIGAN, J. F.; ROSSI JUNIOR, O. D. Temperatura e tipo de preparo na conservação de produto minimamente processado de abacaxi “Pérola”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.376-380, 2002.

SELANI, M. M. **Caracterização e aplicação de subprodutos de frutas no desenvolvimento de hambúrguer bovino e extrusado de milho**. 2015, 125 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2015.

SCHMIDT, P. A.; BÁLINT, M.; GRESHAKE, B.; BANDOWA, C.; RÖMBKE, J.; SCHMITT, I. Illumina metabarcoding of a soil fungal community. **Soil Biology & Biochemistry**, p.15, 2013.

SHUHADHA, M. F. F.; PANAGODA, G. J.; MADHUJITH, T.; JAYAWARDANA, N. W. I. A. Evaluation of probiotic attributes of *Lactobacillus* sp. isolated from cow and buffalo curd samples collected from Kandy. **Ceylon Medical Journal**, 2017.

SOUSA, B. A. A. **Funcionalidade dos extratos fenólicos obtidos pelo cultivo semi-sólido de resíduos de abacaxi (*Ananas comosus* L.) e goiaba (*Psidium guajava* L.)**. 2009, 120 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SWAIN, T.; HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Punna domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.19, p. 63-68, 1959.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas: NEPA-UNICAMP, 4ª edição ampliada e revisada, 2011.

VEGA-CASTRO, O.; CONTRERAS-CALDERON, J.; LEÓN, E.; SEGURA, A.; ARIAS, M.; PÉREZ, L.; SOBRAL, P. J. A. Characterization of a polyhydroxyalkanoate obtained from pineapplepeel waste using *Ralstonia eutropha*. **Journal of Biotechnology**, v.231, p.232–238, 2016.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEIBNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v.27, p.672-678, 2010.

WANG, Y.; QIAN, P. Y. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. **PLoS ONE**, v.4, n.10, 2009.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. **PCR Protocols**, p. 315–322, 1999.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Conclui-se que é possível desenvolver bebidas fermentadas por kefir, a partir do extrato de resíduo de abacaxi, sem (F1) e com (F2) extrato de guaraná. Essas são estáveis em relação aos parâmetros físico-químicos durante 7 e 14 dias, e microbiológicos até 21 dias de armazenamento. As bebidas F1 e F2, refrigeradas à 4°C, por 4h, logo após o término da segunda etapa de fermentação são aprovadas e aceitas pelos consumidores.

Identificou-se os microrganismos presentes na cultura mista dos grãos de kefir, e com os resultados pode-se inferir que as bebidas obtidas tem caráter probiótico.

APÊNDICES

Apêndice A

Ficha de Avaliação Sensorial

Nome: _____ Data: _____

1. Você está recebendo uma amostra codificada, de **bebida fermentada por kefir a partir de resíduo de abacaxi**. Por favor, avalie a amostra, **atribuindo uma nota** conforme a escala abaixo, indicando o quanto você **gostou ou desgostou** dos atributos: aparência, aroma, sabor, doçura e corpo/textura.

Escala:

9 - gostei extremamente

8 - gostei muito

7 - gostei moderadamente

6 - gostei ligeiramente

5 - nem gostei/nem desgostei

4 - desgostei ligeiramente

3 - desgostei moderadamente

2 - desgostei muito

1 - desgostei extremamente

ATRIBUTOS

Nota conforme escala

Aparência

Aroma

Sabor

Doçura

Corpo/textura

2. Já na escala abaixo, **assinale** sua opinião em relação à **intenção de compra desta bebida**.

() 5 - Certamente eu compraria

() 4 - Provavelmente eu compraria

() 3 - Talvez eu compraria / Talvez eu não compraria

() 2 - Provavelmente eu não compraria

() 1 - Certamente eu não compraria

COMENTÁRIOS: _____

Apêndice B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Projeto: Resíduo de abacaxi para o desenvolvimento de bebidas fermentadas por kefir

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa “Resíduo de abacaxi para o desenvolvimento de bebidas fermentadas por kefir”. O objetivo da pesquisa é desenvolver uma bebida fermentada por grãos de kefir de água a partir de resíduo de abacaxi e adição de extrato de guaraná. A bebida kefir é um produto fermentado consumido rotineiramente em diversos países e produzido com água, açúcar e cultura microbiana fermentadora (os chamados grãos de kefir).

Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: o (a) senhor (a) faria parte da equipe de julgadores da avaliação da aceitação sensorial da bebida de kefir, que irá avaliar o quanto gostou ou desgostou da amostra da bebida apresentada durante a sessão de avaliação previamente agendada.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação.

Os benefícios esperados são formular uma bebida, que traga benefícios à saúde de seus potenciais consumidores. Além disso, a pesquisa faz parte de uma dissertação de mestrado e o seu desenvolvimento contribuirá com a formação de recursos humanos qualificados.

Os riscos associados à ingestão de bebida Kefir são mínimos, pois se trata de bebida preparada de forma segura e com ingredientes seguros e de uso comum na alimentação humana. Os microrganismos presentes na cultura de Kefir são considerados probióticos por contribuírem com o bem estar e conferir benefícios à saúde do homem/consumidor. A bebida pode apresentar um leve teor alcoólico (inferior a 2%). A ingestão da bebida poderá causar um leve efeito laxante por se tratar de um produto probiótico. No entanto, a quantidade ingerida durante o teste sensorial é menor do que a dose para resultar em tal efeito. Caso ocorra qualquer tipo de desconforto, o julgador será prontamente atendido e amparado pelo pesquisador responsável. Para participar, você deve ser maior de dezoito anos e ser saudável.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (Prof^a Dra. Wilma Spinosa, DCTA/Uel, wilma.spinosa@uel.br, (43) 3371-4585 ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres

Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br.

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, ____ de _____ de 2017.

Pesquisador Responsável

RG: 001.741.393 SSP/MS

e-mail: eng.jessica.lima@gmail.com

Telefone:(43) 99138-2416

(**NOME POR EXTENSO DO SUJEITO DE PESQUISA**), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: __/__/__

*Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado, atendendo, conforme normas da Resolução 466/2012 de 12 de dezembro de 2012.

Apêndice C



Endereço: Rua Rodolfo Hufenussler, 755
 Caixa Postal: 415 - 89251-901 Jaraguá do Sul (SC) Brasil
 Tel.: (+55 47) 3373-9021
 Homepage: www.duasrodas.com
 E-mail: comercial@duasrodas.com

ESPECIFICAÇÃO TÉCNICA DO MATERIAL

513708670043 - EXTRATO DE GUARANÁ EM PÓ (SPRAY DRYER)

DESCRIÇÃO

PRODUTO OBTIDO A PARTIR DA EXTRAÇÃO HIDROALCÓOLICA DAS SEMENTES DA PLANTA *Paullinia cupana* (Sapindaceae), COM POSTERIOR SECAGEM POR PROCESSO DE ATOMIZAÇÃO (SPRAY DRYER). DEVIDO AS SUAS PROPRIEDADES ENERGÉTICAS, É IDEAL PARA USO EM VÁRIAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA.

APLICAÇÃO E DOSAGEM ORIENTATIVA

PREP LIQ AROMATIZADO: 200 g/100L
 SUPLEMENTO HIDROELETROLÍTICO ATLETAS: 100 g/100L
 PÓ PARA REFRESCO: 100 g/100kg

INGREDIENTES

GUARANÁ SEMENTE, MALTODEXTRINA, CAFEÍNA NATURAL, CONTÉM SULFITO (MÁXIMO): 24ppm
 NÃO CONTEM GLUTEN

SEMENTES

60,00 g/100g

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 100,00 g

VALOR ENERGÉTICO:	375,000 kcal
CARBOIDRATOS:	85,000 g
PROTEÍNAS:	7,000 g
GORDURAS TOTAIS:	0,500 g
GORDURAS SATURADAS:	0,000 g
GORDURAS TRANS:	0,000 g
FIBRA ALIMENTAR:	0,000 g
SÓDIO:	63,800 mg

CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS

Aparência : Pó Fino Bege
 Análise Sensorial : Conforme

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Cafeína : 1,50 g/100g min.
 Umidade Karl Fischer : 5,00 g/100g máx.
 Peso Específico : 0,40 g/mL - 0,80 g/mL
 pH : 4,50 - 5,50

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Contagem Total de Bactérias : 10000 UFC/g máx.
 Escherichia Coli : Ausência
 Fungos e Leveduras : 100 UFC/g máx.
 Salmonela : Ausência

VALIDADE

12 MESES

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO, DISTRIBUIÇÃO E MANIPULAÇÃO

MANTER EM LOCAL SECO E VENTILADO. EVITAR EXPOSIÇÃO À LUZ SOLAR. MANTER NA EMBALAGEM ORIGINAL, SEMPRE BEM FECHADA. PRODUTO HIGROSCÓPICO.

EMBALAGEM

BARRICA DE FIBRA COM EMBALAGEM PLÁSTICA OU SACO MULTIFOLHADO COM EMBALAGEM PLÁSTICA