

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

BEATRIZ AZEVEDO LOPES

**KEFIR DE ÁGUA SABORIZADO COM JAMELÃO (*Syzygium cumini*):
INOVAÇÃO E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA PARA O CONSUMO HUMANO**

JOÃO PESSOA – PB

2019

BEATRIZ AZEVEDO LOPES

**KEFIR DE ÁGUA SABORIZADO COM JAMELÃO (*Syzygium cumini*):
INOVAÇÃO E SEGURANÇA MICROBIOLÓGICA PARA O CONSUMO HUMANO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Flávia de Oliveira Paulino.

JOÃO PESSOA – PB

2019

**Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

L864k Lopes, Beatriz Azevedo.
Kefir de água saborizado com Jamelão (*Syzygium cumini*):
Inovação e segurança microbiológica para o consumo
humano / Beatriz Azevedo Lopes. - João Pessoa, 2019.
39 f. : il.

Monografia (Graduação) - UFPE/CBiotec.

1. Bebida fermentada. 2. Probióticos. 3. Bebida
funcional. 4. Biotecnologia. 5. Nordeste brasileiro. I.
Título

UFPE/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia

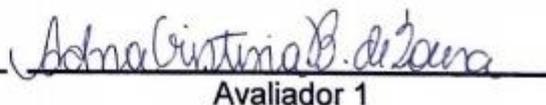


ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

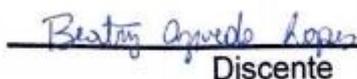
Aos vinte e três dias do mês de abril de 2019, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra. Flávia de Oliveira Paulino e composta pelos avaliadores: 1. Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Prof. Dr. Wagner de Mendonça Faustino (DQ/CCEN/UFPB), a discente Beatriz Azevedo Lopes, matrícula 11503356, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **“Kefir de água saborizado com jamelão (*Syzygium cumini*): inovação e segurança microbiológica para o consumo humano”**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Flávia de Oliveira Paulino, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.



Presidente da Banca Examinadora



Avaliador 1



Discente



Avaliador 2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos professores da banca avaliadora Adna Cristina e Wagner Faustino, por terem aceitado este convite e por terem dedicado seu tempo à leitura do trabalho e presença no dia da apresentação.

Meus sinceros agradecimentos a todo corpo docente do CBiotec que esteve presente durante os meus anos como graduanda, que de alguma forma ou outra foram de enorme importância para minha formação como biotecnologista e para me tornar uma pessoa mais humana.

Sou muito feliz e grata pelas amizades que fiz e cultivei durante todo o curso e que irei levar para a vida. Assim como as amizades que tenho há anos e que se fortaleceram ao longo do caminho, com todo amor e suporte, até mesmo nos momentos mais difíceis.

Sou eternamente grata à toda minha família, que me deu todo o suporte emocional e financeiro necessário para chegar onde estou agora, em especial ao meu pai Wilson Pereira Lopes e à minha mãe Terezinha Vieira de Azevedo, mesmo após tantos obstáculos na vida se mantiveram fortes e muito presentes para que eu e meu irmão fôssemos sempre bem educados e apoiados em vários âmbitos de nossas vidas, palavras não cabem aqui para expressar o quanto eu sou imensamente grata a vocês. Agradeço especialmente as demais mulheres da minha família as quais desde sempre me deram muito amor e ensinamentos, que me incentivam até hoje a ser uma mulher mais forte e independente.

Agradeço ao meu companheiro e melhor amigo Brenno Fernandes, por todo carinho e paciência nessa fase, cujo apoio foi essencial. E também, com muito carinho à toda sua família que me acolheram tão bem, fora da minha terra natal e me fizeram sentir em casa.

Um agradecimento especial à professora e orientadora Flávia, por ter me aceitado como orientanda, por toda a dedicação ao cumprir esse papel de maneira tão atenciosa, se mostrando sempre disponível para quaisquer questionamentos e por estar sempre aberta para conversar. Grata por todo o conhecimento que foi capaz de transmitir ao longo de toda essa etapa, mas ainda se sobressai o respeito e admiração que cultivei, saiba que para mim você é um exemplo de mulher, mãe e profissional, cujos princípios éticos, valores e afetos são raros de encontrar. Obrigada!

Sou imensamente grata por ter o privilégio de ser cercada de pessoas incríveis, das quais muitas ainda me motivam para ser quem eu me tornei hoje, e outras que sempre serão inspiração em diversas áreas da minha vida. Muito aprendi e desejo carregar todo esse conhecimento, carinho e amizade, daqui pra frente.

“[...] a primeira condição para mudar a realidade é conhecê-la.”

– Eduardo Galeano

RESUMO

O kefir de água é uma bebida tradicional fermentada ácida. É produzida a partir da fermentação dos grãos de kefir contendo microbiota adaptada para fermentar em uma solução de sacarose, produzindo principalmente ácido acético, ácido láctico, dióxido de carbono e álcool. O objetivo do presente estudo foi desenvolver uma bebida fermentada à base de kefir de água, saborizada naturalmente com jamelão (*Syzygium cumini*), bem como caracterizar as formulações desenvolvidas através de análise microbiológica e análise de teor alcoólico. Foram desenvolvidos dois grupos experimentais. O primeiro grupo experimental foi denominado tratamento controle (TC) e foi composto de um kefir de água tradicional; o segundo grupo experimental foi denominado tratamento teste (T1) e foi composto por um kefir de água saborizado com jamelão. Os grãos foram obtidos através de doação de produtores artesanais e procedeu-se com o cultivo em escala laboratorial na Universidade Federal da Paraíba. Foram realizadas análises de contagens microbiológicas para bactérias heterotróficas mesófilas, coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras. E também, análises para a determinação do teor alcoólico das bebidas. Para cada ensaio realizado, tanto de microbiologia como de teor alcoólico, foram recolhidas três amostras de cada tratamento e as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados mostraram uma qualidade microbiológica superior no grupo experimental de kefir de água de jamelão. O kefir de água apresentou média de bactérias mesófilas superior ($8,9 \times 10^4$ UFC/g), quando comparado ao kefir saborizado com jamelão ($1,2 \times 10^3$ UFC/g). As contagens de coliformes foram consideradas satisfatórias e seguras para consumo, especialmente a contagem de coliformes termotolerantes no grupo experimental T1, atingindo média de <10 NMP/g. Não foi detectada presença de *Salmonella* sp. nos dois tratamentos. O teor alcoólico foi detectado apenas no grupo experimental do kefir saborizado, atingindo média de 0,6 °GL após 24 horas na segunda fermentação. Concluiu-se que o grupo experimental do kefir saborizado com jamelão obteve os melhores padrões microbiológicos e que a segunda fermentação exerceu papel fundamental com potencial na obtenção de uma bebida segura para o consumo humano de acordo com os padrões exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Palavras-chave: Bebida Fermentada. Probióticos. Bebida Funcional. Biotecnologia. Nordeste brasileiro.

ABSTRACT

Sugary kefir or water kefir, is a traditional, fermented sour drink. It is produced from the fermentation of kefir grains containing microbiota adapted to ferment in a sucrose solution, mainly producing acetic acid, lactic acid, carbon dioxide and alcohol. The objective of the present study was to develop a fermented sugary kefir based drink, naturally flavored with jamelão (*Syzygium cumini*), as well as to characterize formulations developed through microbiological analysis and analysis of alcohol content. Two experimental groups were developed. The first experimental group was called control treatment (TC) and was composed of a traditional sugary kefir; the second experimental group was called test treatment (T1) and it was composed of a sugary kefir flavored with jamelão, typical fruit found in the Brazilian northeast. The grains were obtained through the donation of artisanal producers and proceeded with the cultivation on a laboratory scale at the Federal University of Paraíba. The first part of the quality analyzes occurred microbiological counts for mesophilic heterotrophic bacteria, total coliforms, thermotolerant coliforms, *Salmonella* sp. and molds and yeasts. The second stage of the analysis consisted of determining the alcohol content of the beverages. For each assay performed, both microbiology and alcohol, three samples of each treatment were collected and the analyzes were performed in triplicate. The results showed superior microbiological quality in the experimental sugary kefir flavored with jamelão group. Sugary kefir showed a higher mesophilic bacteria mean (8.9×10^4 CFU/g) when compared to sugary kefir flavored with jamelão (1.2×10^3 CFU/g). The coliform counts were considered satisfactory and safe for consumption, especially the count of thermotolerant coliforms in the T1 experimental group, reaching a mean of <10 MPN/g. No presence of *Salmonella* sp. in both experimental groups. The alcohol content was detected only in the sugary kefir flavored group, reaching a mean of 0.6 °GL after 24 hours in the second fermentation. It was concluded that the experimental group of kefir flavored with jamelão obtained the best microbiological standards and that the second fermentation played a fundamental role with potential to obtain a drink safe for human consumption according to the standards required by the Ministry of Agriculture, (MAPA).

Keywords: Fermented Beverage. Probiotics. Functional Beverage. Biotechnology. Brazilian Northeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grãos de kefir de água.....	20
Figura 2 – Jamelão íntegro, com casca, polpa e semente, após colheita e higienização.	22
Figura 3 – Polpa e casca de jamelão obtidas após despulpamento manual.	22
Figura 4 – Fluxograma de produção laboratorial do kefir de água saborizado com jamelão...	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média dos resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas nos dois tratamentos de kefir de água.	28
Tabela 2 – Resultados médios obtidos nas análises de teor alcoólico realizadas nos dois tratamentos de kefir de água.	31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1	KEFIR.....	14
2.1.1	Origem.....	14
2.1.2	Características Biológicas do Kefir: Composição Microbiológica e Morfologia.....	14
2.1.3	Dados de Produção e Consumo.....	15
2.1.4	Benefícios para Saúde.....	16
2.2	KEFIR DE ÁGUA.....	16
2.3	JAMELÃO.....	18
2.3.1	Classificação.....	18
2.3.2	Composição Nutricional.....	18
2.3.3	Bioativos Naturais.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1	OBTENÇÃO DA CULTURA DE KEFIR.....	20
3.2	REATIVAÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR.....	20
3.3	DESCRIÇÃO DOS INGREDIENTES.....	21
3.4	PREPARO DA FRUTA.....	21
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS TRATAMENTOS DESENVOLVIDOS.....	23
3.6	PROCESSAMENTO DO KEFIR DE ÁGUA.....	23
3.7	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	24
3.7.1	Análise de Bactérias Heterotróficas Mesófilas.....	25
3.7.2	Análise de Coliformes Totais e Termotolerantes.....	25
3.7.3	Análise de <i>Salmonella</i> sp.....	25
3.7.4	Análise de Bolores e Leveduras.....	26
3.8	ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO.....	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1	OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR.....	27
4.2	PROCESSAMENTO DO KEFIR.....	27
4.3	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	28
4.4	ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO.....	31
5	CONCLUSÃO.....	33

6	RECOMENDAÇÕES.....	34
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos há crescente recomendação da procura de alimentos que tragam benefícios à saúde do consumidor, onde há uma tendência na busca por produtos cada vez menos processados e, conseqüentemente, mais naturais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Há também a necessidade de atender uma parcela do público, tanto brasileiro quanto internacional, que tem optado por um estilo de vida onde não há consumo de alimentos ou produtos de origem animal, como reivindicam os veganos e vegetarianos (SEBRAE NACIONAL, 2019).

Atualmente, as bebidas fermentadas estão em ascensão no mundo, com expectativa de crescimento cerca de 8,4% até 2023. A procura por alimentos funcionais e por fontes mais saudáveis tem aberto oportunidades para inovação na área de bebidas fermentadas e potencialmente funcionais como a kombucha e o kefir. Essas bebidas já possuem uma demanda considerável em outros países, principalmente da região Ásia-Pacífico (AFREBRAS, 2018).

Enquanto no Brasil, o setor de bebidas fermentadas é voltado mais para bebidas alcoólicas, como a cerveja e cachaça (BNDES, 2017). Embora as bebidas funcionais no país ainda sejam pouco difundidas, acredita-se que a demanda por alimentos mais saudáveis, possa vir a impulsionar o mercado nesse setor (FECOMERCIO, 2015). O kefir, por exemplo, é uma bebida que possui vários benefícios relatados, e mesmo não sendo um produto recente e já amplamente comercializados diversos países, ainda não é um produto encontrado com facilidade nas prateleiras do mercado varejista brasileiro (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008). Sendo sua produção pouco difundida e majoritariamente artesanal a nível nacional.

É um desafio para o Brasil, no mercado varejista, responder à demanda de públicos diferenciados conforme suas exigências e necessidades, por faixa etária: idosos e infantis; por questões fisiológicas: intolerantes e alérgicos; ou por estilo de vida. Neste último grupo se enquadram os vegetarianos e os veganos (DCI, 2015). Estes segmentos seguem uma tendência mundial de mercado. A partir disso, a biotecnologia de alimentos vem se aperfeiçoando para oferecer soluções que possam suprir essas demandas, elaborando produtos que possuam maior qualidade desde sua origem, processamento, prateleira até a mesa do consumidor.

O kefir de água é um produto passível de atender a públicos especiais como é o caso de vegetarianos e veganos que optam por não consumir alimentos de origem animal. O kefir de água também atenderia um público especial como pessoas alérgicas à caseína ou intolerantes à lactose, quando comparado à versão mais tradicional da bebida, que é o kefir de leite. Há também a possibilidade de o kefir de água atender algumas das necessidades de públicos

infantis e idosos, que são grupos que carecem de alimentos menos processados e com mais propriedades que auxiliam no desenvolvimento e metabolismo saudável.

Dessa forma, a bebida proposta neste trabalho visa ampliar as possibilidades de inovação no segmento de bebida fermentada e potencialmente funcional, bem como destiná-la a um público diverso, incluindo consumidores vegetarianos e veganos e outros públicos especiais, como o segmento infantil, de idosos e os alérgicos e/ou intolerantes.

Ademais, ao optar-se por utilizar nesta bebida uma fruta tão familiarizada no nordeste brasileiro e geralmente pouco explorada comercialmente, como o jamelão, abre-se caminhos para valorização de pequenas cadeias de comercialização e exploração, já que é uma fruta geralmente obtida através do extrativismo. Além disso, o jamelão nesta pesquisa atua como uma nova opção de saborização natural em bebidas fermentadas, ainda não descrita na literatura consultada.

A hipótese deste trabalho é que a fruta escolhida, utilizada como agente saborizante natural, não exerça efeito negativo na tecnologia tradicional do kefir de água, tampouco nas características microbiológicas do produto.

O objetivo geral do presente trabalho é desenvolver uma bebida fermentada à base de kefir de água, saborizada naturalmente com jamelão (*Syzygium cumini*).

Os objetivos específicos, são:

- a) Realizar a contagem de micro-organismos indicadores de qualidade higiênico-sanitária em ambos tratamentos de kefir de água desenvolvidos, tratamento controle não saborizado e tratamento teste saborizado com jamelão;
- b) Determinar o teor alcoólico nos dois tratamentos desenvolvidos;
- c) Confrontar os resultados com a legislação vigente.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 KEFIR

2.1.1 Origem

É uma bebida tradicional consumida principalmente na região da Europa oriental e Ásia central. Acredita-se que teve origem nas montanhas do Cáucaso há séculos atrás. O consumo tradicional do kefir já era empiricamente atribuído a qualidade de vida e longevidade, visto que o termo deriva de “keyif” que significa "bem-estar" em turco (OTLE; CAGINDI, 2003). No início do século passado, o cientista russo Metchnikoff (1907) já sugeria que esses benefícios estavam correlacionados à presença de bactérias ácido-láticas em bebidas fermentadas. Entretanto, ainda não se sabe ao certo se todos os kefir consumidos atualmente são provenientes de uma mesma cultura-mãe, pois a depender do método de manufatura e dos substratos adicionados, a composição da população de micro-organismos presentes nos grãos podem diferir uma das outras (WITTHUHN et al., 2005).

2.1.2 Características Biológicas do Kefir: Composição Microbiológica e Morfologia

O kefir é uma bebida láctea fermentada, alcoólico-ácida com consistência cremosa e sabor refrescante levemente ácido, onde o álcool é praticamente imperceptível. Esta bebida pode ser produzida a partir da fermentação da lactose do leite, utilizando os tradicionais grãos de kefir (PRADO et al., 2015).

De acordo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados descrito pelo Ministério da Agricultura (MAPA), o kefir está incluso na definição de bebida láctea fermentada, cuja fermentação é realizada através do cultivo dos grãos de kefir, com produção final de ácido lático, ácido acético, álcool e dióxido de carbono (BRASIL, 2007).

Segundo a definição internacional do *Codex Alimentarius*, para padronização de leites fermentados, o kefir é uma bebida láctea fermentada caracterizada pela fermentação de uma cultura iniciadora estável composta por bactérias *Lactobacillus kefiri* e demais espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, além de leveduras como as da espécie *Kluyveromyces marxianus* e espécies do gênero *Saccharomyce* (FAO/OMS, 2011).

Esta cultura iniciadora dos grãos do kefir é composta por uma complexa associação simbiótica entre determinadas espécies de leveduras fermentadoras ou não de lactose (10^6 – 10^7

UFC/g), bactérias ácido-lácticas (10^8 UFC/g) e bactérias ácido-acéticas (10^5 UFC/g). Esses três grupos de micro-organismos encontram-se envoltos em uma matriz de exopolissacarídeos, sendo o principal dentre eles o kefiran (GARROTE et al., 2010; CHEN et al., 2015).

Portanto, a associação da matriz de exopolissacarídeos com a cultura iniciadora formam os grãos de kefir, cujo odor é levemente acidificado, a consistência é gelatinosa e pode medir de três a 35mm de diâmetro. O grão de kefir possui forma arredondada irregular, de maneira que já foram comparados à inflorescência de um couve-flor (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008). A coloração do grão varia de acordo com a matriz alimentar onde o grão é cultivado. Geralmente, o grão adquire coloração mais clara e tênue, em relação à cor principal do líquido onde o grão é cultivado. No kefir de água, é comum que os grãos variem de coloração entre o transparente e o amarelado. Neste caso, o tom amarelado é dado em função da presença do açúcar mascavo, que geralmente é o açúcar mais utilizado para cultivo neste tipo de kefir. Do mesmo modo, o grão pode adquirir outras colorações, especialmente se o líquido de crescimento possuir pigmentação.

2.1.3 Dados de Produção e Consumo

A manufatura do kefir é relativamente simples e rápida, quando comparada aos demais leites e bebidas fermentadas. Os grãos são popularmente obtidos através de doações, que são feitas através de redes de colaboração entre os produtores artesanais, principalmente por meio da utilização de redes sociais na internet. A produção da bebida é comumente realizada através da adição dos grãos (cultura iniciadora) no substrato, que tradicionalmente é o leite de vaca. No entanto, outros substratos já foram relatados, como leite de ovelha, leite de cabra, leite de búfala, além de outros substratos não-lácteos, como leite de soja, suco de frutas, açúcar ou melão (FARNWORTH; MAINVILLE, 2008; ALMEIDA, 2011; RATTRAY; O'CONNELL, 2011).

Quanto à produção comercial, além da bebida original fermentada, há também a venda e desenvolvimento de outros produtos funcionais a partir do kefir, como alimentos que se assemelham à iogurte grego, queijos, além dos kefir livres de glúten e lactose (PRADO et al., 2015).

O consumo do kefir, tanto na versão comercial quanto na versão artesanal, já está atrelado à qualidade de vida e efeitos terapêuticos. Tais efeitos são relatados desde muito tempo por observação empírica e conhecimento popular e, atualmente, reconhecidos por pesquisas científicas atribuídos aos alimentos definidos como funcionais probióticos, onde os micro-

organismos identificados no kefir são responsáveis por variados benefícios a saúde humana (SOCCOL et al., 2014).

2.1.4 Benefícios para Saúde

Os benefícios atribuídos ao kefir estão relacionados à composição da sua cultura iniciadora, ou seja, os micro-organismos presentes e seus metabólitos gerados. Mesmo após a remoção dos grãos, a bebida ainda possui micro-organismos viáveis e em concentrações suficientes para agirem diretamente no organismo hospedeiro, ou através de seus produtos produzidos durante a fermentação como enzimas, peptídeos e expopolissacarídeos solúveis também associados à atividade biológica atribuída a bebida (FARNWORTH, 2005; NALBANTOGLU et al., 2014).

Determinados micro-organismos, com efeitos probióticos demonstrados, já foram identificados no kefir, como linhagens de *Lactobacillus kefir*, *L. lactis*, *L. plantarum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Os seus efeitos probióticos geralmente atuam no metabolismo e na saúde humana, por meio da regulação do trato gastrointestinal (SOCCOL et al., 2014).

Uma de suas principais atividades biológicas é a prevenção de infecções por meio da inibição do desenvolvimento e até morte de micro-organismos patogênicos. A atividade antibiótica e bactericida do kefir, está relacionada à produção de ácidos orgânicos (GARROTE et al., 2000), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e peptídeos (FARNWORTH, 2005).

Além disso, acredita-se que o kefir também possui potencial para oferecer benefícios como estímulo do sistema imunológico, inibição de crescimento tumoral, digestão da lactose para indivíduos que apresentam intolerância a este açúcar e redução dos níveis de colesterol (GILL, 1988; LIU et al., 2002; HERTZLER; CLANCY, 2003; YING et al., 2013).

2.2 KEFIR DE ÁGUA

Kefir de água, popularmente conhecido como “tibicos” em algumas regiões do mundo, é uma bebida fermentada tradicional produzida a partir de uma cultura iniciadora adaptada para uma solução de sacarose, que por vezes é adicionada de diferentes frutas secas (tradicionalmente, o figo) ou frutas frescas no processo de fermentação da bebida. A fermentação possui duração média de 24 a 48 horas, em temperatura em torno de $30^{\circ}\pm 40^{\circ}\text{C}$ e, como consequência, obtém-se uma bebida com característica turva e carbonatada. Dependendo do tipo de açúcar utilizado na fermentação, a cor final da bebida varia entre o caramelo e

amarelo claro. O açúcar é consumido durante a fermentação pelas leveduras, tornando o produto pobre em açúcar, com sabor e aroma ácido, refrescante e levemente alcoólico (GULITZ et al., 2011).

Quanto à microbiota que compõe os grãos do kefir de água, ainda há poucos estudos quanto as suas interações e metabolismo, mas assim como o de leite, em sua grande maioria consiste em um consórcio simbiótico entre múltiplas espécies de bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras (LAUREYS; VUYST, 2014). Em um estudo realizado por Gulitz e equipe na Alemanha (2011), listou a diversidade microbiológica presente em grãos de kefir de água, provenientes de três diferentes origens. As seguintes espécies de bactérias foram recorrentes nos grãos analisados: *Lactobacillus casei*, *Lb. hordei*, *Lb. nagelii*, *Lb. hilgardii*, *Lactococcus citreum*, *Lc. mesenteroides*, *Acetobacter fabarum* e *Ac. orientalis*. Também as seguintes espécies de leveduras: *Hanseniaspora valbyensis*, *Lachancea fermentati*, *S. cerevisiae* e *Zygorulaspora florentina*.

Enquanto no Brasil, um estudo realizado por Miguel e equipe (2011) apresentou o perfil microbiológico presentes nos grãos de kefir de água originários de oito diferentes estados brasileiros. Onde foram identificadas as seguintes espécies de bactérias: *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. kefir*, *Lb. sunkii*, *Lb. satsumensis*, *Lb. helveticus*, *Lb. buchneri*, *Acetobacter lovaniensis*, *Gluconobacter liquefaciens* e *Bacillus cereus*. E as seguintes espécies de leveduras: *S. cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Pichia membranifaciens*, *P. cecembensis*, *P. caribbica*, *P. fermentans* e *Candida valdiviana*.

Estudos mais recentes têm identificado novas espécies com potencial probiótico em diferentes culturas de grãos de kefir de água, como *Bifidobacterium aquikefiri* sp (LAUREYS et al., 2016) e uma nova espécie do gênero *Oenococcus* relacionada com *O. oeni* e *O. kitaharae* (VERCE et al., 2018).

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* são naturalmente associadas à uma microbiota intestinal de animais e humanos saudáveis, e sua utilização já é recorrente na produção de alimentos e bebidas fermentadas funcionais (LAUREYS et al., 2016). Em relação ao gênero *Oenococcus*, encontra-se a espécie acidófila *O. oeni*, anteriormente conhecida como *Leuconostoc oenos*, cujas linhagens são amplamente utilizadas na fermentação malolática do vinho, que influencia na melhora da estabilidade e qualidade da bebida (STERNES; BORNEMAN, 2016). Também é relatada a presença da espécie *O. kitaharae*, de caráter ácido-láctico e que possui crescimento via heterofermentativa (ENDO; OKADA, 2006).

Os benefícios atribuídos ao consumo do kefir de água são diversos, como por exemplo atividade antiedematogênica, antioxidante, anti-ulcerogênica, anti-inflamatória e cicatrizante,

(MOREIRA et al., 2008; ALSAYADI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2016). Além da regulação do trato gastrointestinal, benefício também atribuído ao kefir tradicional de leite, pois de certa forma compartilham de alguns micro-organismos probióticos semelhantes em ambas culturas iniciadoras.

O kefir de água é tradicionalmente produzido e consumido de forma artesanal, ao redor do mundo. É uma bebida amplamente consumida em países como Estados Unidos, Japão e França, sendo reflexo de um mercado promissor no segmento de bebidas fermentadas funcionais. Ademais, um dos principais incentivos ao consumo desta bebida é a possibilidade de indivíduos alérgicos ou com intolerância à lactose, veganos e vegetarianos também serem alcançados (FIORDA et al., 2017).

2.3 JAMELÃO

2.3.1 Classificação

Syzygium cumini (L.) Skeels (Sinonimos: *Eugenia jambolana* Lam. ou *Syzygium jambolana* Dc ou *Eugenia cuminii* Druce), popularmente conhecido no Brasil por “jamelão” e em outras regiões do país como oliveira, azeitona-preta, jambolão ou guapê, é fruto da planta de mesmo nome pertencente à família Myrtaceae. Originária da Ásia tropical, especificamente da Índia, é uma planta de fácil adaptação ao clima quente e úmido, principalmente em regiões litorâneas. No Brasil, há grande predominância do fruto na região nordeste (RODRIGUES et al., 2015).

Quanto as suas características físicas e sensoriais, é um fruto elipsoide, de cor púrpura escura, que mede entre 1,5 e 3,5 cm, e possui uma única e grande semente, centralizada no interior da polpa. A casca e a polpa são comestíveis, possuem certa adstringência e sabor ácido (BALIGA et al., 2011). A coloração da polpa é arroxeada, porém com menor intensidade à casca.

2.3.2 Composição Nutricional

Os frutos da *S. cumini* são ricos em açúcares solúveis (glicose, frutose e rafinose), ácidos orgânicos (ácido málico, ácido gálico e ácido oxálico), compostos fenólicos (taninos, principais responsáveis pela adstringência da fruta), antocianinas (3,5 – diglicosidades, delfinidinas, malvinidinas e petunidinas), minerais (principalmente, cálcio e potássio) e

carotenoides (luteínas e β -caroteno) (FARIA et al., 2011; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013). De acordo com Benherlal e Arumughan (2007), a polpa fresca do fruto possui teor de umidade em torno de 850 g/kg, concentração de proteína bruta de 66 g/kg, fibra bruta 7 g/kg e amido 350 g/kg.

2.3.3 Bioativos Naturais

Os principais compostos bioativos presentes no jmelão são os fenóis, flavonoides, antocianinas monoméricas, taninos, ácido ascórbico e carotenoides (FARIA et al., 2011). Estes fitoquímicos estão relacionados aos efeitos farmacológicos tanto da polpa quanto da casca do jmelão. Entre os efeitos já relatados do extrato da polpa da fruta estão ação antioxidante, anti-hiperglicêmico, anti-hiperlipidêmico, hepatoprotetor e nefroprotetor, (REKHA et al., 2008; DAS; SARME, 2009; TANWAR et al., 2010). Quanto ao extrato da casca, estudos relataram sua atividade bactericida no combate de determinadas bactérias patogênicas, efeito antidiarreico, além de prevenir diabetes e aumentar a disponibilidade de insulina (MUKHERJEE et al., 1998; DJIPA et al., 2000; SARAVANAN; LEELAVINOTHAN, 2006; SARAVANAN; PARI, 2007; SRIVASTAVA; CHANDRA, 2013).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DA CULTURA DE KEFIR

Os grãos de cultura do kefir de água foram obtidos em 2019 através de doação realizada por uma rede de produtores artesanais na cidade de João Pessoa, capital do estado da Paraíba. Não se sabe como foram formados, tampouco a quanto tempo vinham sendo cultivados. Os grãos foram obtidos congelados e, portanto, encontravam-se inativados. Os grãos utilizados neste trabalho são mostrados na Figura 1.

Figura 1 – Grãos de kefir de água.



Fonte: LOPES; PAULINO (2018).

3.2 REATIVAÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR

O processo de reativação dos grãos foi realizado no Laboratório de Inovação de Alimentos, localizado no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba. Para a reativação dos grãos de kefir de água foram adotadas Boas Práticas para Serviços de Alimentação, conforme consta na Resolução - RDC N° 216 (BRASIL, 2004).

Antes de serem utilizados para o processo de produção da bebida, os grãos congelados passaram por três ciclos de reativação lenta. Para todos os ciclos foi realizada a higienização da bancada onde utilizou-se álcool etílico hidratado 70° INMP. Os utensílios utilizados foram lavados com sabão neutro, enxaguados em água corrente e secos naturalmente.

Inicialmente, os grãos do kefir ainda congelados foram adicionados a uma solução de sacarose, contendo açúcar tipo demerara. Para preparo da solução foi utilizada proporção de

1:1:10 de grãos, açúcar e água, respectivamente. Essa mistura foi adicionada a um recipiente de vidro, o qual foi parcialmente fechado e levado à estufa a $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas. Após esse tempo, os grãos foram filtrados e a solução descartada. Os grãos recuperados foram adicionados a uma nova solução nas mesmas proporções e condições que o processo anterior, iniciando assim um novo ciclo. Para reativação dos grãos congelados procedeu-se com no mínimo três ciclos de reativação.

3.3 DESCRIÇÃO DOS INGREDIENTES

Para a produção laboratorial do kefir de água foram utilizados como ingredientes: os grãos de kefir de água reativados, água mineral, açúcar do tipo demerara e polpa natural de jamelão.

3.4 PREPARO DA FRUTA

As frutas foram obtidas de árvores frutíferas localizadas dentro do *Campus I* da Universidade Federal da Paraíba, na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba. Para este experimento, só foram utilizadas frutas extraídas diretamente dos galhos e que estivessem com sua integridade preservada.

As frutas recolhidas foram acondicionadas em sacolas de polietileno de média densidade e transportadas até o Laboratório de Inovação de Alimentos do Centro de Biotecnologia, onde foram devidamente preparadas. O tempo de transporte entre a colheita das frutas e a chegada ao laboratório teve duração de cinco minutos e as frutas foram transportadas em temperatura ambiente.

Para o procedimento de higienização, as frutas foram dispostas em bandejas brancas de polietileno e higienizadas, individualmente, com água e sabão neutro, seguida de enxágue abundante com água corrente. Amostras das frutas higienizadas estão na Figura 2.

Figura 2 – Jamelão íntegro, com casca, polpa e semente, após colheita e higienização.



Fonte: LOPES; OLIVEIRA (2019).

Após lavagem, as frutas permaneceram em recipiente do tipo peneira de aço inoxidável para escoamento do excesso de água durante cinco minutos. Após escoamento do excesso de água, as frutas seguiram para a fase de despulpamento.

A remoção da semente e obtenção da polpa com casca (Figura 3) foi efetuada manualmente, com auxílio de uma faca pequena de aço inoxidável. Objetivou-se nesta fase a remoção da polpa da fruta, mantendo-se a casca, e com o mínimo de injúrias ou danos à semente.

Figura 3 – Polpa e casca de jamelão obtidas após despulpamento manual.



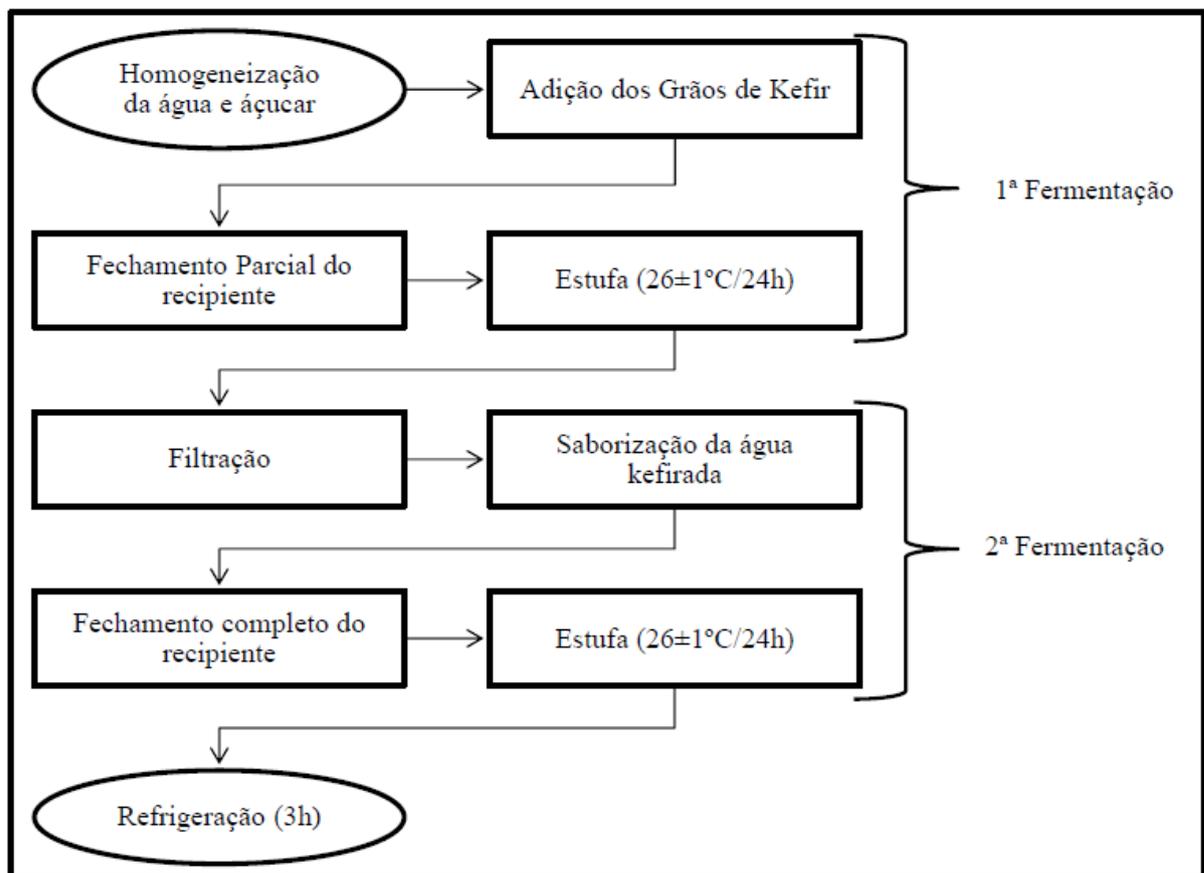
Fonte: LOPES; OLIVEIRA (2019).

Em seguida, a polpa foi separada em porções de 50g e embaladas em sacos de polietileno de baixa densidade. Removeu-se o excesso de ar, procedeu-se com a identificação das embalagens e posterior congelamento $-10^{\circ}\pm 4^{\circ}\text{C}$, durante 254 horas. Após, as polpas foram consideradas totalmente congeladas e encontravam-se aptas a serem descongeladas lentamente e usadas no processo de saborização do kefir, à medida que fosse necessário.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS TRATAMENTOS DESENVOLVIDOS

Foram desenvolvidos dois tratamentos: o primeiro grupo foi denominado tratamento controle (TC) não submetido ao processo de saborização; o segundo grupo foi denominado tratamento teste (T1) e contou com a saborização natural do jamelão. O processo de fabricação de kefir de água foi semelhante nos dois tratamentos. O fluxograma de fabricação do kefir de água está disponível na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma de produção laboratorial do kefir de água saborizado com jamelão.



Fonte: AUTOR (2019).

3.6 PROCESSAMENTO DO KEFIR DE ÁGUA

O processamento do kefir de água foi dividido em duas etapas: primeira fermentação, cujo objetivo é a obtenção da água kefirada; e segunda fermentação, cujo objetivo é saborizar e gaseificar a bebida previamente fermentada. As etapas do processo estão exemplificadas no fluxograma apresentado acima na Figura 4.

Para a produção do kefir de água foram adotadas Boas Práticas para Serviços de Alimentação, conforme consta na Resolução - RDC Nº 216 (BRASIL, 2004). Para início da produção laboratorial foi realizada a higienização da bancada com detergente neutro, seguida de enxágue e sanitização com álcool etílico hidratado 70° INMP. Os utensílios utilizados também foram lavados com detergente neutro, enxaguados em água corrente e secos naturalmente.

Com os ingredientes selecionados e os instrumentos limpos e secos, iniciou-se pesagem dos todos os ingredientes em uma balança digital de precisão. Para a pesagem dos grãos de kefir e do açúcar foram utilizados recipientes de polietileno descartáveis, previamente tarados, enquanto o volume de água foi medido por uma proveta de vidro. Imediatamente após a pesagem, a água mineral e o açúcar tipo demerara foram adicionados em um vidro alto, com capacidade de 500mL, e homogeneizados manualmente com o auxílio de um bastão de vidro. Após dissolução do açúcar foram adicionados os grãos de kefir lentamente. Os potes foram fechados parcialmente e estocados em estufa de cultivo microbiológico a $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Essa fase foi denominada primeira fermentação (fermentação aeróbia).

Após a primeira fermentação os potes foram retirados da estufa e procedeu-se com a filtragem do líquido e obtenção da água kefirada. Os grãos foram recuperados através de uma peneira plástica, com tela de poliéster, e retornaram para nova solução de sacarose, dando início a nova fermentação. A água kefirada prosseguiu para a segunda fermentação. Para esta etapa foi adicionada a polpa, lentamente descongelada a $+6\pm 2^{\circ}\text{C}$, diretamente sobre o líquido. Realizou-se homogeneização mecânica da polpa com a água kefirada com o auxílio de um bastão de vidro. O vidro foi completamente fechado e a mistura foi novamente incubada em estufa de cultivo microbiológico a $26^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas. Essa fase foi denominada segunda fermentação (fermentação anaeróbia).

Após segunda fermentação os potes foram recolhidos da estufa e a bebida foi reservada sob refrigeração ($6^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante o tempo mínimo de três horas, finalizando o processo de produção.

3.7 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Todas as análises microbiológicas foram realizadas em consonância com as especificações do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de acordo com a Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003, em conformidade com Brasil (2003).

Para este estudo foram realizadas análises microbiológicas em quatro grupos microbianos: 1) bactérias heterotróficas mesófilas, 2) colimetria total (coliformes total e termotolerantes), 3) *Salmonella* sp. e 4) bolores e leveduras. Todas as análises foram realizadas tanto no TC como no T1.

Para cada tratamento desenvolvido foram colhidas três amostras e as análises foram realizadas em triplicata.

3.7.1 Análise de Bactérias Heterotróficas Mesófilas

Para determinação da contagem padrão de bactérias heterotróficas mesófilas foi utilizada a técnica que consistiu na inoculação da amostra a ser analisada em ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas invertidas em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 48 horas para a contagem total de bactérias mesófilas. O resultado obtido foi expresso em Unidade Formadora de Colônia por grama (UFC/g), conforme recomendações de BRASIL (2003).

3.7.2 Análise de Coliformes Totais e Termotolerantes

Para a determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes foi realizada a técnica de contagem, que se baseia na inoculação da amostra em caldo lauril sulfato de sódio. Neste processo a presença de coliformes é evidenciada pela formação de gás nos tubos de Durhan, produzido pela fermentação da lactose contida no meio.

Tubos em que houve a evidência de coliformes, foram inoculados em caldo verde brilhante bile lactose (VBBL) 2% e posteriormente foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. A presença de gás nestes tubos de Durhan evidenciou a presença de coliformes totais.

A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada através da inoculação de amostras positivas de coliformes totais em caldo *Escherichia coli* (EC), seguido de incubação em temperatura seletiva de $45 \pm 0,2^\circ\text{C}$. A presença de gás nos tubos de Durhan confirmou a presença de coliformes termotolerantes. Os resultados obtidos da contagem foram expressos em NMP/g (BRASIL, 2003).

3.7.3 Análise de *Salmonella* sp.

O método analítico para detecção de *Salmonella* sp. foi realizado conforme recomendação do MAPA, que consta no capítulo XV da Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003 (BRASIL, 2003).

3.7.4 Análise de Bolores e Leveduras

A metodologia utilizada teve como objetivo a contagem de bolores e leveduras presentes nas amostras de TC e T1. O princípio do método baseia-se na verificação do desenvolvimento de bolores e leveduras em meios de cultura com pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os meios acidificados com $\text{pH } 3,5 \pm 0,1$ promovem seletividade do crescimento de fungos, inibindo a maioria das bactérias presentes no alimento. Após contagem das colônias, o resultado foi expresso em UFC/g (BRASIL, 2003).

3.8 ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO

O grau alcoólico foi determinado pelo método de ebulliometria e o resultado foi expresso em grau Gay Lussac ($^\circ\text{GL}$), de acordo com Atkins (1994).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR

Uma das limitações encontradas para dar início a este experimento refere-se à obtenção dos grãos de kefir de água. Na cidade de João Pessoa, capital do estado da Paraíba, no nordeste brasileiro, não foram encontradas lojas físicas que comercializassem os grãos iniciadores do cultivo, tampouco com garantias de que os grãos são comprovadamente isentos de contaminantes. A forma encontrada para a obtenção dos grãos foi por meio de doações de uma rede de produtores artesanais, cujo contato ocorreu através de redes sociais. Embora haja um entendimento em relação à solidariedade e generosidade implícitos neste tipo de obtenção do grão, por outro lado também existe o questionamento científico sobre a origem, quantidade de células viáveis e tipo de células microbianas presentes. Nesse sentido, caso os grãos estejam contaminados pode haver consequências negativas e/ou prejuízos ao provável consumidor.

4.2 PROCESSAMENTO DO KEFIR

Um dos primeiros pontos a serem discutidos no processamento refere-se à qualidade das frutas obtidas. A forma de obtenção e cuidado com a fruta, e a forma rigorosa de seleção por qual cada fruta passou até ser escolhida foram considerados pontos importantes para a obtenção da bebida final. Para fermentação natural, deve-se evitar frutos que estejam caídos, abertos, com rachaduras ou em contato direto com solo, folhas e outros frutos. Esses cuidados favorecem que a fermentação ocorra somente a partir da adição da fruta na água kefirada e garante ao pesquisador maior controle sobre o início da primeira fermentação.

Durante o processamento da fruta, as cascas foram preservadas em função da presença de antocianinas descritas neste tipo de fruta, conforme relatam Faria et al. (2011) e Srivastava e Chandra (2013). A presença de antocianinas pode contribuir para reforçar as propriedades nutricionais extras da bebida. Em relação ao despulpamento, houve cuidado para não haver injúrias na semente, uma vez que a mesma possui taninos que poderiam contribuir negativamente com sabor adstringente e/ou amargo na bebida final.

As dificuldades encontradas durante a fase de processamento se devem principalmente pela ausência de uma padronização oficial e reconhecida para este tipo de bebida. Os protocolos realizados para o cultivo do kefir de água baseiam-se em relatos e experiências artesanais, como escassez de dados científicos sobre o tema. Informações com precisão científica como

qualidade e quantidade de grãos, viabilidade e tipos de células, tipos de substratos, características de fermentação e de gaseificação, bem como recomendações para manuseio, transporte, congelamento e consumo da bebida, ao tempo que são obstáculos para desenvolvimento nas área de pesquisa e desenvolvimento (P&D), constituem campo vasto de investigação acadêmico-científica na área de biotecnologia de alimentos.

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Em relação às análises microbiológicas, os resultados estão expressos na Tabela 1. Observa-se que a contagem de bactérias heterotróficas mesófilas no kefir controle foi de $8,9 \times 10^4$ UFC/g, enquanto no kefir de água saborizado houve uma redução de cerca de 98% das bactérias totais, resultando apenas $1,2 \times 10^3$ UFC/g. Esse dado foi considerado positivo, pois mostra que na bebida saborizada houve uma redução de bactérias totais.

Tabela 1 – Média dos resultados obtidos nas análises microbiológicas realizadas nos dois tratamentos de kefir de água.

Análises Microbiológicas	Tratamentos	
	Kefir Controle	Kefir saborizado com jamelão
Contagem de bactérias mesófilas (UFC/g)	$8,9 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$
Coliformes à 35°C (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	<10
Coliformes à 45°C (NMP/g)	$1,1 \times 10^3$	<10
<i>Salmonella</i> sp. em 25g	Ausente	Ausente
Bolores e leveduras (UFC/g)	$4,7 \times 10^4$	$6,8 \times 10^4$

Fonte: AUTOR (2019).

Essa redução pode estar relacionada à quantidade de substrato disponibilizado pela fruta durante o processo da segunda fermentação no T1. Apesar de não quantificado neste trabalho, é possível considerar que as bactérias provenientes dos grãos do kefir possam ter produzido ácido láctico e ácido acético, em função do tipo de células microbianas presentes nos grãos e que, a ação conjunta desses dois ácidos pode ter contribuído para causar inibição ou morte de micro-organismos heterotróficos mesófilos que geralmente não resistem a um ambiente com acidificação elevada (JAY et al., 2005).

Este decréscimo de bactérias mesófilas também pode estar associado à concentração de taninos presentes na casca da fruta. Os taninos presentes no jamelão possuem potencial bactericida para determinados grupos de patógenos, entre eles *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e estafilococos coagulase negativa, como *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus warneri* (DJIPA et al., 2000).

Mesmo não sendo uma análise microbiológica exigida pela legislação para este tipo de bebida, a contagem de micro-organismos mesófilos é relevante pois reforça os demais indicadores da condição higiênico-sanitária da bebida em questão. Geralmente, as bactérias deste grupo microbiológico estão associadas à intoxicação alimentar e rápida decomposição dos alimentos. Como exemplo, tem-se grande parte das espécies do gênero *Staphylococcus*, cujo crescimento é demonstrado em temperaturas entre 7° e 47°C e as suas enterotoxinas responsáveis pela intoxicação em humanos são produzidas em temperatura ótima de 40° a 45°C (JAY et al., 2005).

A contagem de coliformes totais obteve os mesmos resultados que a contagem de coliformes termotolerantes. Nos dois casos, as contagens observadas foram de $1,1 \times 10^3$ NMP/g para o kefir controle e de 2,3 NMP/g para o kefir saborizado. Houve redução de mais de 99% do grupo controle para o grupo teste nos dois tipos de análise. Esses dados foram considerados os mais relevantes da pesquisa, uma vez que coliformes são naturalmente encontrados na flora do trato gastrointestinal em humanos e sua contagem é importante uma vez que a *E. coli*, representante dos coliformes termotolerantes, é considerada o principal indicador global de contaminação fecal.

Os coliformes totais são um grupo de bactérias gram-negativas que se reproduzem em temperatura ótima de 35°C. Esse grupo inclui espécies como *E. coli*, exclusivamente de origem fecal, além de gêneros como *Klebsiella* sp, *Citrobacter* sp e *Enterobacter* sp, não necessariamente de origem fecal (JAY et al., 2005).

Por outro lado, os coliformes termotolerantes suportam maiores temperaturas, e possuem temperatura ótima de crescimento fixada em 45°C. Cabe destacar que dentro deste grupo há o predomínio da *E. coli*, sendo um importante indicador de risco para demais patógenos entéricos que poderiam estar presentes.

Numa visão higiênico-sanitária, a pesquisa por coliformes totais e termotolerantes é uma maneira eficaz de indicar a qualidade higiênico-sanitária do alimento ou bebida. A presença de micro-organismos desse grupo mostra a provável presença de patógenos entéricos, responsáveis por distúrbios como a diarreia aguda.

Em relação ao gênero *Salmonella sp.*, este também desperta a atenção da saúde pública mundo afora, uma vez que causa graves infecções em seres humanos a partir do consumo de alimentos contaminados, causando intoxicação alimentar severa, podendo levar o indivíduo ao óbito. Por isso a recomendação e importância de sua detecção em alimentos. No presente estudo, o resultado para presença de *Salmonella sp.* foi negativo. Assim como observado no grupo coliformes, esse dado também foi considerado desejado, uma vez que se mostrou como mais um indicativo de segurança para o consumo humano.

Na análise de bolores e leveduras, observou-se um aumento de aproximadamente 45% neste tipo de micro-organismos quando se comparou o tratamento controle com o tratamento teste. O kefir controle apresentou contagem de $4,7 \times 10^4$ UFC/g, enquanto o kefir saborizado de jamelão apresentou contagem final de bolores e leveduras de $6,8 \times 10^4$ UFC/g. Este aumento pode ser justificado em função da microbiota proveniente da própria fruta. Segundo a literatura, a casca do jamelão é um bom *habitat* para este tipo de micro-organismos e já foram identificadas algumas leveduras agregadas às cascas da fruta na Índia (GHOSH, 2011). Como no presente estudo a casca foi preservada, é possível que o aumento de bolores e leveduras observado em T1 possa ter ocorrido em função disso. Fora este fato, cabe salientar que a opção pelo não uso de agentes sanitizantes com alto poder bactericida nesta pesquisa também pode ter contribuído para a viabilidade da microbiota na casca da fruta.

Na legislação nacional atual para bebidas fermentadas não há abrangência para o kefir de água especificamente. A legislação brasileira faz referência apenas ao kefir de leite, que é abordado na temática de leites fermentados. Sendo assim, existe a necessidade de criar um padrão microbiológico para nortear os pesquisadores na área, assim como o próprio segmento de bebidas fermentadas funcionais que segue crescente no Brasil.

Em conformidade com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados descrito pelo MAPA (BRASIL, 2007), no qual está inserido o kefir como produto lácteo fermentado, o produto tem como seguintes critérios de aceitação: contagens microbianas limite mínimo (m) igual a 10 NMP/g e limite máximo tolerado (M) igual a 100 NMP/g, para coliformes totais. Para coliformes termotolerantes: $m < 3$ (lê-se, menor que três) NMP/g e $M = 10$ NMP/g. Os limites tolerados para bolores e leveduras são: $m = 50$ UFC/g e $M = 200$ UFC/g. De acordo com Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, descrito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), existe a exigência que *Salmonella sp.* esteja ausente em produtos enquadrados como leites fermentados.

Vale ressaltar que os resultados obtidos neste estudo com a bebida fermentada saborizada com jamelão apresentam uma considerável melhora na qualidade microbiológica,

refletindo numa boa qualidade higiênico-sanitária. Os dados analisados conjuntamente mostraram que a segunda fermentação teve uma função além de apenas saborizar a bebida. Constituiu-se em uma etapa fundamental, que contribuiu sobremaneira para a obtenção de um produto seguro para o consumo humano. Além do valor agregado à bebida tradicional quanto as suas características sensoriais, a saborização está relacionada à ocorrência das fermentações láctica e acética, que geram ácidos orgânicos, contribuindo para a acidificação do meio, inibindo micro-organismos deteriorantes e patogênicos.

Um estudo apresentado por Cetinkaya e Elal Mus (2012), apontou a qualidade microbiológica de kefir obtidos em mercados na província de Bursa, na Turquia. As amostras obtidas apresentaram altos níveis de indicadores higiênico-sanitários como coliformes, além de potencial presença de bactérias patogênicas como *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Os dados apresentados por esses autores reforçam a teoria que as boas práticas de fabricação devem ser aplicadas durante toda a fabricação dessas bebidas, tanto em escala industrial como em escala artesanal. Especialmente nos modos mais informais de produção e comercialização, as chances de cultivo de grãos contaminados e consumo da bebida fora de padrão são maiores e podem levar o consumidor a riscos potenciais.

4.4 ANÁLISE DO TEOR ALCOÓLICO

Os resultados para a análise do teor alcoólico estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados médios obtidos nas análises de teor alcoólico realizadas nos dois tratamentos de kefir de água.

Análise do Teor Alcoólico	Tratamentos	
	Kefir Controle	Kefir saborizado com jamelão
Ebuliometria (°GL)	0,0	0,6

Fonte: AUTOR (2019).

Nos dois tratamentos desenvolvidos foi detectado presença de álcool etílico apenas no kefir saborizado, atingindo 0,6 °GL ou 0,6% em volume de álcool. Essa diferenciação se deve à continuação do processo fermentativo após a recuperação dos grãos, quando ocorreu adição de fruta contendo açúcares fermentescíveis. Essa etapa não ocorreu no tratamento controle. Certamente os açúcares da fruta foram consumidos durante as 24 horas da segunda fermentação,

foram metabolizados pela via alcoólica, em condições de anaerobiose, culminando com a presença de leve teor alcoólico e leve gaseificação. Proporcionalmente, a literatura de fermentações revela que, quanto maior o tempo de fermentação a bebida é submetida, maior é a geração de álcool etílico pelos micro-organismos, especialmente por leveduras como a *S. cerevisiae*. No entanto, não foram encontrados padrões na legislação para teor alcoólico, nem para kefir de água, tampouco para leites fermentados.

A determinação do teor alcoólico é interessante pois demonstra a viabilidade de micro-organismos, principalmente leveduras, capazes de realizar fermentação alcoólica. Além disso, o álcool produzido na fermentação do kefir é atribuído a sabor refrescante e outras características sensoriais que o distingue de outras bebidas lácteas fermentadas tradicionais (MAGALHÃES et al., 2011).

Em trabalho realizado por Dornelles (2007), foi desenvolvida uma aguardente a partir da fermentação do caldo-de-cana com grãos de kefir de água, dentro dos padrões legislativos e com 39% de teor alcoólico. Os autores demonstraram a capacidade dos grãos de kefir de água originarem outras bebidas com maiores teores alcoólicos, a depender das condições dadas aos grãos.

5 CONCLUSÃO

A hipótese do presente estudo foi totalmente aceita, visto que a fruta utilizada como agente saborizante natural não exerceu efeitos negativos na tecnologia tradicional do kefir de água, tampouco às características microbiológicas do produto.

De posse dos dados obtidas nesta pesquisa, é possível concluir que:

- A bebida obtida nesta pesquisa, caracterizada como kefir de água saborizado com jamelão, foi considerada segura e atendeu os padrões de qualidade higiênico-sanitária recomendados pelo MAPA, se enquadrando como própria para o consumo humano.
- O kefir controle não obteve o mesmo grau de segurança que o kefir saborizado.
- A etapa de saborização natural foi considerada fundamental, não somente para dar características próprias à bebida, mas principalmente por inibir a presença de microorganismos deteriorantes ou patogênicos.
- É relevante a discussão e implementação de uma legislação norteadora específica para este tipo de bebida fermentada no Brasil, com fins de padronização e orientação para produtores artesanais, indústria e consumidores da bebida.

6 RECOMENDAÇÕES

Sugere-se que novos tempos de fermentação do kefir de água utilizando jamelão sendo testados, onde espera-se que aumente a produção de ácidos orgânicos e possa diminuir ainda mais indicadores higiênico-sanitários, assim como aumento da carbonatação da bebida.

Assim como determinar o grau e a variação de acidez nas bebidas obtidas e verificar seu efeito sobre coliformes e possíveis patógenos. Além de realizar contagem e determinação das bactérias ácido-lácticas, acéticas e leveduras presentes no produto final.

Realizar análises sensoriais para verificar a possibilidade de aceitação do produto pelo público para eventual entrada do produto no mercado varejista.

Realizar análises colorimétricas para mensuração de características de cor, uma vez que a fruta possui coloração altamente atrativa para o consumidor e para o segmento de alimentos processados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAS. **Demanda por produtos vegetarianos ainda é maior do que a oferta no Brasil.** 2015. Disponível em: <<http://www.abrasnet.com.br/clipping.php?area=1&clipping=51257>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

AFREBRAS. **Bebidas Fermentadas em Ascensão.** 2018. Disponível em: <<https://afrebras.org.br/bebidas-fermentadas-estao-em-ascensao/>>. Acesso em: 26 de mar. 2019.

ALMEIDA, F. A.; ÂNGELO, F. F.; SILVA, S. L. da; SILVA, S. L. da. Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p. 51-56, 2011.

ALSAYADI, M. S.; JAWFI, Y. A.; BELARBI, M.; SABRI, F. Z. Antioxidant potency of water kefir. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 2, p. 2444-2447, 2013.

ATKINS, P. W. **Physical Chemistry.** 5 ed. Oxford, Oxford University Press, p. 850, 1994.

BALIGA, M. S.; BHAT, H. P.; BALIGA, B. R. V.; WILSON, R.; PALATTY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam.(black plum): a review. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 1776-1789, 2011.

BENHERLAL, P. S., ARUMUGHAN, C. Chemical composition and in vitro antioxidant studies on *Syzygium cumini* fruit. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2560-2569, 2007.

BNDES. Panoramas setoriais 2030: **desafios e oportunidades para o Brasil.** Rio de Janeiro. 2017. <<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/14214/2/PanoramasSetoriais-2030.pdf>>. Acessado em: 12 mar. 2019.

BRASIL. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, Seção 1, p. 14, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, que adota o **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.** Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, que adota o **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.** Diário Oficial da União, DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 216, de 15 de setembro de 2004, que adota o **Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação.** Diário Oficial da União, DF, 2004.

CETINKAYA, F.; ELAL MUS, T. Determination of microbiological and chemical characteristics of kefir consumed in Bursa. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, v. 59, p. 217-221, 2012.

CHEN, Zhina; SHI, Junling; YANG, Xijuan; NAM, Bo; LIU, Yang; WANG, Zhongfu. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, v. 43, p. 15-21, 2015.

DAS, S.; SARME, G. Study of the hepatoprotective activity of the ethanolic extract of the pulp of *Eugenia jambolana* (Jamun) in albino rats. **J Clin Diagn Res**, v. 3, p. 1466 – 1474, 2009.

Diário Comércio, Indústrias e Serviços - DCI. **Demanda por produtos vegetarianos é maior do que a oferta no Brasil**. Impresso, p. 6. 2015.

Diário Comércio, Indústrias e Serviços - DCI. **Mercado de bebidas com apelo saudável avança**. São Paulo. 2018. Disponível em: <<https://www.dci.com.br/industria/mercado-de-bebidas-com-apelo-saudavel-avanca-1.675800>>. Acesso em: 23 de mar. 2019.

DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUETIN-LECLER, C. Q. J. Antimicrobial activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 71, p. 307 – 313, 2000.

DORNELLES, A. S. **Produção de cachaça com grânulos de kefir**. 72 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

ENDO, A.; OKADA, S. *Oenococcus kitaharae* sp. nov., a non-acidophilic and non-malolactic-fermenting *Oenococcus* isolated from a composting distilled shochu residue. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 56, p. 2345–2348, 2006.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1571-1578, 2011.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir: A Fermented Milk Product. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2ª. ed. New York: CRC Press. Cap. 4. p. 90-118, 2008.

FARNWORTH, E. R. Kefir: a complex probiotic. **Food Science: Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2005.

FECOMERCIO. **Mercado de alimentos e sucos funcionais promete saúde e bons negócios**. 2015. Disponível em: <<http://www.fecomercio.com.br/noticia/mercado-de-alimentos-e-sucos-funcionais-promete-saude-e-bons-negocios>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Standard for Fermented Milks #243. In: Milk and Milk Products. 2^a ed. Roma, p. 6-15, 2011. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/i2085e/i2085e00.pdf>>. Acesso em 23 mar. 2019.
- GARROTE, G. L., ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. de. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 364-369, 2000.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; De ANTONI, G. L. Microbial Interactions in Kefir: a Natural Probiotic Drink. In: eds MOZZI, R. F.; RAYA, R.; VIGNOLO, G. M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria**. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. Cap. 18, p. 327–340, 2010.
- GHOSH, S. K. Study of yeast flora from fruit of *Syzygium cumini* (Linn) skeel. **Agriculture and Biology Journal of North America**, v. 2, n. 8, p. 1166-1170, 2011.
- GIBSON, G. R; RASTALL, R. A. Gastrointestinal infections and the protective role of probiotics and prebiotics. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-16, 2003.
- GILL, H. S. Stimulation of the immune system by lactic cultures. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 535-544, 1988.
- 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.
- HERTZLER, S. R; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 582-587, 2003.
- HUANG, Y., WU, F., WANG, X., SUI, Y., YANG, L., & WANG, J. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of Dairy Science*, v. 96, n. 5, p. 2816-2825, 2013.
- ISMAIL, A. A.; EL-NOCKRASHY, S. A.; KHORSHID, M. A. A beverage from separated buffalo milk fermented with kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 36, p. 117-118, 1983.
- JAY, J. M., LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7 ed., 2005.
- LAUREYS, D.; CNOCKAERT, M.; VUYST, L de; VANDAMME, P. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p.1281-1286, 2016.
- LAUREYS, D.; VUYST, L. de. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 2564–2572, 2014.
- LIU, J. R.; WANG, S. Y.; LIN, Y. Y.; ANDLIN, C. W. Antitumor activity of milk, kefir and soya milk kefir in tumor bearing mice. **Nutrition and Cancer**, v. 44, p. 183–187, 2002.

- MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, G. V. D. M., CAMPOS, C. R., DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 693-702, 2011.
- METCHNIKOFF, E. **Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction**. The prolongation of life: Optimistic studies. W. Heinemann, London, p.161-183, 1907.
- MIGUEL, M. G. da C. P.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p.1875-1884, 2011.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2^a. ed. Brasília (DF), 2014.
- MOREIRA, M. E. C.; SANTOS M. H.; ZOLINI, G. P. P.; WOUTERS, A.T.B.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. **Journal of Medicial Food**, v. 11, p. 356–361, 2008.
- MUKHERJEE, P. K.; SAHA, K.; MURUGESAN, T.; MANDAL, S. C.; PAL, M.; SAHA, B. P. Screening of anti-diarrhoeal profile of some plant extracts of aspecific region of West Bengal, India. **J Ethnopharmacol**, v. 60, p. 85 – 89, 1998.
- NALBANTOGLU, U.; CAKAR, A.; DOGAN, H.; ABACI, N.; USTEK, D.; SAYOOD, K.; et al. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 41, p. 42–51, 2014.
- OTLE, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.
- PRADO, M. R.; BLANDÓ, N. L. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; RODRIGUES, C.; CASTRO, G. R.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v 6, p. 1177, 2015.
- RATTRAY, F. P.; O'CONNELL, M. J. Fermented milk kefir. **Encyclopedia of Dairy Sciences**, 2^a ed., p. 518-524, 2011.
- REKHA, N.; BALAJI, R.; DEECARAMAN, M. Effect of aqueous extract of *Syzygium cumini* pulp on anti-oxidant defense system in streptozotocin induced diabetic rats. **Iran J Pharmacol Therapeut**, v. 7, p.137 – 145, 2008.
- RODRIGUES, K. A. da F.; AMORIMA L. V.; DIAS, C. N.; MORAES, D. F. C.; CARNEIRO, S. M. P.; CARVALHO, F. A. de A. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-Leishmania activity through immunomodulation in vitro. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.
- RODRIGUES, K. L., ARAÚJO, T. H., SCHNEEDORF, J. M., FERREIRA, C. S., MORAES, G. O. I., COIMBRA, R. S., RODRIGUES, M. R. A novel beer fermented by kefir enhances

anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 58–69, 2016.

SARAVANAN, G; PARI, L. Effect of *Syzygium cumini* bark extract on plasma and tissue glycoproteins in streptozotocin induced diabetic rats. **Cell and Tissue Research**, v. 7, n. 1, p. 881 – 887, 2007.

SARAVANAN, G; LEELAVINOTHAN, P. Effects of *Syzygium cumini* bark on blood glucose, plasma insulin and C-peptide in streptozotocin induced diabetic rats. **International Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 4, p. 96 – 105, 2006.

SEBRAE NACIONAL. **Alimentação saudável cria ótimas oportunidades de negócio**. 2019. Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/segmento-de-alimentacao-saudavel-apresenta-oportunidades-de-negocio,f48da82a39bbe410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

SHAHNAWAZ, M.; SHEIKH, S. A.; BHANGAR, M. I.; AHMED, E. Total phenolic compounds and antioxidant activity of jamun fruit (*Eugenia jambolana*) products. **Pakistan Journal of Food Science**, v. 20, n. 1-4, p. 31-41, 2010.

SRIVASTAVA, S., CHANDRA, D. Pharmacological potentials of *Syzygium cumini*: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 9, p. 2084-2093, 2013.

STERNES, P. R.; BORNEMAN, A. R. Consensus pan-genome assembly of the specialised wine bacterium *Oenococcus oeni*. **BMC Genomics**, v. 17, p. 308, 2016.

TANWAR, R. S.; SHARMA, S.B.; SINGH, U. R.; PRABHU, K. M. Attenuation of renal dysfunction by anti-hyperglycemic compound isolated from fruit pulp of *Eugenia jambolana* in streptozotocin induced diabetic rats. **Indian J Biochem Biophys**, v. 47, p. 83 – 89, 2010.

VEIGAS, J. M.; NARAYAN, M.S.; LAXMAN, P.M.; NEELWARNE, B. Chemical nature stability and bioefficacies of anthocyanins from fruit peel of *Syzygium cumini* Skeels. **Food Chemistry**, v.105, p. 619–627, 2007.

VERCE, M.; VUYST, L. de; WECKX, S. Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 479, 2018.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p.383-389, 2005.