



INSTITUTO FEDERAL
BRASÍLIA

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE BRASÍLIA
CAMPUS PLANALTINA

CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AGROECOLOGIA

LUCIANE APARECIDA SOUZA ROZENDO

**ATIVIDADE SIMBIÓTICA EM BEBIDA VEGETAL À BASE DE
CASTANHA DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*)**

Planaltina-DF
2018



**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE BRASÍLIA**
CAMPUS PLANALTINA
CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA EM AGROECOLOGIA

**ATIVIDADE SIMBIÓTICA EM BEBIDA VEGETAL À BASE DE CASTANHA
DO BRASIL (*Bertholletia excelsa*)**

LUCIANE APARECIDA SOUZA ROZENDO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte das exigências para a obtenção do grau de Tecnólogo em Agroecologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília – IFB, Campus Planaltina.

ORIENTADORA: Profª MSc. Heloisa Alves de Figueiredo Sousa

Planaltina – DF, 27 de novembro de 2018

“Que o teu alimento seja o teu remédio e o teu remédio seja o teu alimento”.

Hipócrates – “Pai da medicina”

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço a Deus, por ter me concedido forças e saúde, para concluir essa primeira etapa da minha vida. Sem ele, nada disso seria possível.

Aos meus pais, pelo apoio financeiro e pelo incentivo para que eu não desistisse ao longo do percurso. Sei o quanto se doaram para que eu realizasse essa conclusão com êxito.

Aos meus colegas de turma, pela vivência, risos e angústias compartilhadas. Vocês foram essenciais para o meu amadurecimento emocional.

As duas grandes amigas de curso, Bruna Neves e Dayanny Andrade, por todo o apoio, ajuda, colaboração, conselhos, risadas e por terem sido essenciais para que eu não fraquejasse e desistisse diante das dificuldades. Vocês foram luz nos meus dias!

Sou grata especialmente à professora Edilsa Rosa da Silva, por todas as oportunidades de aprendizado, pela paciência e carinho. À professora e minha orientadora Heloisa Alves de Figueiredo Sousa, pelo apoio, pelos ensinamentos, pelas broncas e principalmente por ter sido a chave principal para que eu me encontrasse no que eu verdadeiramente tenho afinidade ao longo do curso.

A toda equipe de técnicos, monitores e bolsistas do laboratório de Microbiologia Geral e Processamento de alimentos, pelo auxílio durante as análises laboratoriais.

Agradeço a todos que tiveram paciência nos momentos de tensão e empenho. Agradeço imensamente a todos que fizeram parte da minha vida nessa etapa.

RESUMO

ROZENDO, Luciane A. S. (2018). **Atividade Simbiótica em Bebida Vegetal à base de Castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*)**. Monografia apresentada ao Instituto Federal de Brasília – *Campus* Planaltina, como parte dos requisitos para a graduação em Tecnólogo em Agroecologia.

O mercado de alimentos funcionais tem apresentado um elevado crescimento nos últimos anos, tanto na preocupação e interesse dos consumidores em ingerir alimentos que tragam benefícios a sua saúde, como no aspecto da tecnologia alimentícia, no interesse pela diversidade na produção de alimentos funcionais. Este trabalho objetivou desenvolver uma bebida vegetal partir da castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*) fermentado por grãos de Kefir e adicionado de frutooligossacarídeos (FOS). A bebida fermentada foi produzida a partir do extrato hidrossolúvel da castanha do Pará com SST de 12° Brix. Controlou-se a vida de prateleira da bebida durante 28 dias de armazenamento (tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias) a 7°C em BOD em dois tratamentos: (A) tratamento controle e (B) tratamento com adição de 3 % (m/v) de FOS. A estabilidade da bebida fermentada foi avaliada por meio análises de pH, acidez, SST e contagens de células viáveis para *Lactobacillus* e leveduras. Foi possível perceber que durante o processo de fermentação houve consumo de SST e, associado ao aumento na produção de ácido, demonstrado pelo baixo pH e alto valor de acidez. O desenvolvimento e manutenção da população microbiana na bebida fermentada das formulações mostrou que este substrato é excelente para o cultivo de bactérias probióticas já que em qualquer tempo a contagem foi maior que 10^7 UFC/mL. Após 14 dias houve decréscimo significativo para a maioria dos grupos de microorganismos que compõe a biomassa de kefir e por isso, optou-se por delimitar este tempo como o tempo máximo de durabilidade para a bebida fermentada.

Palavras-chave: Tecnologia, Fibra Solúvel, Bebida Funcional.

ABSTRACT

ROZENDO, Luciane A. S. (2018). **Symbiotic Activity of Brazilian Beans Based on Chestnut (*Bertholletia excelsa*)**. Monograph presented to the Federal Institute of Brasília – Campus Planaltina, as part of the requirements for graduation in Technologist in Agroecology.

The functional food market has shown a high growth in recent years, both in the concern and interest of consumers in eating foods that bring benefits to their health, as in the food technology aspect, in the interest of diversity in the production of functional foods. The objective of this work was to develop a vegetable beverage from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) fermented by grains of Kefir and added with fructooligosaccharides (FOS). The fermented beverage was produced from the water-soluble extract from the Brazil nut with SST of 12° Brix. The shelf life of the beverage was controlled for 28 days of storage (times 0, 7, 14, 21 and 28 days) at 7 ° C in BOD in two treatments: (A) control treatment and (B) treatment with addition of 3% (m / v) of FOS. The stability of the fermented beverage was evaluated by means of pH, acidity, SST analyzes and viable cell counts for *Lactobacillus* and yeasts. It was possible to observe that during the fermentation process there was consumption of TSS and, associated with the increase in acid production, demonstrated by the low pH and high acid value. The development and maintenance of the microbial population in the fermented beverage of the formulations showed that this substrate is excellent for the cultivation of probiotic bacteria since at any time the count was greater than 10⁷ UFC/mL. After 14 days there was a significant decrease for most of the groups of microorganisms that make up the kefir biomass and therefore, it was decided to delimit this time as the maximum durability time for the fermented beverage.

Keywords: Technology, Soluble Fiber, Functional Drink.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Amêndoas de castanha do Brasil (<i>Bertholletia excelsa</i>).	16
Figura 2. Grãos de Kefir 5%.....	21
Figura 3. Extrato hidrossolúvel da castanha do Brasil pausterizado.....	24
Figura 4. Preparo das formulações, F1 (formulação controle) e F2 (formulação com frutooligossacarídeo).	25
Figura 5. (Bebida formulação 1 – Controle Bebida formulação 2 – Frutooligossacarídeo – FOS) Análises de pH (traço contínuo) e acidez titulável total (mg ácido láctico por 100 mL de bebida fermentada) (traço pontilhado) das bebidas fermentadas.	27
Figura 6. Sólidos solúveis totais (°Brix) das bebidas fermentadas.....	28
Figura 7. Viabilidade do gênero <i>Lactobacillus</i> e leveduras nas bebidas fermentadas durante o processo de armazenamento.	29

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
2. JUSTIFICATIVA	14
3. OBJETIVOS	15
3.1. OBJETIVO GERAL	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4. REVISÃO DE LITERATURA	16
4.1. CASTANHA-DO-PARÁ (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>)	16
4.2. EXTRATOS VEGETAIS.....	17
4.3. PREBIÓTICOS, PROBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS.....	18
4.4. KEFIR	20
5. MATERIAL E MÉTODOS	24
5.1. MATERIAL.....	24
5.2. PREPARO DO EXTRATO AQUOSO DA TORTA DA CASTANHA DO BRASIL.....	24
5.3. CULTIVO DOS GRÃOS DE KEFIR	25
5.4. ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DA CASTANHA DO BRASIL	25
5.5. ELABORAÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA DA CASTANHA DO BRASIL COM FOS	25
5.6. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	26
5.7. CONTAGEM DE BACTÉRIAS <i>LACTOBACILLUS</i>	26
5.8. CONTAGEM DE LEVEDURAS TOTAIS	26
5.9. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1. CARACTERIZAÇÃO DAS BEBIDAS FERMENTADAS.....	27
6.2. CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	28
7. CONCLUSÕES	30
8. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação dos consumidores com uma alimentação saudável e uma maior preocupação com a sustentabilidade levou ao desenvolvimento de produtos funcionais que, além de sua função nutricional primordial, contribui como meio ambiente e a saúde e bem estar do consumidor.

As pessoas se preocupam cada vez mais com opções viáveis que venham a contribuir com a sustentabilidade, onde a indústria do leite de origem animal acaba sendo bastante prejudicial ao meio ambiente. Segundo dados da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP, a produção de leite e derivados consome grande quantidade de água. Para a produção de um litro de leite são necessários aproximadamente 700 litros de água; para um quilo de queijo, 5.000 litros de água e para um quilo de manteiga, 18.000 litros de água são consumidos.

Respeitando as condições de intolerantes, pessoas que preferem não consumir ou até mesmo pessoas que trabalham pela causa de um meio ambiente mais sustentável e que a indústria procura crescer e inovar com produtos que atendam necessidades específicas.

Buscando satisfazer esse novo mercado, microrganismos probióticos vêm sendo incorporados em uma grande variedade de alimentos e bebidas como iogurtes, queijos, sorvetes, sucos, chocolates, cereais e produtos cárneos (SAAD, 2006; ANNUNZIATA e VECCHIO, 2011).

O consumo de bebidas de Kefir, alimento considerado probiótico tem sido estimulado devido a seus efeitos benéficos à saúde (MONTANUCI, 2010). A bebida de Kefir é produzida pela ação de bactérias e leveduras que existem em associação simbiótica nos grãos de Kefir que resulta em uma solução ácida contendo compostos aromáticos, gás carbônico e etanol. O grande número de microrganismos presentes no Kefir e suas interações microbianas, os possíveis compostos bioativos resultantes do metabolismo microbiano e os benefícios associados ao uso dessas bebidas confere ao produto o status de um excelente probiótico natural (LEITE *et al.*, 2013, ANFITEATRO, 2000).

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios a partir do aproveitamento de subprodutos ou resíduos vem sendo explorado com cada vez mais intensidade nos diferentes segmentos do setor agropecuário brasileiro e mundial em função da grande variedade de matéria-prima disponível (MARQUES *et al.*, 2013).

Durante o processamento industrial das amêndoas de castanha-do-Brasil (também conhecida como castanha do Pará), importante fonte protéica, lipídica e de minerais, a geração de resíduos torna-se cada vez maior quando seu teor em óleo é extraído, gerando um grande volume de subproduto denominado torta desengordurada ou parcialmente desengordurada, dependendo da forma de extração lipídica aplicada. O aumento do descarte dos resíduos resultantes do processamento dessa oleaginosa nas etapas pós-extração de seu teor oleoso é um fato preocupante

para o setor industrial, em decorrência da possibilidade de contaminação ambiental (SANTOS, 2008; SANTOS *et al.*, 2010, SANTOS, 2012).

A torta da castanha-do-brasil possui valores de proteínas, fibras e minerais (principalmente o selênio) maiores que da própria amêndoa e é considerada uma excelente fonte de proteína vegetal em função de sua qualidade, é rica em aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína, geralmente insuficientes em proteínas vegetais (COHEN, 2007). Esta apresenta inúmeras possibilidades de aplicação, visando o enriquecimento de uma grande variedade de grupos de alimentos, tais como: produtos para panificação, bebidas, embutidos, farinhas, leites, cereais, snacks, salgados, doces, sorvetes, chocolates, além de muitos outros (SOUZA e MENEZES, 2004).

O mercado de alimentos funcionais tem apresentado um elevado crescimento nos últimos anos, o que reflete a preocupação e o interesse dos consumidores em ingerir alimentos que tragam benefícios à sua saúde. Em função deste interesse, pesquisas que comprovem os benefícios do consumo desses novos produtos tornam-se essenciais (LEITE *et al.*, 2013; MONTANUCI, 2010; ANFITEATRO, 2000).

Os produtos probióticos, exemplos de ingredientes funcionais são encontrados principalmente em derivados lácteos, como leite fermentado e iogurtes, sendo escassas as opções de produtos vegetais contendo culturas probióticas.

Dessa forma, considerando a relevância dos alimentos funcionais para a saúde humana, os benefícios ocasionados pela ingestão de microrganismos probióticos, o elevado consumo mundial de bebidas e que as fontes alimentares de probióticos ainda são muito limitadas aos produtos lácteos é de fundamental importância a realização de pesquisas, que busquem desenvolver novas bebidas de natureza probiótica, a fim não só de ampliar a disponibilidade de mercado desses produtos, mas de servir como opção aos que não podem ou não apreciam o consumo de produtos lácteos.

A ampliação do uso da fermentação utilizando material vegetal barato e amplamente disponível como substrato, tem sido proposta para o desenvolvimento de alimentos nutritivos e com boas propriedades sensoriais, em substituição ao leite. Dentre os subprodutos vegetais, a torta da castanha-do-Brasil destaca-se como interessante alternativa para o desenvolvimento de uma bebida vegetal funcional fermentada por grãos de Kefir.

2. JUSTIFICATIVA

Para Caporal *et al.*, (2011), a agroecologia se consolida como enfoque científico na medida em que este novo paradigma se nutre do conhecimento acumulado de outras ciências, assim como de saberes, conhecimentos e experiências dos próprios agricultores.

Uma das linhas potenciais de ação da agroecologia trata-se do estudo das características, propriedades e potencialidades de vegetais para uso múltiplo fundamentado em saberes.

Dessa forma, considera-se a relevância dos alimentos funcionais para a saúde humana, os benefícios ocasionados pela ingestão de microrganismos probióticos, o elevado consumo mundial de bebidas e que as fontes alimentares de probióticos ainda são muito limitadas aos produtos lácteos é de fundamental importância a realização de pesquisas, que busquem desenvolver novas bebidas de natureza probiótica, a fim não só de ampliar a disponibilidade de mercado desses produtos, mas de servir como opção aos que não podem ou não apreciam o consumo de produtos lácteos.

A ampliação do uso da fermentação utilizando material vegetal barato e amplamente disponível como substrato, tem sido proposta para o desenvolvimento de alimentos nutritivos e com boas propriedades sensoriais, em substituição ao leite. Dentre os subprodutos vegetais, a castanha-do-Brasil destaca-se como interessante alternativa para o desenvolvimento de uma bebida vegetal funcional fermentada por grãos de Kefir.

Considerando o exposto previamente, o presente trabalho justifica-se por somar as propriedades funcionais presentes na castanha-do-Brasil sendo alternativa para o desenvolvimento de uma bebida vegetal funcional e dos benefícios simbióticos presentes nos grãos de Kefir e no frutooligossacarídeos, para o desenvolvimento de um produto inovador, que é fonte de proteína de boa qualidade biológica, minerais como o selênio, cálcio, fósforo e magnésio, vitaminas do complexo B e microrganismos probióticos.

É de fundamental importância a realização de pesquisas, que busquem desenvolver novas bebidas de natureza simbiótica.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma bebida vegetal a partir da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) fermentada por grãos de Kefir e adicionado de frutooligossacarídeos.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar duas formulações de bebidas fermentadas à base do extrato aquoso de castanha-do-Brasil fermentada por grãos de Kefir e adicionado de frutooligossacarídeos;
- Avaliar as características físico-químicas (pH, acidez e SST) das bebidas elaboradas ao longo do período de 28 dias de armazenamento;
- Avaliar a viabilidade das bactérias *Lactobacillus* e leveduras totais no produto ao longo do período de 28 dias de armazenamento.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Castanha-do-Pará (*Bertholletia excelsa*)

A castanha-do-pará sendo também conhecida como castanha-do-brasil e castanha-da-amazônia é o fruto da castanheira, uma árvore nativa da região Amazônica, é classificada como uma Angiosperma (A palavra vem do grego *angeios*, que significa “**bolsa**” e *sperma* “**semente**”) da classe Dicotyledonea, da ordem Myrtiliflorae, pertencente à família das Lecythidaceae, gênero *Bertholletia*, espécie *excelsa*.

Segundo Vianna (1972) ela é considerada uma das maiores riquezas nas regiões dos castanhais. Seu fruto é globoso, popularmente denominado de ouriço de forma esférica ou capsular, que contém em seu interior em média de 12 a 22 sementes, que são a parte comestível do fruto, as castanhas. (FERREIRA *et al.*, 2006) (Figura 1)

Yang (2009) relata que a superfície do fruto apresenta-se espessa, de coloração castanha, variando entre o claro-escuro, com uma variação de peso entre 200 g e 1,5 kg, com média de 750 g. Sua coleta é realizada nos meses de novembro a março, a partir do extrativismo de coleta.



Figura 1. Amêndoas de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*).

Fonte: Internet- Toda Fruta, 2017. Disponível em: <https://www.todafruta.com.br/castanha-do-para/>

De grande importância econômica na Amazônia brasileira, a castanheira possui grande valor de mercado referente às sementes. Dela se obtém as amêndoas conhecida internacionalmente como “Brazil nut”. Dentre sua utilização na comercialização estão: “in natura”, desidratada, é usada para obtenção de leite para temperos de pratos especiais, a extração do seu óleo utilizado para confecção de sabonetes, cremes e xampus, e de farinha ou paçoca para a confecção de pães e bolos (BRAGA, 2007).

De acordo com Souza e Menezes (2004) a castanha possui elevado valor energético e proteínas de alto valor biológico. Apresenta muitos outros constituintes indispensáveis para a manutenção da saúde como o selênio, um mineral com alto poder antioxidante que vem sendo referido na diminuição do risco de câncer e doenças cardiovasculares e auxiliando no fortalecimento do sistema imunológico. Porém a concentração desse mineral (selênio) na amêndoa varia de região para região onde a planta vegeta.

É uma amêndoa considerada fonte de proteína vegetal, em função da qualidade e quantidade de aminoácidos que possui, sendo conhecida pelo seu sabor grandemente apreciado, e ainda apresentando qualidades nutricionais importantes. É constituída por 60 a 70% de lipídios, expressivamente de ácidos graxos poli-insaturados, e de 15 a 20% de proteína de boa qualidade biológica, sendo ainda considerada uma boa fonte nutricional em questão do enriquecimento e produção de alimentos como forma alternativa para a alimentação da população. Sendo assim o resíduo da castanha obtido a partir da extração do óleo por prensagem da amêndoa, em geral chamado de torta, torna-se objeto de interesse para estudos devido ao seu elevado teor proteico (FERREIRA *et al.*, 2006).

As opiniões de Gonçalves *et al.*, (2002) e Ferreira *et al.*, (2006) estão em consonância com o fato de que a amêndoa da castanha-do-pará, contem boa qualidade em sua fração lipídica e alto valor alimentar. Em sua fração lipídica, denominado de ácidos graxos poli-insaturados apresentam-se em seguintes proporções: 37,42% de oléico e 37,75% de linoléico, totalizando 75,17% dos ácidos graxos totais, bem como, 24,83% de ácidos saturados como o palmítico, o esteárico e o araquidônico, com 13,15%; 10,36% e 1,32%, respectivamente.

Segundo Cymerys *et al.*, (2005) esta castanha possui uso para a medicina popular, sendo o ouriço utilizado no preparo de chá, como remédio natural combatendo anemia, problemas intestinais e hepatite. Souza (1963) e Shanley (1998) também constata seus grandes valores nutricionais, tanto em proteínas como em calorias consideráveis, e o valor nutricional do leite obtido das amêndoas sendo similar ao leite de vaca, contendo minerais e aminoácidos completos.

4.2. Extratos Vegetais

De acordo com a ANVISA, Resolução RDC nº 268, de 22 de setembro de 2005, os extratos hidrossolúveis vegetais possuem o seu teor proteico mínimo pré-estabelecido, obtido através de partes proteicas de espécies vegetais, podendo ser apresentadas em grânulos, pó, líquido e outras formas, sendo exceção formas não convencionais para alimentos.

Os extratos hidrossolúveis vegetais são obtidos através de matéria prima vegetal, possuindo características semelhantes e servindo como alternativa ao leite de origem animal. Segundo Wang e

colaboradores (2011) os extratos vegetais mais conhecidos e que mais se destacam no mercado são o de coco e de soja, alternativa mais conhecida aos intolerantes a lactose, porém, outras matérias primas podem ser utilizadas para a mesma finalidade, como amêndoas, castanhas, arroz aveia e outros.

Sendo uma opção alternativa, esses substitutos lácteos possuem um valor nutricional, principalmente referindo-se ao alto teor de proteínas. Tecnologias vêm sendo cada vez mais aplicadas ao melhoramento e adaptação, principalmente às características sensoriais, com o intuito do encaixe e melhor aceitação dos consumidores.

O extrato de amêndoa é bastante popular nos países que enfrentam o Mar Mediterrâneo e se estende desde a Península Ibérica até o Leste da Ásia, também foi muito utilizado na cozinha na época da Idade Média, pois o leite de vaca estragava rapidamente e era transformado em manteiga ou queijo. Além disso, o leite de amêndoa é nutritivo com pouca gordura, ao contrário do leite de vaca, e sem a lactose, o que o torna seguro para indivíduos com alergia e intolerância (BOTELHO, 2013).

O extrato hidrossolúvel da castanha do Brasil, sendo conhecido como bebida vegetal de castanha ou mesmo leite de castanha é uma opção interessante à substituição do leite animal, principalmente à pessoas adaptadas a dietas vegetarianas e/ou veganas estritas, sendo um extrato ainda amplamente estudado. Segundo Carvalho *et al.*, (2011) o apelo à essas opções veganas se dá em aspectos relacionados a saúde, sendo considerado a ausência de gorduras animais e um alto teor mineral, uma importância nutricional essencial.

A despliculação da castanha é uma alternativa opcional para a obtenção do extrato hidrossolúvel da castanha, sendo envolvido a extração, a separação do resíduo insolúvel, formulação e o tratamento térmico (FERBERG *et al.*, 2002).

4.3. Prebióticos, Probióticos e Simbióticos

Santos *et al.*, (2008) relataram que o termo probiótico foi introduzido pela primeira vez por Lilly e Stillwel em 1965, para descrever substâncias secretadas por um microrganismo, o qual estimula o crescimento de outro.

De acordo com Saad (2006) os probióticos são microrganismos vivos que promovem equilíbrio a microbiota intestinal e a saúde do hospedeiro. Os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os gêneros probióticos mais conhecidos e utilizados com a principal alegação de proporcionar funcionalidade ao organismo.

Os efeitos à saúde humana são bastante amplos, seguindo desde o equilíbrio bacteriano intestinal, auxiliando na digestão, beneficiando o sistema imunológico e aumentando a absorção

mineral no organismo. O termo probiótico desperta o interesse e tem os seus efeitos comprovados em produtos contendo microrganismos benéficos.

Os prebióticos são definidos como oligossacarídeos que não são digeríveis no intestino delgado e atingem o intestino grosso onde atuam estimulando seletivamente o crescimento de bactérias desejáveis no cólon, alterando a microbiota em favor de uma composição mais saudável (MANNING *et al.*, 2004). A World Gastroenterology Organisation (2011) definiu os prebióticos como os ingredientes não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon.

Algumas características são fundamentais quando se seleciona um prebiótico, dentre elas destacam-se que estes não devem ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato digestório, devem ser seletivo para uma quantidade limitada de microrganismos habitantes no cólon e devem alterar essa microbiota, tornando-se mais saudável para o hospedeiro (COSTA e ROSA, 2010).

Segundo Reig e Anesto (2002) o termo prebiótico, pode ser definido como componentes alimentares, ou seja, fibras alimentares não digeríveis que agem beneficiando o hospedeiro, pelo fato de auxiliarem o crescimento e/ou atividade de uma ou diversas espécies bacterianas benéficas ao cólon.

De acordo com Renhe e colaboradores (2008), os prebióticos como sendo não digeríveis, passam intactos ao longo do trato gastrintestinal, podendo chegar ao cólon, as porções finais do intestino, podendo assim, agir como substrato para o crescimento e multiplicação das bactérias probióticas que se encontram no local, garantindo a ação delas, estimulando o efeito benéfico à saúde. No entanto, os prebióticos irão estimular o crescimento de um número limitado de bactérias, porém não é papel dele selecionar um gênero específico, como *Lactobacillus* ou *Bifidobacterium*.

Os frutooligossacarídeos (FOS) são um exemplo de fibra prebiótica. Segundo Hartemink *et al.*, (1997) são oligossacarídeos de ocorrência natural, principalmente em produtos de origem vegetal como: alcachofras, aspargos, beterraba, chicória, banana, alho, cebola, trigo, tomate, entre outros.

O equilíbrio produzido pela microbiota gastrointestinal pelo consumo de FOS estimula outros benefícios no metabolismo humano, como a redução da pressão sanguínea em pessoas hipertensas, alteração do metabolismo de ácidos gástricos, redução da absorção de carboidratos e lipídeos, normalizando a pressão sanguínea e lipídeos séricos e melhoria do metabolismo de diabéticos (YAMASHITA *et al.*, 1984, SPIEGEL *et al.*, 1994).

Ainda pode-se observar um aumento da digestão e metabolismo da lactose, aumento de reciclagem de compostos como o estrógeno, aumento da síntese de vitaminas, principalmente do complexo B, aumento da produção de compostos imuno estimulantes, que possuem atividade

antitumoral, diminuição do crescimento de bactérias nocivas, diminuição da produção de toxinas e compostos carcinogênicos e auxílio da restauração da flora intestinal normal durante terapia com antibióticos. Também atribui-se ao consumo de FOS a redução da potencialidade de várias patologias humanas normalmente associadas com o alto número de bactérias intestinais patogênicas, como doenças autoimunes, câncer, acne, cirrose hepática, constipação, intoxicação alimentar, diarreia associada a antibióticos, problemas digestivos, alergias e intolerâncias a alimentos e gases intestinais (se consumido em quantidade adequadamente recomendada) (YUN, 1996).

Gallina e colaboradores (2012) destacaram a importância da sobrevivência das bactérias probióticas no produto, necessitando alcançar um valor elevado (tipicamente acima de 10^6 UFC/ ml ou g) para ser de importância fisiológica ao consumidor. Onde esse valor ou acima, irá garantir que parte considerável chegue intacta ao trato gastrointestinal, para que possam agir com seus benefícios ao hospedeiro. Entretanto, outros autores propõem que a dose mínima diária da cultura probiótica considerada terapêutica seja de 10^8 e 10^9 UFC, o que corresponde ao consumo de 100 g de produto contendo 10^6 a 10^7 UFC/g.

Os simbióticos referem-se à combinação de bactérias probióticas e de substâncias prebióticas que afetam benéficamente o hospedeiro por melhorar a sobrevivência e implantação de microrganismos vivos no trato gastrodigestório e por favorecer seletivamente o crescimento ou atividade metabólica de bactérias promotoras de saúde no cólon (O'SULLIVAN, 2001; ARAÚJO, 2007).

Portanto, os simbióticos proporcionam ação conjunta de prebióticos e probióticos podendo ser classificados como componentes dietéticos funcionais que podem aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato digestório superior, pelo fato do seu substrato específico estar disponível para fermentação (GIBSON e ROBERFROID, 1995; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2011).

Sendo assim um produto no qual tem probiótico e prebiótico associado é denominado de simbiótico. É importante ressaltar que o consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. São amplamente utilizados principalmente na área de laticínios, destacando-se no preparo de produtos lácteos fermentados, como iogurtes, leites fermentados e outros produtos. Sendo de proposta inovadora o uso de probióticos e fibras prebióticas em produtos vegetais.

4.4. KEFIR

O kefir é uma bebida com origem registrada há mais de 2000 a. C. nas montanhas do Cáucaso, na Rússia, entre o Mar Negro e o Mar Cáspio. A palavra Kefir, de origem turca, é

derivada de keif, que significa sentir-se bem. As tribos muçulmanas consideravam este alimento um presente de Alá e, por isso, não permitiam que outros povos, principalmente não muçulmanos, tivessem acesso a ele. Isso fez com que, durante muitos anos, o conhecimento a respeito desse alimento não fosse difundido para o restante do mundo (COSTA e ROSA, 2010; LOPITZ – OTSOA *et al.*, 2006).

Kefir é um fermentado carbonatado refrescante com leve sabor ácido, feito de grãos de kefir, uma mistura complexa e específica de bactérias e leveduras aderidas em uma matriz de polissacarídeo, está inserida na categoria de bebida fermentada com uma mistura de ácido láctico e etanol (SARKAR, 2007).

Este produto é uma suspensão de microrganismos simbiotes formada por um grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido lácticas) e de leveduras, ambas encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas bactérias (DINIZ *et al.*, 2003).

No regulamento técnico de identidade e qualidade, Instrução Normativa no. 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), publicado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) entende-se por Kefir o produto incluído na definição 2.1. cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*.

Os grãos de kefir, são grânulos gelatinosos de forma irregular, com coloração branca ou levemente amarela, apresentam aspecto de couve-flor e o tamanho varia de 2 a 3 cm de diâmetros (MARSHALL, 1993; GARROTE *et al.*, 2001).



Figura 2. Grãos de Kefir 5%.
Fonte: ROZENDO, 2018.

Segundo a definição da Food and Agriculture Organization/ World Health Organization (2001), os grãos de kefir são uma mistura complexa de bactérias (*Lactobacillus kefiri* e espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*), além de leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*S. omnisporus*, *S. cerevisiae* e *S. exiguus*) que apresentam uma associação forte e específica.

A composição centesimal dos grãos de kefir variam de acordo com a sua origem. Grãos de kefir originários da Rússia, Iugoslávia e Bulgária contem aproximadamente 90% de água, 3,2% de proteína, 0,3% de lipídios, 5,8% de substâncias solúveis não-nitrogenados e 0,7% de cinzas (OTOGALLI *et al.*, 1973 *apud* ZOURARI; ANIFANTAKINS, 1988). Valores similares foram encontrados em grãos de kefir originários da Suécia (GARROTE *et al.*, 2001). Entretanto, grãos de kefir originários da Argentina apresentaram 83% de água, 9-10% de polissacarídeos e 4,5% de proteína (ABRAHAM; DE ANTONI, 1999).

Em geral, os grãos de kefir apresentam predomínio de bactérias ácido-láticas (10^8 - 10^9 UFC/mL), seguido de leveduras (10^5 - 10^6 UFC/mL) e bactérias ácido-acéticas (10^5 - 10^6 UFC/mL). Porém, as condições de fermentação podem afetar esse padrão (KOROLEVA, 1991; GARROTE *et al.*, 2001). Em relação às bactérias ácido-láticas, Garrote *et al.*, (1997) observaram que a microflora dos grãos de kefir apresentam (78,3%) de *lactobacillus* e (0,9%) de *lactococos*.

As leveduras colonizam a superfície dos grãos de kefir, enquanto que os *lactobacillus* e *lactococos* podem ser encontrados na superfície e no seu interior (DUITSCHAEVER *et al.*, 1988; NEVE, 1992; REA *et al.*, 1996).

O kefir é fonte de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam na manutenção e funcionamento do corpo humano. O teor de vitaminas do kefir é influenciado pelo tipo de leite e pela microbiota dos grãos de kefir devido à síntese de vitaminas pelos próprios grãos (SARKAR, 2007; FERREIRA, 2012).

Desta forma, é considerado uma boa fonte de vitaminas do complexo B, principalmente B1, B6 e B12, que apresentam numerosos benefícios que incluem atuação no fígado e sistema nervoso, auxílio no tratamento de pele, aumento de energia, entre outros (MAHAM; ESCOTT-STUMP, 2010). Além de ser rico em vitamina K a qual desempenha papel essencial na coagulação sanguínea (SARKAR, 2007; MAHAM e ESCOTT-STUMP, 2010).

Em relação ao teor de proteína, durante a fermentação do leite as proteínas são metabolizadas, sendo facilmente utilizadas pelo organismo. Além disso, há uma mudança no perfil de aminoácidos e aumento da quantidade de treonina, serina, alanina, lisina e amônia (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2003; SARKAR, 2007). Kevicius e Sarkinas (2004) estudaram o perfil de

aminoácidos do kefir mostrando a presença de valina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, fenilalanina e triptofano.

Ademais, o kefir é fonte de diversos macromelementos, tais como: potássio, cálcio, magnésio, fósforo e microelementos, tais como: cobre, zinco, ferro, manganês, cobalto e molibdênio (LIUT KEVICIUS e SARKINAS, 2004).

Este alimento também contém diversos compostos com propriedades aromáticas tais como: acetaldeído, diacetil, acetona, acetato de etilo, butanona, ácidos pirúvico, acético, propiônico e butírico (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2000; BESHKOVA *et al.*, 2003; SARKAR, 2007). Estudo realizado por Beshkova *et al.* (2003) relatou as seguintes concentrações dos compostos aromáticos no kefir tradicional fresco: acetaldeído de $9,10 \mu\text{g}^{-1}$; acetona de $0,60 \mu\text{g}^{-1}$; acetato de etilo de $0,02 \mu\text{g}^{-1}$; butanona de $0,06 \mu\text{g}^{-1}$; diacetil de $1,08 \mu\text{g}^{-1}$; etanol de $2998,0 \mu\text{g}^{-1}$.

O kefir apresenta capacidade imunomoduladora devido aos microrganismos probióticos presentes nele. Os efeitos benéficos exercidos pelos probióticos ocorrem em dois sentidos, diretamente, quando se relacionam com a presença dos próprios microrganismos, ou indiretamente, quando são efetivados por produtos do seu metabolismo (peptídeos e exopolissacarídeos) (VINDEROLA *et al.*, 2006a; COSTA e ROSA, 2010).

Vinderola *et al.*, (2005) demonstraram que o consumo de kefir está associado ao aumento da atividade fagocitária de macrófagos peritoneais e pulmonares e, além disso, foi capaz de aumentar a imunidade da mucosa mediada por IgA em locais distantes, principalmente, o tecido brônquico.

Além disso, os produtos do metabolismo dos microrganismos probióticos são capazes de controlar a resposta da mucosa do intestino para a imunidade protetora induzida permitindo, assim, a manutenção da homeostasia interna do intestino para o aumento da produção de IgA e influenciando a imunidade sistêmica através das citocinas liberadas para a circulação sanguínea (VINDEROLA *et al.*, 2006b; VINDEROLA *et al.*, 2006c).

Outros estudos têm mostrado que as substâncias antimicrobianas presentes no kefir apresentam atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* (GARROTE *et al.*, 2001; GÜLMEZ e GÜVEN, 2003; SANTOS, *et al.*, 2003; CZAMANSKI *et al.*, 2004).

5. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no período de março a maio de 2018, conduzido no Laboratório de Microbiologia Geral e no Laboratório de Processamento de Alimentos da Unidade da Agroindústria no Instituto Federal de Brasília – IFB Campus Planaltina.

5.1. Material

A Castanha do Brasil utilizada “in natura” na produção de extrato hidrossolúvel (fornecida pelo Laboratório de Processamento de A) Planaltina – DF.

A biomassa de Kefir, cedida pelo laboratório de processamento de alimentos na forma liofilizada, inicialmente aos experimentos foi ativada por três dias dissolvida assepticamente em um béquer de 500mL.

O Frutooligossacarídeo foi obtido comercialmente na forma em pó, em lojas de produtos naturais.

O extrato hidrossolúvel de castanha-do-Brasil inoculado com biomassa de kefir foi mantido a 25° C em BOD e decorrido os variáveis tempos de fermentação, a bebida foi separada da biomassa de kefir, sendo essa desprezada e a bebida utilizada nas análises.

5.2. Preparo do extrato aquoso da torta da castanha do Brasil

Foram desenvolvidas duas formulações de extrato aquoso da torta da Castanha do Brasil. A torta foi homogeneizada no liquidificador com a adição de água potável a 75°C nas proporções de 1:2 (torta da castanha do Brasil: água). A mistura obtida foi transferida para um recipiente de vidro e submetida à pasteurização com temperaturas entre 72° C a 75°C por 20 min. (Figura 3).



Figura 3. Extrato hidrossolúvel da castanha do Brasil pasteurizado.
Fonte: ROZENDO, 2018.

5.3.Cultivo dos grãos de Kefir

O cultivo da suspensão simbiótica de Kefir foi realizada de acordo com a técnica proposta por Magalhães (2008). A suspensão foi cultivada em solução de açúcar mascavo solubilizado em água destilada (50 g L^{-1}), com troca contínua do material nutriente a cada 24 h da cultura e sob temperatura ambiente a fim de se obter a quantidade necessária para os ensaios de fermentação.

5.4.Elaboração de bebida fermentada da castanha do Brasil

A bebida foi desenvolvida segundo método proposto por Carneiro (2010) com adaptações. Os extratos aquosos após o processo de pasteurização foram resfriados até 22°C em estufa, sendo adicionado de xarope de sacarose ($20,7 \text{ mL}$ de xarope/L de Kefir) e inoculado com 5% (m/v) de grãos de Kefir.

A fermentação foi conduzida a 22°C em estufa por 12 h até pH 4,7. A bebida fermentada formada foi resfriada lentamente a 10°C por 12 h até pH 4,5. Os grãos de Kefir foram separados das bebidas fermentadas por peneiramento, lavados com água destilada e mantidos em solução de água com açúcar mascavo sob-refrigeração ($4\text{-}8^\circ\text{C}$). As bebidas fermentadas produzidas foram adoçadas levemente (5% m/v), homogeneizadas, distribuídas em frascos de vidro de 300 mL, previamente esterilizados, e armazenadas sob-refrigeração a 4°C em BOD.

5.5.Elaboração de bebida fermentada da castanha do Brasil com FOS

A bebida foi desenvolvida segundo método proposto por Carneiro (2010) com adaptações. Os extratos aquosos após o processo de pasteurização foram resfriados até 22°C em estufa, sendo adicionado de xarope de sacarose ($20,7 \text{ mL}$ de xarope/L de Kefir) e inoculado com 5% (m/v) de grãos de Kefir e 3% de frutooligossacarídeos. (Figura 3)



Figura 4. Preparo das formulações, F1 (formulação controle) e F2 (formulação com frutooligossacarídeo).
Fonte: ROZENDO, 2018.

5.6. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas das bebidas formuladas foram realizadas segundo A.O.A.C. (2005) quanto a: acidez, pH (sendo resultado inicial de pH 6,1 na formulação com FOS e pH 6,2 na formulação controle) através do Phmetro portátil KASVI e sólidos solúveis totais (°Brix) inicialmente corrigido à 12° Brix, utilizando refratômetro, sendo analisado ao longo de 28 dias de armazenamento.

5.7. Contagem de bactérias *Lactobacillus*

A contagem de bactérias lácticas foram realizadas pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais seriadas, segundo Silva *et al* (2001) com adaptações. Na superfície de cada placa contendo Agar De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Acumedia). Foram inoculados 0,1 mL das diluições decimais selecionadas (10^{-2} e 10^{-5}). As placas foram incubadas invertidas em estufa BOD a 22°C por 72 horas em condições de anaerobiose.

5.8. Contagem de leveduras totais

A contagem de leveduras totais foi realizada por meio da semeadura em placas para contagem das unidades formadoras de colônia por mL ou g (UFC. ml⁻¹ ou g⁻¹). Foram realizadas pela técnica de plaqueamento em profundidade (“Pour Plate”), contendo Potato Dextrose Ágar (PDA) acrescido de ácido tartárico 10% até atingir pH 3,7 – 3,8. As placas foram incubadas em estufa de cultura BOD a 25° C por 72 horas (SILVA *et al.*, 2001, com adaptações).

5.9. Análises estatísticas

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas foram submetidos à ANOVA, pelo teste F a 5% de significância. As interações nas quais os efeitos principais não forem significativos foram interpretadas diretamente, já os valores médios obtidos que apresentaram diferenças significativas entre si foram analisados por meio do Teste de Comparação de Médias de Tukey também a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização das bebidas fermentadas

A Figura 4 apresenta os valores de pH e acidez titulável das bebidas controle e FOS durante o armazenamento. Houve decréscimo nos valores de pH durante o armazenamento das bebidas fermentadas controle e FOS. Durante o período de armazenamento foi observado um aumento na acidez titulável, ou seja, as bebidas tornaram-se mais ácidas. Maiores valores de pH corroboraram com menores valores de acidez titulável.

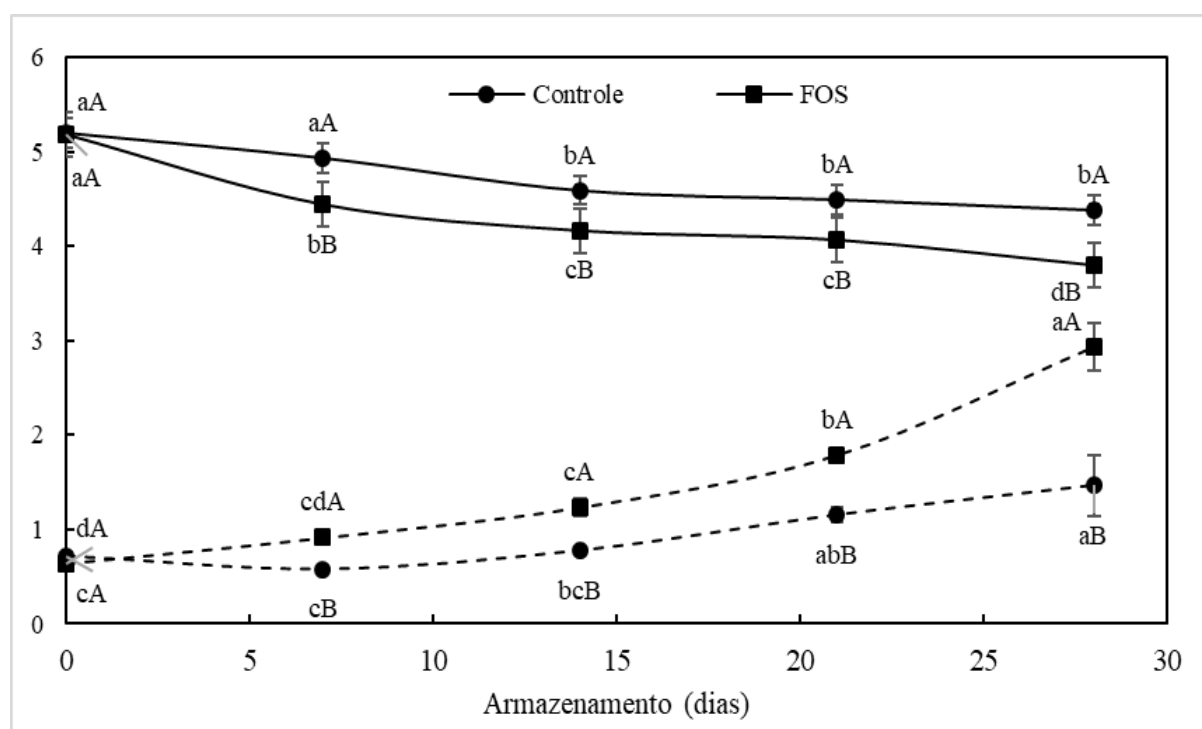


Figura 5. (Bebida formulação 1 – Controle Bebida formulação 2 – Frutooligossacarídeo – FOS) Análises de pH (traço contínuo) e acidez titulável total (mg ácido lático por 100 mL de bebida fermentada) (traço pontilhado) das bebidas fermentadas.

O aumento da acidez titulável da bebida fermentada durante armazenamento de 0 a 28 dias foi entre 0,66 a 1,48 % e 0,64 a 2,66 % para as formulações controle e FOS, respectivamente. A legislação brasileira preconiza que as bebidas de kefir devem ter acidez titulável entre 0,5 e 1,5 % de ácido lático (BRASIL, 2000), portanto, a durabilidade máxima das formulações, considerando este parâmetro, seriam de no máximo 28 e 14 dias para a bebida fermentada controle e FOS, respectivamente. Alguns pesquisadores alegam que em produtos fermentados é comum manutenção ou diminuição da acidez durante o armazenamento, fato que é atribuído à proteólise microbiana (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2003) ou a capacidade das leveduras em assimilar o lactato presente no meio (LOPITZ-OTSOA *et al.*, 2006).

O aumento da acidez é resultado da pós-acidificação dos produtos e está relacionado à continuidade do processo fermentativo pelas bactérias ácido lácticas durante o período de estocagem, com produção de ácido láctico. Embora o aumento da acidez tenha ocorrido durante toda a vida de prateleira (até o 28º dia), as análises microbiológicas mostraram aumento na contagem significativo de todos os gêneros de microrganismos somente até o 14º dia de armazenamento.

A Figura 5 apresenta a concentração de sólidos solúveis totais da bebida fermentada controle e com FOS ao longo de 28 dias de armazenamento. A adição de 3 % de FOS aumentou a concentração de sólidos solúveis independente do período de armazenamento das bebidas fermentadas. As concentrações de sólidos totais da bebida fermentada variaram de 1,88 a 1,45 % e 5,26 a 3,49 %, nas formulações controle e com FOS, respectivamente. Foi possível perceber que durante o processo de fermentação houve consumo de sólidos solúveis e, associado ao aumento na produção de ácido, demonstrado pelo baixo pH e alto valor de acidez, são indicativos de processo microbiológico pós-acidificação.

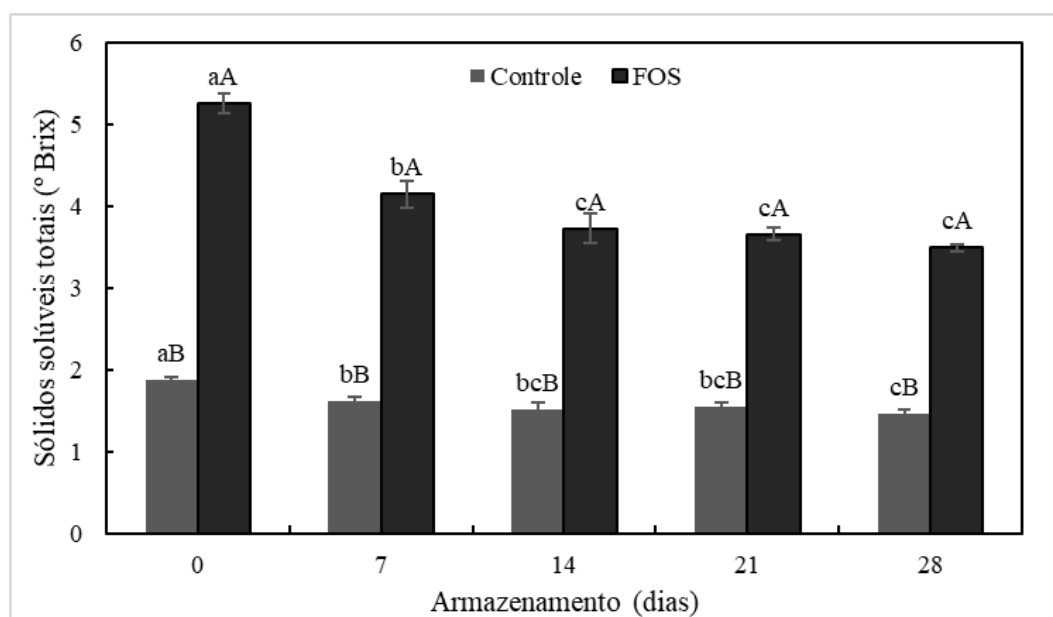


Figura 6. Sólidos solúveis totais (°Brix) das bebidas fermentadas.

Durante o processo de fermentação houve o consumo de sólidos solúveis totais (SST) e, associado ao aumento na produção de ácido, sendo demonstrado pelo baixo pH, com valores entre 4,0 e 4,5 e a concentração de SST ao final de 8º Brix.

6.2. Caracterização microbiológica

A determinação de células viáveis para o gênero *Lactobacillus* e leveduras totais são apresentadas na Figura 6. O desenvolvimento e manutenção da população microbiana na bebida

fermentada de ambas as formulações mostrou que este substrato é excelente para o cultivo de bactérias probióticas já que em qualquer tempo a contagem foi maior que 10^7 UFC. mL⁻¹, contagem no início da avaliação do armazenamento. Gilliland et al (2002) relataram que a contagem celular mínima de cultura específica recomendada para bebidas lácteas fermentadas é de $1,0 \times 10^6$ células viáveis por mL no momento do consumo, dependendo do micro-organismo. As bebidas que utilizam biomassa de kefir devem apresentar contagens de 10^7 UFC.g⁻¹ do total de bactérias de ácido lático e 10^4 UFC.g⁻¹ de contagens de leveduras (FAO/OMS, 2003). Desta forma, ambas bebidas, independente do dia de armazenamento, apresentaram-se dentro da legislação norte-americana.

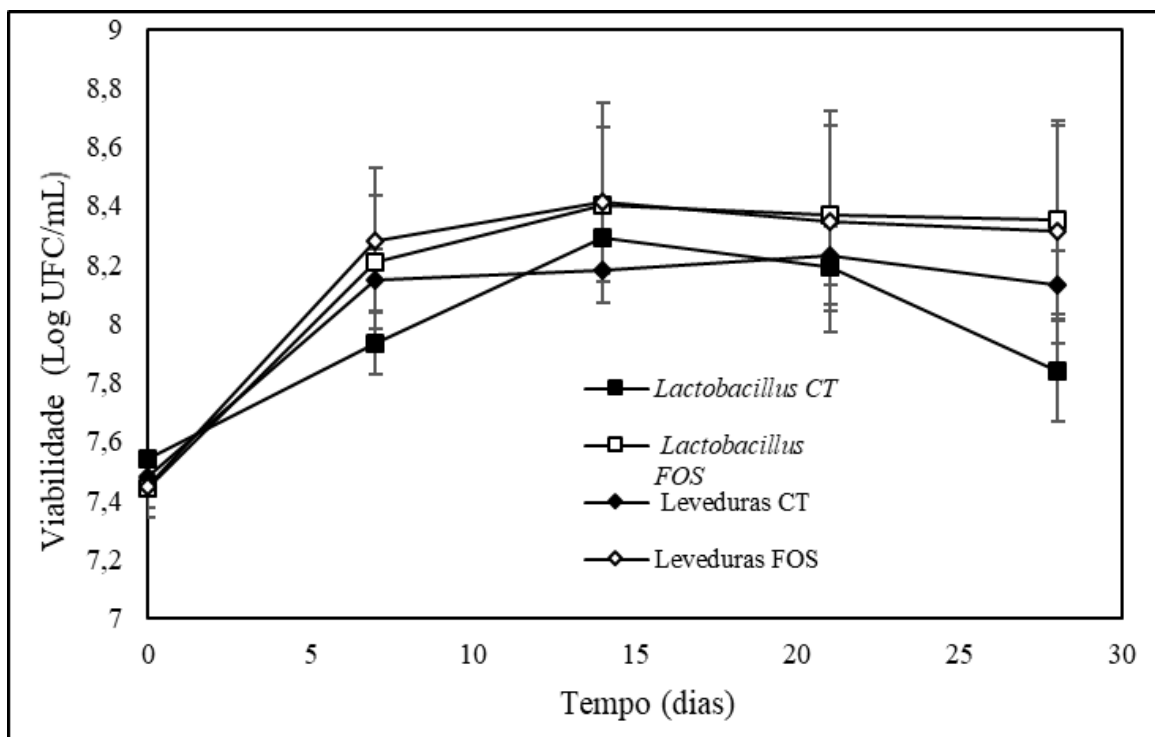


Figura 7. Viabilidade do gênero *Lactobacillus* e leveduras nas bebidas fermentadas durante o processo de armazenamento.

A formulação contendo frutooligosacarídeos apresentou maior crescimento de bactérias e leveduras comparado com a formulação controle e uma maior acidificação e variação no pH (diminuição) do produto. Isso ocorreu devido ao processo de metabolização dos açúcares presentes, de acordo com Shah e colaboradores (1999), ocorre o catabolismo de açúcares, evidenciando a multiplicação de microrganismos no meio e consequentemente a acidez. Segundo Leite *et al.*, (2013) o ácido acético, lático, cítrico, propiônico e butírico são os principais produzidos através do desenvolvimento dos microrganismos formados pelos grãos de kefir.

7. CONCLUSÕES

O produto final obtido do leite vegetal da castanha do Brasil, pode tornar-se uma opção de substituição do leite fermentado tradicional de origem animal, dado a importância da grande demanda do mercado consumidor por produtos sem lactose e sem derivados animais.

O desenvolvimento e manutenção da população microbiana *Lactobacillus* e leveduras totais na bebida fermentada com adição de frutooligossacarídeos e na formulação controle mostrou que o extrato hidrossolúvel da castanha do Brasil é um substrato viável para produção de bebidas fermentadas.

Houve um decréscimo nos valores de pH durante o período de armazenamento das bebidas fermentadas, tanto na formulação controle, como na adicionada de frutooligossacarídeos.

Houve um aumento na concentração de SST (sólidos solúveis totais) independente do período de armazenamento das bebidas fermentadas, principalmente nas adicionadas de frutooligossacarídeos. Essa concentração variou de 1,88 a 1,45% e 5,26 a 3,49% em ambas as formulações. Indicando assim um processo microbiológico pós-acidificação.

Lactobacilos e leveduras totais atingiram fermentação máxima em 21 dias a 7°C. No entanto, durante o armazenamento, o crescimento dos probióticos provenientes da biomassa de kefir, pelo fator limitante de consumo que é o valor do pH (4,5) recomendando-se a vida de prateleira máxima da bebida fermentada em até 14 dias.

O fibra frutooligossacarídeo adicionada à bebida fermentada, em razão do efeito prebiótico, mostrou-se eficiente na manutenção dos microrganismos presentes na bebida funcional. Garantindo benefícios à saúde e ao bem estar do consumidor.

8. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. de; Characterization of Kefir grains grown in cow's Milk and in soya Milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 2, p. 327-333, 1999.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** Atualizado em agosto, 2007.
- ANFITEATRO, D.N. **Kefir, a probiotic cultured with probiotic jewels.** 1. Ed., South Australia, Tranmere North Post Office, 2000, 37p.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Factors affecting italian consumer attitudes toward functional foods. **Journal of Agrobio Technology Management & economics**, v.14, n.1, p. 20- 32, 2011.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists.** 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- ARAÚJO, E. A. **Desenvolvimento e caracterização de queijo tipo Cottage adicionado de Lactobacillus Delbrueckii UFV H2b20 e de Inulina.** 2007. 54 f. (Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.
- BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; DIMITROV, Zh. P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. **International Dairy Journal**, v.13, p. 529-535, 2003.
- BOTELHO, R. **Substitutos de leite animal para intolerantes à lactose,** universidade de Brasília, 2013.
- BRAGA, Eneide Taumaturgo Macambira Braga. **Diversidade morfológica e produção de Bertholletia excelsa HBK (Lecythidaceae) no sudeste do estado do Acre-Brasil.** Embrapa Acre-Tese/dissertação (ALICE), 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas da Instrução Normativa Nº 36,** de 31 de outubro de 2000.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n.46, 23 de Outubro de 2007. Aprova o **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados.** Diário Oficial, Brasília, 24 Outubro 2007, seção 1, p. 5.
- CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A.; GOMES, J. C. C.; PAULUS, G.; AZEVEDO, E. O. **Princípios e perspectivas da Agroecologia.** 1. ed. Curitiba: Instituto Federal do Paraná, 2011. v. 200. 180p.
- CARNEIRO, R. P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de Kefir.** 2010. 143p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2010.

- CARVALHO, W. T.; REIS, R. C.; VELASCO, P.; SOARES JÚNIOR, M. S.; BASSINELO, P. Z.; CALIARI, M. Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 422-429, 2011.
- COHEN, K.O.; CHISTE, R.C; MATHIAS, E.A. Produção de Farinha Parcialmente desengordurada de castanha-do-Brasil, **Embrapa Oriental Circular Técnica**, p.42, 2007.
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B.. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, 2010.560 p.
- CYMERYYS, M.; WADT, L.H.O.; KAINER, K.; ARGOLO, V. Castanheira. In: Shanley, P.; Medina, G. (Eds.) **Frutíferas e plantas úteis na vida Amazônica**. Belém: CIFOR & Imazon, p. 61-73, 2005.
- CZAMANSKI, R.T.; GRECO, D.P.; WIEST, J.M. Evaluation of antibiotic activity in filtrates of traditional kefir. **Higiene Alimentar**, v.18, n.124, p. 75-77, 2004.
- DINIZ, R. O.; GARLA, L. K.; SCHNEEDORF, J. M.; CARVALHO, J. C. T. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsuled into a polysaccharide matrix. **Pharmacological Research**, v. 47, n. 1, p. 49-52, jan. 2003.
- DUITSCHAEVER, C. L.; KEMP, N.; SMITH, A. K. Microscopic studies of the microflora of kefir grains and kefir made by different methods. **Milchwissenschaft**, v. 43, n.8, p. 479–481, 1988.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). 2003. **Codex standard for fermented milk**. Codex Stan. 2 ed. FAO/WHO: Rome, Italy, 2003.243p.
- FERBERG, I; CABRAL, L. C.; GONÇALVES, E. B.; DELIZA, R. Efeito das condições de extração no rendimento e qualidade do leite de Castanha-do-Brasil despeliculada. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 1, p. 75-88, 2002.
- FERREIRA, CL de L F. **Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012. 248p.
- FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S. Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos graxos majoritários do óleo bruto da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K). **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 203–208, 2006.
- GALLINA, D. A. et al. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação de viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 45-54, 2012.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Zuriq, v. 30, n. 1, p. 77-84, fev. 1997.

- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONINI, G. L. de. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 4, p. 639-652, nov. 2001.
- GIBSON, Glenn R.; ROBERFROID, Marcel B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- GILLILAND, S.E.; REILLY, S.S.; KIM, H.S. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacteria in yogurt-like product. **Food Microbiology Safety**, v. 67, n. 8, p.3091- 95, 2002.
- GONÇALVES, J.F. de C.; FERNANDES, A.V.; OLIVEIRA, A.F.M.; RODRIGUES, L.F.; MARENCO, R.A. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.2, p.139-142, 2002.
- GÜLMEZ, M.; GÜVEN, A. Survival of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes 4b and Yersinia enterocolitica O3 in ayran and modified kefir as pre- and postfermentation contaminant. **Veterinarni medicina Czech**, v. 48, n.5, p. 126- 132, 2003.
- GUZEL-SEYDIM, Zeynep B.; SEYDIM, Atif C.; GREENE, Annel K. Comparison of amino acid profiles of milk, yoghurt and Turkish Kefir. **Milchwissenschaft**, v. 58, n.3-4, p.158–160, 2003.
- GUZEL-SEYDIM, Zeynep B.; SEYDIM, Atif C.; GREENE, Annel K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 275-277, 2000.
- HARTEMINK, R.; VANLAERE, K.M.J.; ROMBOUTS, F.M. Growth of enterobacteria on fructo-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, Wageningen, v.383, p.367-374, 1997.
- LEITE, A.M.O.; MIGUEL, M.A.L.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of Kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44 n. 2, p. 341-349, 2013.
- LIUT KEVICIUS, Aecio; SARKINAS, Ana. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. **Dairy Science Abstracts**, v. 66, p. 903, 2004.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67-74, 2006.
- MAHAN, L. K ; ESCOTT- STUMP, S .K , **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 12ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1358 p.
- MAHAN, L.K.; STUMP, S.E.; RAYMOND, J.L. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 13 ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2012.
- MANNING, T.S.; GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.18, p.287-298, 2004.

- MARQUES, T. R.; CORRÊA, A. D.; LINO, J. B. R.; ABREU, C. M. P.; SIMÃO, A. A. Chemical constituents and technological functional properties of acerola (*Malpighiaemarginata* DC.) wasteflour. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 3, p. 526-531, 2013.
- MARSHALL, Valerie M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.46, n.2, p. 49-56, 1993.
- MONTANUCI, F. D. **Bebidas de Kefir com e sem inulina em versões Integral e desnatada: elaboração e caracterização química, física, microbiológica e sensorial**. 2010. 139p. Tese de dissertação do Curso de Pós- Graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina, Londrina- PR, 2010.
- NEVE, H. Analysis of kefir grain starter cultures by scanning electron microscopy. **Milchwissenschaft**, v. 47, n.5, p. 275–278, 1992.
- NEVES, L. S. **Fermentado probiótico de suco de maçã**. 2005. 103 f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Agroindustriais), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.
- O’SULLIVAN, G.C. Probiotics. **British Journal of Surgery**, v. 88, p. 161-162, 2001.
- OTTOGALLI, G.; GALLI, A.; RESMINI, P.; VOLONTERIO, G. Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. **Annals of Microbiology**, v.23, p.109-121,1973.
- REA, M.C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F.D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, T.M. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 83–94,1996.
- REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos e probióticos, uma relação benéfica. **Revista Alimento e Nutrição**. v. 9, nº3, p.16-21, Out. - Dez., 2002.
- RENHE, I. R. et al. Prebióticos e os benefícios de seu consumo na saúde. **Revista Brasileira de Nutrição**, Viçosa, v. 23, n. 2, p. 120-124, 2008.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-12. 2006.
- SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D.The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n.3, p. 434-437, 2003.
- SANTOS, O. V. **Estudo das potencialidades da castanha-do-brasil: produtos e subprodutos**. 2012. 214p. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2012.
- SANTOS, O. V. et al. Processing of Brazilnut flour: characterization, thermal and morphological analysis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, supl. 1, p. 264-269, 2010.
- SANTOS, R. B; BARBOSA, L. P. J. L; BARBOSA, F. H. F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, p. 26-38, 2011.

- SANTOS, V. S. **Desenvolvimento de barras de alto teor proteico a partir da castanha-do-Brasil**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Belém: Instituto de Tecnologia, Universidade Federal do Pará.
- SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**, v. 109, n.4, p. 280-290, 2007.
- SHAH SW, ZHAO H, LOW SY, MCARDLE HJ, HUNDAL HS. Characterization of glucose transport and glucose transporters in the human choriochorion cell line, bewo. **Placenta**. 1999; 20(8):651-9.
- SHANLEY, P.; CYMERYYS, M. e GALVÃO, J. (Ed.). **Frutíferas da mata na vida amazônica**. Belém: Imazon, 1998. p. 21-27.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 229 p.
- SOUZA, A. H. de. **Castanha do Pará: Estudo botânico, químico e tecnológico**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura-Serviço de Informação Agrícola, (Estudos Técnicos, 23), p. 69,1963.
- SOUZA, M.L; MENEZES, H.C. Processamentos de Amêndoas e Torta de Castanha-do-Brasil e Farinha de Mandioca: Parâmetros de Qualidade, **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p. 120-128, 2004.
- SPIEGEL, J.E. et al. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Techn, Boston**, v.48, p.85-89, 1994.
- VIANNA, P. R. **Estudo da castanha-do-Brasil**. Brasília: Ministério da Agricultura, Comissão de Financiamento da Produção, 1972.
- VINDEROLA, G; PERDIGÓN, G; DUARTE, J; FARNWORTH, E; MATAR, C. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, n.3, p. 149-156, 2006c.
- VINDEROLA, G; PERDIGÓN, G; DUARTE, J; FARNWORTH, E; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n. 4, p.472-479, 2006a.
- VINDEROLA, G; PERDIGÓN, G; DUARTE, J; FARNWORTH, E; MATAR, C. Remote-site stimulation and duration of the immune response by kefir. **European Journal of Inflammation**, v. 3, n. 2, p. 63-73, 2005.
- VINDEROLA, Gabriel; PERDIGÓN, Gabriela; DUARTE, Jairo; FARNWORTH, Edward; MATAR, Chantal. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v. 36, n.5-6, p. 254-260, 2006b.
- WANG, R.; SONG, B.; ZHOU, W.; ZHANG, Y.; HU, D.; BHADURY, P. S.; YANG, S. A facile and feasible method to evaluate and control the quality of *Jatropha curcas* L. seed oil for biodiesel feedstock: Gas chromatographic fingerprint. **Applied Energy**, v. 88, p. 2064-2070, 2011.

- WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. Probióticos e prebióticos**, 2011, p.29.
- YAMASHITA, K.; KAWAI, K.; ITAKAMURA, M. Effects of fructooligosaccharids on blood-glucose and serum lipids in diabetic subjects. **Nutrition Research**, Fukuoka, v.4, p.961-966, 1984.
- YANG, J. Brazilian nuts and associated health benefits: A review. *LWT - Food Science and Technology*, **Sheffield**, v. 42, n. 10, p.1573-1580, 2009.
- YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. *Enzymes and Microbial Technology*, **Kyungbug**, v.19, p.107-117, 1996.
- VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. Editora Blucher, 2018.
- SILVA, Lirna Salvioni et al. Avaliação da eficiência de três linhagens de leveduras na produção de bebida alcoólica fermentada de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum). 2011.
- LIMA, Ana Raquel Carmo de et al. Avaliação sensorial, química e microbiológica, de bebidas lácteas fermentadas elaboradas com polpas de frutas tropicais. 2011.
- DE MENEZES COPPOLA, Mario; TURNES, Carlos Gil. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, 2004.
- DE OLIVEIRA, Maricê Nogueira et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 1-21, 2002.
- MATTAR, Rejane et al. Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 2, p. 230-236, 2010.