



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**JÉSSICA AZEVEDO FURTADO**

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PÓ À BASE DE GRÃOS DE**  
**KEFIR LIOFILIZADOS**

**FORTALEZA**

**2022**

JÉSSICA AZEVEDO FURTADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PÓ À BASE DE GRÃOS  
DE KEFIR LIOFILIZADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Morais Ribeiro da Silva.

Coorientadora: Ma. Flayanna Gouveia Braga Dias.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F987d Furtado, Jéssica Azevedo.

Desenvolvimento e caracterização de pó à base de grãos de kefir liofilizados / Jéssica Azevedo Furtado. – 2022.

47 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Alimentos, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Larissa Morais Ribeiro da Silva.

Coorientação: Profa. Ma. Flayanna Gouveia Braga Dias.

1. Grãos de kefir. 2. Caracterização microbiológica. 3. Alimentos funcionais. I. Título.

CDD 664

---

JÉSSICA AZEVEDO FURTADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PÓ À BASE DE  
GRÃOS DE KEFIR LIOFILIZADOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Engenharia de Alimentos.

Aprovada em: 19/07/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Larissa Morais da Silva Ribeiro. (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Ma. Flayanna Gouveia Braga Dias  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Ítalo Waldimiro Lima de França  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida, saúde e família.

Aos meus pais, Valdiana e Jackson, pela paciência, incentivo e suporte aos estudos apesar das adversidades. A vocês minha eterna gratidão e amor.

Ao meu companheiro de anos, Jorge, por estar ao meu lado ao longo de tanto tempo, me ajudando, apoiando e estimulando a continuar e não desistir dos meus sonhos.

À Profa. Dra. Evânia Altina pela oportunidade de ingressar no Laboratório de Microbiologia de Alimentos – UFC, à Profa. Dra. Larissa Moraes pela orientação e por proporcionar a continuidade de minhas atividades na microbiologia, à Ma. Flayanna Gouveia por todo auxílio e companheirismo. A vocês meu eterno carinho e admiração. Obrigada pelos ensinamentos.

Aos membros participantes da banca examinadora pelo tempo, considerações, colaborações e sugestões valiosas.

Aos amigos de curso, que embora os nomes não sejam citados, jamais serão esquecidos por mim. Obrigada por todas as risadas e companheirismo durante esta difícil caminhada.

A Embrapa Agroindústria Tropical, ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e ao Laboratório de Frutos e Hortaliças da UFC pela disponibilidade e auxílio para a realização das análises.

Aos professores, técnicos, servidores e funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos pela dedicação, em especial ao Pereira pela gentileza, carinho e disponibilidade em sempre ajudar.

À Universidade Federal do Ceará por todo o aprendizado, pelas experiências vividas e a realização de um sonho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação acadêmica, profissional e pessoal, o meu obrigada.

## RESUMO

No cenário atual, há um aumento por parte dos consumidores pela busca de alimentos com foco na saudabilidade e segurança. Aumentando assim, o interesse pelos chamados alimentos funcionais, responsáveis por proporcionar efeitos benéficos à saúde, por parte das indústrias e produtores de alimentos, objetivando atender as necessidades e interesse dos consumidores, destacando-se os probióticos. Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo o desenvolvimento de pós à base de polissacarídeos microbianos provenientes de Grãos de Kefir de água e de leite, que foram submetidos a caracterização físico-química, microbiológicos e testes de segurança não clínica *in vivo* utilizando *Danio rerio*. Os grãos recebidos por doação foram submetidos ao processo de liofilização para a obtenção das amostras em pó de Grãos de Kefir de água (GKA) e de leite (GKL) e caracterizados. Foi verificado melhor perfil nutricional para GKL, com porcentagens maiores de lipídeos (9,17 %) e proteínas (18,59%) e ambos apresentaram alta porcentagem de carboidratos. Para parâmetros de  $A_w$ , Sólidos solúveis, pH e Acidez, os parâmetros se mantiveram conforme relatado na literatura científica. As amostras apresentaram qualidade microbiológica satisfatória quanto à presença de patógenos. As maiores contagens de microrganismos ocorreram para os GKL (bactérias ácido-láticas  $1,1 \times 10^6$  UFC/g) e GKA (bactérias ácido-acéticas  $4,0 \times 10^2$ ). O teste de atividade locomotora frente ao Zebrafish (*Danio rerio*) não constatou ação das amostras sobre à atividade locomotora dos animais, além de não ter sido observada nenhuma morte durante 96 horas, caracterizando as amostras como seguras para o consumo humano. As amostras apresentaram características físico-químicas significativamente diferentes, sendo seguras para o consumo humano do ponto de vista microbiológico e toxicológico, fornecendo assim novas informações acerca dos grãos de kefir para possíveis aplicações.

**Palavras-chave:** grãos de kefir; caracterização microbiológica; alimentos funcionais; probióticos.

## ABSTRACT

In the current scenario, there is an increase on consumers looking for food with a focus on health and safety. Then, increasing the interest in the functional foods, responsible for providing beneficial effects on health, by food industries and producers, aiming to meet the needs and interests of consumers, probiotics stand out in this food group. Thus, this study aimed to develop powders based on microbial polysaccharides from water and milk kefir grains which were selected for physical-chemical, microbiological and non-clinical safety tests in vivo using *Danio rerio*. The grains received by donation were submitted to the freeze-drying process to obtain water kefir (GKA) and milk (GKL) grains powder samples and evaluated. A better nutritional profile was verified for the GKL, with higher percentages of lipids (9.17%) and proteins (18.59%) and both with a high percentage of carbohydrates. For Aw, Soluble Solids, pH and Acidity parameters, the parameters were maintained as reported in the scientific literature. The samples showed satisfactory microbiological quality for the presence of pathogen. The highest counts of microorganisms occurred for GKL (lactic acid bacteria  $1,1 \times 10^6$  CFU/g) and GKA (acetic acid bacteria  $4,0 \times 10^2$  CFU/g). The locomotor activity test against Zebrafish (*Danio rerio*) did not show any action of the samples on the locomotor activity of the animals, in addition to not having observed any death during 96 hours, characterizing the samples as safe for human consumption. The samples showed significantly different physicochemical characteristics, being safe for human consumption from a microbiological and toxicological point of view, thus providing new information about kefir grains for possible application.

**Keywords:** kefir grains; microbiological characterization; functional foods; probiotics.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grãos de Kefir.....	18
Figura 2 - Efeito das amostras na atividade locomotora do Zebrafish ( <i>Danio rerio</i> ) no Teste de Campo Aberto.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição Centesimal dos Grãos de Kefir Liofilizados.....	31
Tabela 2 - Caracterização Físico-química dos Grãos de Kefir Liofilizados.....	33
Tabela 3 - Contagem e Pesquisa de Microrganismos. ....	35
Tabela 4 - Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras frente ao zebrafish adulto. .....	40

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	13
<b>2.2</b>	<b>Objetivo específico</b> .....	13
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
<b>3.1</b>	<b>Alimentos fermentados</b> .....	14
<b>3.2</b>	<b>Probióticos</b> .....	14
<b>3.3</b>	<b>Alimentos funcionais</b> .....	16
<b>3.4</b>	<b>Grãos de kefir</b> .....	17
<b>3.5</b>	<b>Mercado de produção de kefir</b> .....	19
<b>3.6</b>	<b>Liofilização</b> .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
<b>4.1</b>	<b>Obtenção das amostras</b> .....	22
<b>4.2</b>	<b>Obtenção dos pós dos grãos de kefir</b> .....	22
<b>4.3</b>	<b>Caracterização físico-química dos pós dos grãos de kefir</b> .....	22
<b>4.3.1</b>	<b><i>Composição centesimal</i></b> .....	22
<b>4.3.1.1</b>	<i>Determinação de umidade</i> .....	23
<b>4.3.1.2</b>	<i>Determinação de cinzas</i> .....	23
<b>4.3.1.3</b>	<i>Determinação de proteínas</i> .....	24
<b>4.3.1.4</b>	<i>Determinação de lipídeos</i> .....	24
<b>4.3.1.5</b>	<i>Determinação de carboidratos</i> .....	25
<b>4.3.2</b>	<b><i>Parâmetros físico-químicos</i></b> .....	25
<b>4.3.2.1</b>	<i>Determinação da atividade de água (Aw)</i> .....	25
<b>4.3.2.2</b>	<i>Determinação de sólidos solúveis</i> .....	25
<b>4.3.2.3</b>	<i>Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)</i> .....	26
<b>4.3.2.4</b>	<i>Determinação da acidez total titulável</i> .....	26

4.4	<b>Caracterização microbiológica dos pós de grãos de kefir</b> .....	26
4.4.1	<i>Diluições</i> .....	26
4.4.2	<i>Contagem de aeróbios mesófilos</i> .....	27
4.4.3	<i>Contagem de leveduras</i> .....	27
4.4.4	<i>Contagem de bactérias ácido-láticas</i> .....	27
4.4.5	<i>Contagem de bactérias ácido-acéticas</i> .....	27
4.4.6	<i>Pesquisa de Salmonella sp</i> .....	27
4.5	<b>Avaliação da segurança não clínica</b> .....	28
4.5.1	<i>Zebrafish (Danio rerio) adulto (ZFa)</i> .....	28
4.5.2	<i>Tratamentos iniciais</i> .....	29
4.5.3	<i>Avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto)</i> .....	29
4.5.4	<i>Toxicidade aguda (96h)</i> .....	29
4.5.5	<i>Análise estatística</i> .....	30
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	31
5.1	<b>Caracterização físico-química dos pós dos grãos de kefir</b> .....	31
5.1.1	<i>Composição centesimal</i> .....	31
5.1.2	<i>Parâmetros físico-químicos</i> .....	33
5.2	<b>Caracterização microbiológica dos pós dos grãos de kefir</b> .....	35
5.3	<b>Avaliação da segurança não clínica</b> .....	38
5.3.1	<i>Avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto)</i> .....	38
5.3.2	<i>Toxicidade aguda (96h)</i> .....	40
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

A demanda atual por alimentos engloba fatores cada vez mais complexos, dentre eles fatores ligados à segurança e saudabilidade. Isso é devido ao aumento da percepção dos consumidores sobre os efeitos prejudiciais de uma alimentação desregrada e desequilibrada, aumentando a busca por produtos que possam impactar na manutenção e melhoria da saúde. Assim, há atualmente um crescente interesse por parte dos consumidores por alimentos e bebidas funcionais (BALOGH; KŐSZEGI; HOYK, 2020). Segundo Azizi *et al.* (2021), as vendas globais para esta categoria de produtos foram estimados em US\$ 377,8 bilhões de dólares. Dentre os alimentos funcionais, os alimentos probióticos destacam-se entre os mais estudados, estimulando investimentos no desenvolvimento desses alimentos para que possam atender à demanda dos consumidores (GRANATO *et al.*, 2019).

A diferenciação entre alimentos fermentados, probióticos e funcionais causam dúvidas aos consumidores. Os alimentos probióticos são constituídos por microrganismos vivos, específicos, que, quando consumidos em quantidades adequadas, são associados a benefícios à saúde do consumidor, enquanto os alimentos fermentados passam por um processo fermentativo, no qual microrganismos são os responsáveis pelas modificações do produto, com uma microbiota diversificada, viáveis ou não no produto final. Já os alimentos funcionais formam um grupo de alimentos formados por subgrupos, identificados pelo seu principal componente, como fibra alimentar, ácidos graxos poliinsaturados, fitoquímicos, probióticos, dentre outros. Assim, os alimentos probióticos são uma categoria de alimentos fermentados, também definidos como alimentos funcionais (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018; YADAV *et al.*, 2022).

Isso coloca os grãos de Kefir em destaque devido a seus inúmeros benefícios relatados em pesquisas científicas, possuindo em sua composição os probióticos e compostos bioativos. Além disso, o Kefiran, um exopolissacarídeo relatado como principal constituinte dos grãos, produzido por bactérias do gênero *Lactobacillus*, é uma das características que agregam valor aos grãos de Kefir, pois estudos mostram sua ação antibacteriana, antifúngica e propriedades antitumorais (DONG *et al.*, 2018).

Estudos comparativos das características de grãos de Kefir de leite (GKL) e água (GKA) são importantes, uma vez que pesquisas a respeito dos GKL e principalmente produtos derivados deles já são amplamente divulgados no meio científico, não ocorrendo o mesmo para os GKA e seus derivados ou mesmo para a comparação entre ambos, o que deixa uma lacuna a

ser preenchida tanto no meio científico como para os consumidores (GÖKIRMAKLI; GÜZEL-SEYDIM, 2022).

Diante do exposto, objetivou-se com esse estudo a caracterização acerca de parâmetros físico-químicos, microbiológicos e toxicológicos de pós de GKL e GKA, além da comparação entre esses parâmetros, alcançando mais informações acerca do tema para conhecimento científico e utilização das amostras em produtos alimentícios.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Desenvolver pós a base de polissacarídeos microbianos (Grãos de Kefir de água e de leite) e realizar a caracterização físico-química, microbiológica e toxicológica.

### 2.2 Objetivo específico

- Realizar a liofilização dos grãos de Kefir de água e de leite;
- Avaliar as propriedades físicas e químicas do material em pó;
- Avaliar as características microbiológicas do material em pó;
- Avaliar a toxicidade por meio de testes *in vivo* utilizando *Danio rerio* (Teste de Campo Aberto e Toxicidade aguda) dos pós obtidos.

## 3 REVISÃO DA LITERATURA

### 3.1 Alimentos fermentados

Os alimentos fermentados são resultantes de processos fermentativos, que em uma definição geral podemos dizer que se trata de um processo bioquímico, o qual ocorre devido a utilização dos componentes do alimento por microrganismos, a maioria realizando a decomposição de carboidratos, para a obtenção de energia em circunstâncias de anaerobiose. No entanto, há diversos tipos de fermentação, como fermentação alcoólica, fermentação ácido láctico, ácido butírico, ácido propiônico e ácido acético, os quais geram produtos finais distintos, dependendo não somente do processo como também do substrato utilizado e da espécie do microrganismo. Entre os compostos formados podemos citar: dióxido de carbono, etanol, ácidos orgânicos, dentre outras substâncias (VOIDAROU *et al.*, 2021).

O processo de fermentação, embora não se saiba precisamente quando foi usado pela primeira vez, por muito tempo foi utilizado como principal método de preservação dos alimentos, sendo utilizado por quase todas as culturas pelo mundo e assim estando presente nas mais diversas culturas, tradições e países (KIM *et al.*, 2016; MARCO *et al.*, 2017). Além da preservação, o processo fermentativo em alimentos está associado ao aumento da qualidade organoléptica, qualidade nutricional e à efeitos benéficos para a saúde. Mesmo possuindo impacto no bem-estar e em doenças gastrointestinais, seus benefícios para a saúde ou consumo recomendado não foram amplamente incluídos nas diretrizes alimentares mundiais, provavelmente em função de seus principais efeitos benéficos à saúde serem atribuídos aos probióticos, presentes em muito desses alimentos, abrindo caminho para o estudo dos alimentos probióticos mais especificamente (BELL *et al.*, 2018; GILLE *et al.*, 2018).

Diversas são as matérias-primas utilizadas no processo de fermentação e criação de novos produtos. Dentre eles podemos citar: carnes, peixe, laticínios, frutas, legumes, cereais dentre outros e a utilização de bactérias, leveduras e fungos (SOEMARIE; MILANDA; BARLIANA, 2021).

### 3.2 Probióticos

Nas últimas décadas, as pesquisas sobre probióticos tiveram um grande crescimento nas indústrias alimentícias e farmacêuticas devido às evidências de que o microbioma intestinal humano possui um papel importante na saúde humana, além de diversas



doenças serem ligadas ao déficit dessas bactérias benéficas no intestino (VERLHAC *et al.*, 2020). Estima-se ainda que o mercado de probióticos está projetado para atingir US\$ 77 bilhões até 2025 (VOIDAROU *et al.*, 2021).

Pode-se considerar que a história dos probióticos inicia-se com a história do consumo de alimentos fermentados. Em um primeiro momento, Élie Metchnikoff, um pesquisador russo, sugeriu que o consumo de yogurt seria o responsável pela saúde de povos camponeses búlgaros e que a saúde poderia ser melhorada ao se consumir bactérias boas pela modificação do microbioma intestinal. Somente anos mais tarde, Ferdinand Vergin introduziu o termo “probióticos” (YADAV *et al.*, 2022).

A distinção entre alimentos fermentados e probióticos gera uma grande confusão nos consumidores. Os fermentados possuem uma microbiota diversificada, que pode ou não conter probióticos, podendo estar viáveis ou não, enquanto os alimentos probióticos são constituídos por microrganismos vivos, específicos, que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde (BELL *et al.*, 2018; FAO/WHO, 2002). Essa é a definição atualmente aceita internacionalmente e utilizada pela legislação brasileira (BRASIL, 2018).

Diferentes tipos de bactérias, como as do gênero, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Bacillus*, e leveduras ou fungos, como a *Saccharomyces* e *Aspergillus*, *Candida* são usados como probióticos. Dentre os microrganismos probióticos, os pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os maiores alvos de estudo e assim os mais utilizados industrialmente, tanto em alimentos quanto em medicamentos. Há uma intensa busca por aplicações de probióticos em diferentes produtos para diversificar o consumo e a promoção de saúde (SOEMARIE; MILANDA; BARLIANA, 2021)

Dentre os diversos benefícios amplamente discutidos e atribuídos ao consumo de probióticos, tem-se o controle e tratamento de doenças inflamatórias intestinais, diversas doenças gástricas e entéricas, alívio de pacientes com doença de Crohn, controle de determinadas alergias, prevenção e tratamento de infecções do trato urinário e ao controle e redução de níveis de colesterol no sangue (VOIDAROU *et al.*, 2021).

No entanto, para ser classificado como probiótico, os microrganismos devem atender à alguns requisitos como: sobreviver às condições gastrointestinais, um ambiente ácido e com exposição a sais biliares encontrados no corpo humano, até à chegada ao intestino; ter uma boa capacidade de absorção no intestino; ter uma ligação clara com algum marcador de saúde em ensaios clínicos; ser metabolicamente ativo no intestino e apresentar atividade antimicrobiana; ser constituinte da microbiota do aparelho digestivo humano. Além disso, tendo

em vista que é comum a incorporação de probióticos em alimentos, eles devem permanecer viáveis durante todo o processo tecnológico com propriedades não afetada pelo período de armazenamento em quantidade suficiente para garantir uma dosagem precisa e boa estabilidade do produto, resistindo às interações com a matriz transportadora. Para isso diversas técnicas são empregadas para aumentar a estabilidade química e o tempo de prateleira (GRANATO *et al.*, 2019).

Os mecanismos conhecidos para explicar a ação dos probióticos contra as doenças intestinais são a colonização do intestino, inibindo a adesão na superfície intestinal por patógenos e a interação entre eles, a competição por nutrientes e a produção de diversas substâncias inibitórias, como ácidos orgânicos, ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, acetaldeído, acetoina, diacetil, bacteriocinas e substância semelhantes as bacteriocinas (YADAV *et al.*, 2022).

### **3.3 Alimentos funcionais**

Não há uma definição comum para todos os países acerca dos alimentos funcionais, porém a definição mais aceita estabelece que são alimentos, que além de suas funções básicas de nutrir, visando obtenção energética para o funcionamento e crescimento do organismo, produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos benéficos à saúde, sendo consumido como parte da dieta usual e seguro para consumo sem supervisão médica (GRANATO *et al.*, 2019; NAZIR *et al.*, 2019). Alguns autores explicitam a capacidade de prevenir doenças e melhorar a saúde física e mental, ajudando na promoção de condições ideais de saúde, reduzindo os riscos de uma ou mais doenças não transmissíveis. No Brasil a legislação não define alimentos funcionais e sim alegação de propriedade funcional e de saúde, não sendo permitidas alegações que façam referência à cura ou à prevenção de doenças (STRINGHETA *et al.*, 2007).

Apesar das divergências de definições e regulatórias, as alegações feitas para os alimentos devem ser comprovadas na grande maioria dos países por ensaios clínicos como: ensaios randomizados, duplo-cegos e controlados por placebo, para estabelecer a eficácia funcional, ensaios que atestem a segurança toxicológica, ou devem ser amplamente explorados na literatura científica, restringindo assim o uso generalizado do termo (GRANATO *et al.*, 2019)

Esse termo foi utilizado pela primeira vez no Japão em 1980 e desde então vem sendo expandindo e modificado. No Japão, os alimentos funcionais, chamados de alimentos com alegações de saúde, são regulamentados e supervisionados mediante um processo de aprovação regulatório específico que comprove a sua eficácia como promotores de saúde,

existindo atualmente doze grandes categorias, dentre as quais destacam-se: fibra alimentar, ácidos graxos poliinsaturados, aminoácidos, peptídeo, fitoquímicos e antioxidantes, probióticos e outros (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018).

### 3.4 Grãos de kefir

Os grãos de kefir são responsáveis pela fermentação do leite para produção da bebida denominada Kefir. Diferentes leites podem ser usados, produzindo uma bebida fermentada, ácida, levemente alcoólica, também conhecida por nomes como kefir, képher, knapon, kefer, kepi, em países da Europa. Embora não haja registros sobre a origem dos primeiros grãos de kefir para sua produção, é produzido há centenas de anos nas montanhas do norte do Cáucaso e começou a ser fabricada industrialmente pela primeira vez no final do século XIX na antiga União Soviética, sendo atualmente produzida mundialmente. (KESENKAŞ; GÜRSOY; ÖZBAŞ, 2017; FARAG *et al.*, 2020).

O kefir popularmente produzido é de origem láctea, devido a fermentação do leite, mas pode ser de origem não láctea, devido à fermentação de outras matrizes alimentares, que sejam fontes de açúcares, como frutas e vegetais, destacando-se a fermentação de soluções formadas tão somente por água e açúcares. Assim, os grãos costumam ser chamados de grãos de kefir de leite (GKL) e grãos de kefir de água ou grãos de kefir de açúcar (GKA) devido às matrizes fermentadas, como forma de diferenciação. A origem dos GKA possui teorias incertas e assim como os GKL são comumente passados por gerações ou repassados entre diferentes pessoas para a produção artesanal da bebida fermentada, embora sejam produzidas industrialmente, em menor proporção quando comparado a matriz láctea, em alguns países da Europa, Ásia e América do Norte. A produção de Kefir com GKA representa, uma alternativa saudável para consumidores com requisitos específicos como veganos, intolerante à lactose e pessoas com alergia à proteína dos laticínios (PENDÓN *et al.*, 2021).

As bebidas formadas por esses grãos possuem diferentes características como consequência da diferença de composição dos grãos. Os grãos de kefir de leite possuem formato granular irregular, tamanho pequeno, diâmetro entre 0,1 e 2,0 cm com aspecto de flores de couve-flor, semirrígidos, gelatinosos e com coloração variando entre branco a levemente amarelado (VIANA *et al.*, 2017). Enquanto, os grãos de kefir de água possuem formato que se assemelham a cristais de sal, são translúcidos, possuindo coloração dependentes da matriz fermentada, variando do cinza ao marrom, com consistência rígida e tamanho variando entre alguns milímetros a centímetros (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021).

Figura 1 - Grãos de Kefir.



Legenda: da direita para a esquerda: Grãos de kefir de água e grãos de kefir de leite. Fonte: Kefir.com, (2016)

Os grãos são uma matriz complexa formada por uma variedade de microrganismos, crescendo em simbiose e substâncias formadas principalmente pelo metabolismo de alguns dos seus microrganismos. Grãos de diferentes origens são relatados na literatura, possuindo uma composição microbiana variada. Estão presentes em sua maioria as bactérias ácido-láticas (BAL), e segundo alguns autores há a presença ou não de bactérias ácido-acéticas e leveduras que crescem envoltos do polissacarídeo extracelular secretado por determinados gêneros específicos de *Lactobacillus* presentes. O Brasil é um dos países em que se observa a presença dominante de bactérias ácido-láticas na composição dos grãos, em especial o gênero *Lactobacillus*, e espécies *L. helveticus*, *L. casei*, *L. kefir* (PLESSAS *et al.*, 2017).

Nos GKL, as leveduras presentes são, principalmente, as fermentadoras de lactose, *Kluyveromyces marxianus*, e não fermentadoras de lactose, *Saccharomyces exiguus*. As bactérias responsáveis pela produção do principal exopolissacarídeo (EPS) são *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. kefirgranum* e *L. parakefir*. Esse EPS é o principal constituinte dos grãos, formado por glicose e galactose, chamado Kefiran, solúvel em água, contendo quantidades aproximadamente iguais de glicose e galactose e 127 unidades de hexoses. Um outro composto presente em menor quantidade é o pentassacarídeo conhecido como kefirose. Além dos microrganismos presente, o Kefiran é uma das características que agregam valor aos grãos de Kefir, pois estudos mostram sua ação antibacteriana, antifúngica e propriedades antitumorais (DONG *et al.*, 2018).

Para os GKA é relatado a presença, como componente principal, o exopolissacarídeo dextrano, produzidas pelas bactérias *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc*

*mesenteroides*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus hordei* e *Lactobacillus hilgardii*, possuindo divergência entre os autores quanto à principal espécie responsável pela produção. Esse EPS é um homopolissacarídeo composto de glicose. Possuindo características como alta estabilidade e solubilidade, sendo amplamente utilizada em diferentes ramos da indústria, têxtil, química, médica, farmacêutica e alimentícias (FELS *et al.*, 2018).

### 3.5 Mercado de produção de kefir

A demanda atual por alimentos engloba fatores cada vez mais complexos e abrangentes, como a sustentabilidade da produção e processamento, fatores ligados à segurança, frescor e saudabilidade, aumentando custos e todo o trabalho envolto na produção de novos produtos. Aliado a isso, há atualmente um crescente interesse por parte dos consumidores por alimentos e bebidas funcionais (BALOGH; KŐSZEGI; HOYK, 2020). Segundo Azizi *et al.* (2021), as vendas globais para esta categoria de produtos foram estimados em US\$ 377,8 bilhões de dólares.

Nas últimas décadas, os alimentos probióticos encontram-se entre os alimentos funcionais mais estudados, o que os torna tão populares na mídia social e conseqüentemente estimula os produtores de alimentos a investirem recursos no desenvolvimento desses alimentos para que possam atender à demanda dos consumidores (GRANATO *et al.*, 2019). Isso coloca o Kefir em destaque devido a seus inúmeros benefícios relatados em pesquisas científicas.

Grandes empresas produtoras de Kefir podem ser encontradas no EUA, Reino Unido, Canada, Itália, Áustria, possuindo produtos como bebidas à base de leite e de água, cremes, mix de sementes e frutas, *smoothie*, todos fermentados com Kefir, além de alguns pós produzidos com grãos desidratados, e suplementos alimentares contendo grânulos liofilizados de Kefir e fermentos lácteos vivos selecionados. Havendo assim, um grande mercado a ser explorado em outros países, além da necessidade de uma diversificação de produtos produzidos à base de grãos de Kefir. Duas das maiores empresas de kefir conhecidas são a Lifeway e Evolve Kefir. A primeira possui produtos que podem ser obtidos nos Estados Unidos, Canadá e Grã-Bretanha, todos eles à base de bebidas congeladas e queijo, enquanto a segunda empresa possui como produto principal um *smoothie*, *yogurt*, *CocoKefirLLC*, que fornece bebidas à base de água de coco cultivada com uma mistura de probióticos, dentre outros produtos (PRADO *et al.*, 2015).

Para a produção comercial de Kefir, utiliza-se basicamente dois métodos: método conhecido como russo e as culturas puras. No primeiro caso, é utilizando um processo de

fermentação em série, iniciando com a fermentação dos grãos. O segundo método emprega culturas puras isoladas de grãos de kefir ou culturas comerciais. O uso direto de grãos costumava gerar problemas quanto ao transporte, armazenamento e concentração de células, fato esse que mudou graças a utilização de processos de secagem, como a liofilização e outros processos em nível comercial para o uso de grãos (NIELSEN; GÜRAKAN; ÜNLÜ, 2014; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018)

Além dos estudos de diferentes formulações da bebida Kefir, há uma gama de estudos da utilização dos grãos para a produção de produtos diversos, nos quais se observa a presença de propriedades semelhantes às vastamente demonstradas para as bebidas, como ocorreu o uso de grãos de kefir como agente de fermentação em pães, incentivados pela ação antimicrobiana dos grãos, produzindo um produto com maior tempo de prateleira (SAXAMI, 2014). Outros estudos revelam ainda que, por exemplo, há uma estrutura de grãos estável e microbiota dominante, incluindo bactérias probióticas ao usar soro de leite como substrato. O soro de leite fermentado mostrou ainda ser um meio crioprotetor adequado durante a liofilização. A cultura liofilizada mantém uma alta taxa de sobrevivência e apresenta boa atividade metabólica e eficiência de fermentação, indicando um bom potencial para seu uso como cultura inicial de valor agregado na tecnologia de laticínios. Todos esses estudos mostraram perspectivas promissoras para a aplicação de grãos de kefir em estratégias de valorização de produtos (AZIZI *et al.*, 2021; PRADO *et al.*, 2015).

Os benefícios para a saúde associados ao Kefir estão relacionados à presença de microrganismos probióticos presentes na bebida e grãos, e a uma gama de compostos bioativos produzidos durante o processo fermentativo. Por isso, nos últimos anos, vários estudos sobre esses compostos associadas ao kefir são relatados em trabalhos científicos (AZIZI *et al.*, 2021). Dentre os efeitos benéficos para a saúde relatados na literatura podemos citar: o efeito anti-hipertensivo a partir de cepas bacteriana isolada do Kefir de leite (BRASIL *et al.*, 2018), efeitos antidiabéticos a partir do consumo da bebida láctea fermentada (TISS *et al.*, 2020) e do consumo do Kefir de água como probiótico (ALSAYADI *et al.*, 2014), o efeito imunomodulador do exopolissacarídeos produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* (VINDEROLA *et al.*, 2006) e aumento da atividade de enzima antioxidantes (BENSMIRA; JIANG, 2015). Além da modulação da microflora, a melhora da saúde gastrointestinal, a proteção contra infecções e doenças inflamatórias intestinais, o aumento da resposta imune e efeitos antimicrobianos, amplamente abordados na literatura (MENG; ZHANG; LU, 2017; EBNER *et al.*, 2015).

### 3.6 Liofilização

A liofilização é o processo no qual a água é retirada do material, passando-a diretamente de seu estado sólido para vapor (sublimação). O processo é baseado em uma “secagem a frio” envolvendo três fases básicas: a primeira é o congelamento, seguido da secagem primária, sublimação, e secagem secundária, dessorção. Esse processo é utilizado quando se deseja manter a qualidade do produto, seja qualidade biológica, nutricional ou organoléptica e por isso é usado em produtos farmacêuticos e alimentícios, melhorando sua estabilidade ao armazenamento (NOWAK; JAKUBCZYK, 2020). Embora possua custos mais elevados quando comparados com outras formas de desidratação, é amplamente utilizado para o transporte, armazenamento e preservação de probióticos e culturas iniciadoras nas indústrias de laticínios e organizações que trabalham com microrganismos de referências padrão, devido a qualidade obtida dos resultados (MORGAN *et al.*, 2006).

Considera-se que a liofilização é um processo complexo no qual a sobrevivência das células microbianas pode ser afetada por muitos parâmetros físico-químicos e biológicos e por isso não são todos os microrganismos que podem ser preservados utilizando esse método. Entre os fatores considerados de maior influência sobre o processo, temos: a temperaturas de congelamento, sublimação e descongelamento, grau de desidratação alcançado, meio de reconstituição e tempo e condições de armazenamento, reidratação, além da concentração celular inicial e idade das células (POLO *et al.*, 2017).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção das amostras**

Para a realização deste trabalho, foram obtidas amostras de grãos de Kefir doadas voluntariamente na cidade de Fortaleza - CE, provenientes de duas fontes diferentes. Os grãos de Kefir coletados foram: grãos de kefir de água, provenientes da fermentação da solução água e açúcar mascavo a 10%, e grãos de kefir de leite, provenientes da fermentação em leite de diferentes tipos. As amostras foram armazenadas congeladas em freezers no Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LMA) do Departamento de Engenharia de Alimentos, localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC) para a posterior liofilização dos grãos, obtenção do pó e a realização de análises físico-químicas e microbiológicas.

### **4.2 Obtenção dos pós dos grãos de kefir**

Os pós foram obtidos por meio de processo de liofilização, segundo a metodologia Nunes (2020). As amostras de kefir foram congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas por 48 horas a  $-50^{\circ}\text{C}$ . O processo de liofilização foi realizado no Laboratório de Processos Agroindustriais da Embrapa Agroindústria Tropical. Finalizado o processo de liofilização, as amostras foram trituradas em almofariz e armazenadas em frascos estéreis envolvidos em papel alumínio para a conservação do material.

### **4.3 Caracterização físico-química dos pós dos grãos de kefir**

#### ***4.3.1 Composição centesimal***

As análises para determinação da composição centesimal foram realizadas em triplicata, segundo as metodologias propostas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008), no Laboratório de Frutos e Hortaliças do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará (UFC).

A determinação composição centesimal ou percentual dos componentes dos produtos alimentícios inclui a determinação de: cinzas, umidade, carboidratos, lipídios e proteínas em 100 g do produto de alimentos.



#### 4.3.1.1 Determinação de umidade

A determinação de umidade foi realizada por aquecimento direto, baseando-se na perda de peso da amostra em estufa a temperatura de 105 °C. Inicialmente, foram pesadas 2 gramas de cada amostra, em capsulas de porcelana previamente aquecidas e taradas, e levadas para a estufa por três horas consecutivas. Em seguida, as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente, sendo então pesadas e o valor anotado. As operações de aquecimento em estufa, por uma hora, resfriamento e pesagem foram repetidas até que o peso dos cadinhos contendo as amostras se mantivesse constante (IAL, 2008). Para o cálculo do teor de umidade, utilizou-se a Equação (1).

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{(\text{Peso inicial}) - (\text{Peso final})}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

Peso inicial: representa o peso inicialmente pesado da amostra em gramas;

Peso final: representa o peso da amostra ao atingir peso constante, em gramas.

#### 4.3.1.2 Determinação de cinzas

A análise em questão baseia-se na perda de peso do material submetido à queima em temperaturas entre 550 - 570°C. Foram pesadas aproximadamente cinco gramas de cada amostra em capsulas de porcelana previamente aquecidas e taradas e então levadas para mufla a 550°C. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em dessecador até atingir temperatura ambiente para que fossem pesadas. O procedimento de aquecimento em mufla, resfriamento em dessecador e pesagem foram realizados repetidamente até que as amostras apresentassem peso constante (IAL, 2008). Para o cálculo do teor de cinzas, utilizou-se a Equação (2).

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

Peso inicial: representa o peso inicialmente pesado da amostra em gramas;

Peso final: representa o peso da amostra ao atingir peso constante, em gramas.

#### 4.3.1.3 Determinação de proteínas

A análise foi realizada pelo método de digestão Kjeldahl, em que se baseia na determinação de conteúdo de nitrogênio em substâncias orgânicas e inorgânicas, tendo como etapas principais a digestão, a destilação e a titulação (IAL, 2008).

Para a digestão, foram pesadas aproximadamente 0,3 gramas de cada amostra e colocados em tubo de Kjeldahl juntamente com 1,5 g da mistura catalisadora (sulfato de sódio e sulfato de cobre na proporção 9:1). Em seguida, adicionou-se 6 mL de ácido sulfúrico concentrado, seguido de agitação, encaixe no bloco digestor e aquecimento gradativo até atingimento da temperatura de 350 °C. O aquecimento foi mantido até a completa clarificação da amostra e surgimento da cor esverdeada.

A destilação ocorreu após resfriamento da amostra à temperatura ambiente, em que o tubo de Kjeldahl foi acoplado ao destilador e adicionado uma solução de hidróxido de sódio 50% até que sua cor se tornasse marrom café, tendo sido acoplado previamente ao destilador um Erlenmeyer (250 mL) contendo cerca de 20 mL de solução de ácido bórico a 2,5 % com 5 gotas de solução de indicador fenolftaleína, para a captação de amônia do destilado. Por fim, foi recolhido o volume de aproximadamente 75 mL para a completa destilação da amônia.

Na etapa de titulação, utilizou-se uma solução de ácido sulfúrico 0,1 N até a viragem do indicador, surgindo uma coloração levemente róseo-avermelhada. Para a realização do cálculo, utilizou-se a Equação (3).

$$\text{Proteínas (\%)} = \frac{V \times F \times 6,38 \times 0,014 \times 100}{m} \quad (3)$$

Onde:

V = volume da solução de ácido sulfúrico gasto na titulação;

F = normalidade real da solução de ácido sulfúrico;

6,38 = fator de conversão do nitrogênio em proteína (FC);

m = massa da amostra, em gramas

#### 4.3.1.4 Determinação de lipídeos

Para este ensaio de determinação de lipídios, utilizou-se o método de Soxhlet, o qual se baseia em um processo de extração contínuo de lipídios dos alimentos. Estes são lavados com solvente orgânico repetidamente para que ocorra a extração dos lipídios (IAL, 2008).

Inicialmente, pesou-se aproximadamente 2 gramas de cada amostra, previamente seca, em papel de filtro, formando um cartucho para transferência para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acoplou-se então o extrator ao balão de fundo chato de 250 mL, previamente tarado a 105°C para em seguida ser adicionado o solvente extrator, hexano. Em seguida, o balão foi adaptado a um condensador de bolas e mantido sob aquecimento em chapa elétrica, à extração contínua por 6 horas. Após o período estabelecido, foi retirado o cartucho, destilado o hexano e o balão com o resíduo extraído levado para uma estufa a 105 °C, onde foi mantido por cerca de uma hora. Por fim, foi resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, pesado e repetido as operações de aquecimento, por 30 minutos na estufa, e resfriamento em dessecador até peso constante por tempo máximo de 2 h. Para a realização do cálculo, utilizou-se a Equação (4).

$$\text{Lipídios (\%)} = \frac{(\text{peso do balão com gordura seco} - \text{peso do balão seco}) \times 100}{\text{peso da amostra úmida}} \quad (4)$$

#### 4.3.1.5 Determinação de carboidratos

O conteúdo de carboidratos foi estimado por diferença em relação aos valores de umidade, proteínas, lipídios e cinzas, seguindo a equação (5). Método este conhecido como determinação de extrativos não nitrogenados.

$$\text{Carboidratos (\%)} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas}) \quad (5)$$

### 4.3.2 Parâmetros físico-químicos

#### 4.3.2.1 Determinação da atividade de água ( $A_w$ )

A determinação da Atividade de água ( $A_w$ ) foi realizada em aparelho medidor de  $A_w$  da marca AQUALAB LITE, utilizando uma amostra controle de carvão ativado como branco (IAL, 2008).

#### 4.3.2.2 Determinação de sólidos solúveis

No primeiro momento, foi realizado a limpeza e calibração do equipamento refratômetro. Em seguida, realizou-se a diluição, na proporção 1:10 de amostra para água destilada, e a homogeneização da solução. Posteriormente, com o auxílio de papel de filtro, a solução foi filtrada diretamente sobre o prisma do refratômetro, deixando pingar gotas da solução filtrada em quantidade suficiente para cobrir a superfície. Por fim, o resultado foi lido na escala °Brix (IAL, 2008).

#### *4.3.2.3 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)*

Inicialmente, pesou-se 10 g da amostra em um béquer para diluição em 100 mL de água (diluição 1:10), seguido pela homogeneização da solução. Subsequentemente, houve a determinação do potencial hidrogeniônico com auxílio do potenciômetro de bancada, com eletrodo de vidro, calibrado regularmente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. A operação do pHmetro ocorreu de acordo com as instruções do manual do fabricante (IAL, 2008).

#### *4.3.2.4 Determinação da acidez total titulável*

Para esta análise, foram pesadas 1 g de amostra em Erlenmeyere e adicionados 50 mL de água destilada e de 4 gotas da solução fenolftaleína, seguido da titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L até leve e permanente coloração rósea (BRASIL, 2015).

### **4.4 Caracterização microbiológica dos pós de grãos de kefir**

Os grãos liofilizados foram submetidos às análises de contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, leveduras, bactérias ácido-láticas, bactérias ácido acéticas e pesquisa de *Salmonella sp.* por métodos tradicionais. As unidades dos resultados foram expressas em Unidade Formadora de Colônias por grama de amostra (UFC/g) para as contagens e em ausência ou presença por grama para as pesquisas de microrganismos.

#### **4.4.1 Diluições**

Inicialmente, realizou-se a diluição decimal seriada das amostras, na qual primeiramente, uma parte da amostra foi acrescida de nove partes de diluente (água peptonada

0,1%) e homogeneizada para preparo da primeira diluição ( $10^{-1}$ ). Em seguida, 1 mL referente à primeira diluição foi transferido para um tubo de ensaio contendo 9 mL do mesmo diluente para o preparo da segunda diluição ( $10^{-2}$ ). Esse procedimento foi repetido até a obtenção do preparo da quinta diluição ( $10^{-5}$ ).

#### **4.4.2 Contagem de aeróbios mesófilos**

O cultivo de aeróbios mesófilos foi realizado pelo método de Plaqueamento em superfície (*spread plate*), inoculando alíquotas de 0,3 - 0,3 - 0,3 - 0,1 mL de cada diluição em placas de Petri contendo o meio *Plate Count Agar* (PCA), com posterior incubação a 35°C por 48 horas e contagem das colônias em UFC/g (APHA, 2015).

#### **4.4.3 Contagem de leveduras**

A contagem de leveduras foi realizada através da inoculação de 0,1 mL de cada diluição ( $10^2$  a  $10^5$ ) em meio Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (SABC) e espalhamento em superfície, seguido de incubação a 22°C por cinco dias (KIM, D. H. *et al.*, 2019).

#### **4.4.4 Contagem de bactérias ácido-láticas**

A quantificação de bactérias ácido-láticas foi realizada através do método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*), com a inoculação de 1 mL de cada diluição ( $10^2$  a  $10^5$ ) em meio MRS (Agar para *Lactobacillus* de Man, Rogosa e Sharpe) por 72 horas a 32°C (APHA, 2015).

#### **4.4.5 Contagem de bactérias ácido-acéticas**

A contagem de bactérias ácido-acéticas foi realizada através da inoculação de 0,1 mL de cada diluição ( $10^2$  a  $10^5$ ) em meio GYC (*Glucose Yeast Extract Carbonate*) pela técnica de *spread plate* a 30°C por 72 horas (KIM, D. H. *et al.*, 2019).

#### **4.4.6 Pesquisa de *Salmonella sp***

A pesquisa de *Salmonella* sp seguiu a metodologia proposta por BAM (2016). Inicialmente as amostras foram acrescidas de caldo de enriquecimento não seletivo na proporção 1:9 de amostra para caldo lactosado (CLS) e incubados por 24 horas a 35°C. Após o tempo de incubação, foi transferido 1ml da amostra para dois tubos de ensaio contendo 10mL de caldo de enriquecimento seletivo tetrationato e rappaport vassiliadis respectivamente, seguindo posteriormente para a incubação por 24h a 35°C. Por fim, após o tempo de incubação, realizou-se o plaqueamento seletivo diferencial, por meio de estrias de esgotamento, em placas de Petri contendo os meios XLD (Xilose- Lisina- Desoxicolato Agar) e HE (Hektoen Enteric Agar) para a observação do crescimento ou não de colônias típicas e atípicas indicativas de suspeita de *Salmonella*.

## **4.5 Avaliação da segurança não clínica**

### **4.5.1 Zebrafish (*Danio rerio*) adulto (ZFa)**

Para a avaliação da toxicidade e teste etológico de ansiedade, foram utilizados peixes da espécie Zebrafish (*Danio rerio*), com as seguintes características: selvagens, de ambos os sexos, adultos (ZFa), com idade de 60 a 90 dias, tamanhos de  $3,5 \pm 0,5$  cm e peso de  $0,4 \pm 0,1$  g. Os animais foram obtidos de um fornecedor comercial local, Agroquímica: Comércio de Produtos Veterinários LTDA, em Fortaleza (Ceará, Brasil). A espécie *Danio rerio* utilizada está cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número de acesso A9B8196, por meio da Universidade Federal do Ceará.

Após a obtenção dos animais, deu-se início à aclimatação, em que grupos de 50 peixes foram colocados por 24 h em aquário de vidro, com as dimensões 40 x 20 x 25 cm, contendo água previamente desclorada pelo uso de anticloro, Protec Plus®, com pH 7.0 a 25 °C, bombas de ar com filtros submersos e com ciclo circadiano de 14/10 h de claro/escuro. Os peixes receberam ração, Spirulina®, ad libitum 24 h antes dos experimentos. Ao ser finalizado os experimentos, os animais foram sacrificados por imersão em água gelada, 2-4 °C, por 10 minutos, até a perda de movimentos operculares. Seguindo de cobrimento em papel alumínio e congelados até o recolhimento pela empresa responsável (CONCEA, 2018).

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética do Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC), com protocolo nº 1806202101.

#### **4.5.2 Tratamentos iniciais**

Os testes com Zebrafish adultos foram realizados baseando-se na metodologia proposta por MAGALHÃES *et al.* (2017), na qual os animais foram selecionados aleatoriamente, transferidos para uma esponja úmida e tratados, por via oral, com as amostras testes, sendo denominado grupo veículo. Foram administrados 20 µL de cada amostra a ser testada, utilizando micro pipetas automáticas com ponteiros estéreis. Foram necessários 6 animais por amostra e concentração (n=6/grupo). Foram incluídos também um grupo de animais sem tratamento, denominado de Naive, e um grupo de animais tratados com o diluente das amostras, água destilada, denominado grupo controle negativo (COLLYMORE; RASMUSSEN; TOLWANI, 2013).

Finalizado os tratamentos, os animais foram acondicionados individualmente em copos de vidro (250 mL) contendo 150 mL de água do aquário por uma hora para devido repouso e absorção das amostras deglutidas pelo organismo do animal.

#### **4.5.3 Avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto)**

Após o período de uma hora da realização dos tratamentos iniciais, os animais foram adicionados em placas de Petri de vidro (10 x 15 cm), contendo a mesma água do aquário, marcadas com quatro quadrantes para análise da atividade locomotora através da contagem do número de cruzamento de linhas dos quadrantes (CL) pelo período de cinco minutos. Usando o valor de CL do grupo que não recebeu tratamento, Naive, como linha de base (100 % de atividade locomotora) foi calculado a porcentagem de atividade locomotora (AL%) individualmente durante cinco minutos (AHMAD; RICHARDSON, 2013).

#### **4.5.4 Toxicidade aguda (96h)**

O estudo da toxicidade aguda foi realizado conforme metodologias propostas pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (1992), na qual os animais (n=6/cada grupo) foram tratados com as mesmas concentrações que foram submetidos no teste de campo aberto, seguindo a metodologia do tratamento inicial descrita por Ahmad e Richardson (2013), e após o período de uma hora da realização dos tratamentos, os animais foram reunidos em seus respectivos grupos e deixados em repouso por 96 horas para analisar a

taxa de mortalidade. Durante o período de análise, foram realizados cuidados como limpeza e alimentação adequada dos animais. Após 96h, foram anotados o número de peixes mortos em cada grupo para determinação da concentração letal capaz de matar 50% dos animais (CL50%) por meio de testes probabilísticos com intervalo de confiança de 95% e método matemático Trimmed Spearman-Kärber.

#### ***4.5.5 Análise estatística***

Os resultados das análises foram expressos em média e desvio padrão para cada grupo de 6 animais. Após confirmação da normalidade e homoscedasticidade dos dados, os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey ao nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Statistc7®, IBM SPSS Statistics 22 versão 22.0.0.0 e com a utilização do Excel (2015) para tabulação dos dados obtidos.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na literatura científica atual, é comum deparar-se com análises físico-químicas e microbiológicas referentes ao leite fermentado Kefir e inúmeras variações na sua produção, seja na matéria-prima utilizada inicialmente para a fermentação ou na adição de componentes após a fermentação. As análises referentes aos grãos de Kefir possuem menor ocorrência. Assim, com os resultados alcançados, diversas comparações foram feitas no presente trabalho, com as bebidas e grãos, afim de caracterizar a composição microbiana e físico-química dos grãos de Kefir liofilizados.

### 5.1 Caracterização físico-química dos pós dos grãos de kefir

#### 5.1.1 Composição centesimal

Os resultados dos parâmetros físico-químicos para a composição centesimal dos grãos liofilizados GKL e GKA são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição Centesimal dos Grãos de Kefir Liofilizados.

Características	GKL	GKA
<b>Umidade (%)</b>	1,05 ± 0,23 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,26 <sup>a</sup>
<b>Cinzas (%)</b>	0,79 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,05 <sup>b</sup>
<b>Lipídeos (%)</b>	9,17 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>Proteínas (%)</b>	18,59 ± 0,65 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,09 <sup>b</sup>
<b>Carboidratos (%)</b>	70,41 ± 0,00 <sup>a</sup>	97,12 ± 0,00 <sup>b</sup>

Os resultados estão representados pela média ± desvio padrão. Média ± desvio-padrão com letras minúsculas diferentes (a e b) na mesma linha indicam que há diferença significativa pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).  
Legenda: GKL – Grãos de kefir de leite liofilizados. GKA – Grãos de kefir de água liofilizados. Fonte: elaborada pela autora.

Constatou-se uma baixa umidade para ambos os grupos: 1,05 ± 0,23 (GKL) e 1,43 ± 0,26 (GKA) %. Tal resultado é esperado, uma vez que os grãos foram submetidos ao processo de liofilização, que visa a retirada da água do produto. Segundo Kimi *et al.* (2017), o processo de liofilização resulta em produtos com umidade em torno de 2%, podendo variar de acordo

com as características do processo e matéria-prima. Valores semelhantes para o conteúdo de água foram obtidos na caracterização físico-química de produtos alimentícios liofilizados, como a umidade do pó da polpa de cajá liofilizada (OLIVEIRA; DA COSTA; AFONSO, 2014).

Os constituintes presentes em menor proporção nos grãos de leite são os lipídeos e cinzas, enquanto para os grãos de água são os lipídeos e proteínas. Como resultado temos: lipídeos com valores de  $9,17 \pm 0,00$  % (GKL) e  $0,49 \pm 0,00$  % (GKA), cinzas com valores de  $0,79 \pm 0,02$  % (GKL) e  $0,59 \pm 0,05$  % (GKA), proteínas com valores de  $18,59 \pm 0,65$  % (GKL) e  $0,37 \pm 0,09$  % (GKL). Os resultados para as cinzas indicam o baixo conteúdo de matéria inorgânica das amostras.

Para o teor proteico foram encontrados os valores:  $18,59 \pm 0,65$  (GKL) e  $0,37 \pm 0,09$  (GKA) %. O resultado indica que as proteínas são o segundo maior componente presente nas amostras de grãos de leite e o menor componente dos grãos de água. O maior componente encontrado nas amostras foram os carboidratos, com valores de  $70,41 \pm 0,00$  (GKL) e  $97,12 \pm 0,00$  (GKA) %. Os resultados condizem com os encontrado na literatura científica, uma vez que os grãos de Kefir, segundo Wang *et al.* (2022) são formados principalmente por proteínas e carboidratos, constituintes importantes da matriz dos grãos, que influenciam a estabilidade do sistema simbiótico. Além disso, segundo o mesmo autor, o Kefiran, principal polissacarídeo presente nos grãos, e proteínas são derivadas não somente da composição microbiana como também de substratos e de materiais desconhecidos.

Gökirmakli e Güzel-seydim (2022), ao analisar grãos de Kefir de água e de leite, sem nenhum tipo de tratamento, obtiveram 17,50% e 18,99% de matéria seca, respectivamente e assim como o presente trabalho obtiveram uma quantidade significativamente menor de proteínas e cinzas para os GKA, encontrando 0,79 % de cinzas para os GKL, além de maior presença de carboidratos.

Segundo Guzel-seydim (2021), em média os grãos de kefir de leite são compostos por 86 % de água e 14% de matéria seca, a qual por sua vez compreende 58% de polissacarídeos, 30% de proteína, 7% de gordura e 5% de cinzas, enquanto as composições médias dos grãos de água não são conhecidos. Ainda segundo o autor, o teor pode variar de acordo com a origem dos grãos e a composição média para os grãos de água é desconhecida. No entanto, conforme estudo de FELS *et al.* (2018), sabe-se que os exopolissacarídeos formados a partir da fermentação de sacarose possuem papel importante na formação dos grãos de Kefir de água.

Praticamente todos os parâmetros analisados apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ), excetuando-se a umidade. Esses resultados são esperados, uma vez que as amostras passaram pelo mesmo processamento de secagem, sob as mesmas condições,

atingindo parâmetros de umidade similares, partindo de uma matéria-prima com características similares quanto a umidade. Já a diferença para os demais parâmetros é justificável ao se analisar a origem dos grãos e matrizes alimentares utilizadas para a fermentação.

Embora os grãos de leite tenham vantagens em valores nutricionais, os grãos de água devem ser considerados uma fonte nutricional, uma vez que apresentam minerais, ácidos orgânicos e substâncias bioativas, a depender do substrato utilizado. O produto final produzido com grãos são afetados pelo tipo de grão, o que torna ainda mais importante estudos comparativos (GÖKIRMAKLI; GÜZEL-SEYDIM, 2022).

### 5.1.2 Parâmetros físico-químicos

Os resultados obtidos para os demais parâmetros físico-químicos propostos neste trabalho são apresentados na Tabela 2, a seguir.

Tabela 2 - Caracterização Físico-química dos Grãos de Kefir Liofilizados.

Características	GKL	GKA
<b>Aw</b>	0,29 ± 0,00 <sup>a</sup>	0,25 ± 0,00 <sup>b</sup>
<b>Sólidos solúveis (° Brix)</b>	3,17 ± 0,06 <sup>a</sup>	5,27 ± 0,06 <sup>b</sup>
<b>pH</b>	3,93 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,61 ± 0,01 <sup>b</sup>
<b>Acidez (%)</b>	11,05 ± 0,43 <sup>a</sup>	10,56 ± 0,10 <sup>b</sup>

Os resultados estão representados pela média ± desvio padrão. Média ± desvio-padrão com letras minúsculas diferentes (a e b) na mesma linha indicam que há diferença significativa pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Legenda: GKL – Grãos de kefir de leite liofilizados. GKA – Grãos de kefir de água liofilizados. Fonte: elaborada pela autora.

Os valores encontrados para a atividade de água ( $A_w$ ) foram:  $0,29 \pm 0,00$  (GKL) e  $0,25 \pm 0,00$  (GKA). Esses resultados corroboram com os encontrados por Conde-islas *et al.* (2019) ao analisar amostras de grãos de kefir liofilizados, pois obtiveram  $A_w < 0,6$  para a maioria dos experimentos realizados. Assim, os resultados estão dentro do esperado, considerando a característica própria da amostra de baixo teor de umidade e o processo de secagem pelo qual passaram, uma vez que durante processos de liofilização valores extremamente baixos para esse parâmetro são encontrados (SEARLES; ARAVAPALLI; HODGE, 2017). Podemos, então, classificar as amostras como produtos de baixa atividade de

água, uma vez que segundo Villadiego *et al.* (2012), quando  $A_w < 0,60$  é classificada como baixa,  $A_w > 0,85$  é alta e entre esses valores citados é considerado intermediária.

A análise desse parâmetro faz-se necessário para determinar a estabilidade de produtos alimentícios de uma forma geral. Pois, embora ele relacione-se com a umidade, indicará adequadamente o grau de disponibilidade da água para a ocorrência de reações químicas e bioquímicas, tendo em vista que a umidade não se baseia na água disponível no produto (VILLADIEGO *et al.*, 2012). Além disso, a  $A_w$  final de produtos probióticos ou adicionados de probióticos é um dos principais fatores para manutenção da viabilidade dos microrganismos em produtos desidratado, incluindo temperatura e oxigênio. A atividade de água com valores extremamente baixos em alguns casos também não são indicados, pois valores abaixo de 0,60 ocasionam a inibição completa do crescimento microbiano e propiciam a oxidação lipídica dos produtos (SU; ZHANG; MUJUMDAR, 2015).

Para as amostras foram encontrados pH com valores  $3,93 \pm 0,02$  (GKL) e  $3,61 \pm 0,01$  (GKA), e acidez  $11,05 \pm 0,43$  % (GKL) e  $10,56 \pm 0,10$  % (GKA) refletindo a origem ácida do processo fermentativo que originaram os grãos.

O pH do kefir de água é tipicamente abaixo de pH 4,5 sendo indicado o fim do processo de produção ao atingir pH 4,6 diminuindo mais ao passar da fermentação, devido à produção de ácido lático e ácido acético (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021).

Estudos mostram a que grãos liofilizados apresentam uma diminuição mais lenta do pH de bebidas preparadas com esses grãos, embora mantenham sua atividade por mais tempo, podendo ser atribuído a uma fase de atraso metabólica prolongada, que leva a uma lenta taxa de produção de ácido pelos grãos (WITTHUHN; CILLIERS; BRITZ, 2005).

## 5.2 Caracterização microbiológica dos pós dos grãos de kefir

Os resultados para as contagens e pesquisas microbiológicas propostas neste trabalho estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Contagem e Pesquisa de Microrganismos.

<b>Contagem de microrganismos</b>		
<b>Análise</b>	<b>GKL (UFC / g)</b>	<b>GKA (UFC / g)</b>
<b>Bactérias Ácido Lácticas</b>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x 10 <sup>4</sup>
<b>Bactérias Acéticas</b>	< 10	4,0 x 10 <sup>2</sup>
<b>Leveduras</b>	< 10	< 10
<b>Aeróbios Mesófilos</b>	2,5 x 10 <sup>6</sup>	3,0 x 10 <sup>5</sup>

<b>Pesquisa de microrganismo</b>		
<b>Análise</b>	<b>GKL (Presença / ausência)</b>	<b>GKA (Presença / ausência)</b>
<b><i>Salmonella</i> sp.</b>	Ausência	Ausência

Legenda: GKL – Grãos de kefir de leite liofilizados. GKA – Grãos de kefir de água liofilizados. Fonte: elaborada pela autora.

Para a contagem total de leveduras, obteve-se o resultado < 10 UFC/g para as amostras de leite e de água. Ao analisar a qualidade de grãos de Kefir frescos de água e de leite doados na cidade de Franca/SP, Ghedini *et al.* (2020) encontraram valores de 10<sup>6</sup> para algumas amostras, enquanto outras não apresentaram crescimento de leveduras. Esses resultados, segundo Bengoa *et al.* (2019), não condizem com o perfil microbiológico de Kefir, uma vez que eles são compostos por bactérias lácticas em simbiose com leveduras. Os padrões legais brasileiros para a bebida Kefir, Instrução normativa nº 46 que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados estipulam contagem mínima de 10<sup>4</sup> UFC/g, no entanto não há padrões legais para os grãos de Kefir, não podendo ser feita uma comparação para o atendimento de parâmetros legais (BRASIL, 2007).

A contagem total de aeróbios mesófilos teve como resultado os valores  $1,1 \times 10^5$  e  $3,0 \times 10^3$  UFC/g, para GKL e GKA respectivamente. Essa análise é utilizada como principal indicador geral da quantificação de populações microbianas em alimentos, dado que não há diferenciação de microrganismos específicos, sendo possível o crescimento daqueles que se multiplicam entre 10 e 45°C, com temperatura ideal de 30 a 35°C. Normalmente, a partir dessa análise obtém-se informações sobre a qualidade microbiológica do produto e o controle de etapas como a de produção, processamento e armazenamento, no entanto os produtos fermentados apresentam naturalmente altas contagens de mesófilos sem relação com a qualidade, evidenciando sua natureza fermentativa, além do processo fermentativo do kefir ocorrer normalmente à temperatura ambiente (AHMED *et al.*, 2020).

Ghedini *et al.* (2020) também analisaram aeróbios mesófilos, encontrando valores variando de  $10^2$  a  $10^5$  e  $10^3$  a  $10^7$  para os grãos frescos de leite e de água respectivamente, já Fusieger (2008) obteve  $7,2 \times 10^5$  UFC/g para grãos de Kefir de leite provindos da manipulação familiar.

Os valores para bactérias-ácido lácticas (BAL) foram:  $1,1 \times 10^6$  UFC/g para os grãos de leite e  $3,0 \times 10^4$  UFC/g para os grãos de água. Enquanto para bactérias-ácido acéticas (BAA) foram:  $< 10$  UFC/g para os grãos de leite e  $4,0 \times 10^2$  UFC/g para os grãos de água. A contagem dessas bactérias é de suma importância, uma vez que as principais propriedades funcionais relatadas na literatura, como a modulação da microflora, a melhora da saúde gastrointestinal, a proteção contra infecções e doenças inflamatórias intestinais, entre outros, são atribuídas a elas (MENG; ZHANG; LU, 2017; EBNER *et al.*, 2015). Para o efeito benéfico é comum que a maioria dos estudos escolham uma dose diária entre  $10^8$  e  $10^{11}$  UFC/g de bactérias ácido-láticas, refletindo doses eficazes em estudos anteriores (BINDA *et al.*, 2020).

Gamba *et al.* (2020) analisaram a bebida Kefir, obtendo  $10^8 - 10^9$  UFC/g para BAL,  $10^6$  e  $10^7$  para leveduras e BAA respectivamente. Miguel (2009), ao realizar a contagem de BAL em grãos de Kefir de três países, grãos liofilizados dos Estados Unidos e Canadá e grãos frescos do Brasil de nove estados brasileiros, obtiveram uma extensa variedade de resultados, desde a não detecção de crescimento, em amostras do estado do Rio Grande do Sul, até valores entre  $8,9 \times 10^4$  e  $2,6 \times 10^{10}$  UFC/g. Em outro trabalho, Fusieger (2008) encontrou o valor  $9,4 \times 10^6$  UFC/g para os grãos de leite fresco. Laureys *et al.* (2017) ao estudar a produção com GKA encontraram valores médios de  $7,7 \log$  UFC/g, representando crescimento em torno de  $10^7$  UFC/g. Assim, os resultados encontrados estão dentro do esperado quando comparando com outros trabalhos científicos.

Quando comparado com parâmetros legais, utilizando como referência o regulamento brasileiro destinado à bebida fermentada Kefir, já que não há parâmetro legal para os grãos, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece a contagem de bactérias lácticas totais mínima de  $10^7$  UFC/g (BRASIL, 2007).

Grãos de diferentes origens geográficas são relatadas na literatura científica com composição microbiana diversificada, mesmo regiões de um mesmo país, como no estudo de seis grãos de kefir de leite de diferentes origens e de cinco regiões italianas diferentes (GAROFALO *et al.*, 2015), ou de grãos de kefir tibetano coletados de cinco condados da região de Naqu, Tibete, China (GAO; ZHANG, 2019) nos quais foram observados contagens microbianas significativamente diferentes, indicando a forte influência da origem geográfica dos grãos em sua microbiota. Corroborando com o exposto acima, GUZEL-SEYDIM, GÖKIRMAKLI, GREENE (2021) afirmam que a microbiologia dos grãos de kefir depende de sua origem, cuidados na manutenção da cultura e procedimentos de crescimento. Assim, a variação encontrada pode ser uma forte consequência da produção artesanal de kefir em Fortaleza/CE, alterando as características e ocasionando a variação da composição, incluído seu nível populacional microbiano.

Uma outra característica importante a ser considerada ao analisar os resultados obtidos é o processo pelo qual os grãos foram submetidos. Na literatura encontramos que o processo de liofilização é um dos métodos de secagem que mantem as principais características dos produtos, sendo utilizadas inclusive para a guarda de cepas iniciadoras de processos fermentativos industriais, no entanto todos os parâmetros do processo devem ser avaliados de acordo com os produtos específicos, avaliando as propriedades características das amostras (NOWAK; JAKUBCZYK, 2020).

Existem assim, condições críticas de tratamento que podem causar a perda da capacidade de recriar a matriz de grãos de kefir devido à condições ambientais que as células experimentam durante a liofilização podendo danificar sua estrutura e fisiologia seguida de diminuição de sua viabilidade (KOLAKOWSKI; OZIMKIEWICZ, 2012). Ao estudar parâmetros do processo de liofilização para grão de Kefir mexicanos, por exemplo, Conde-islas *et al.*(2019), encontraram como melhores parâmetros um tempo de congelamento de 3 h, uma temperatura de congelamento de  $-20^{\circ}$  C, uma pressão de 0,6 mbar e um tempo de liofilização de 15 h, para a obtenção de um produto com umidade residual abaixo de 6%, atividade de água abaixo de 0,2 e uma boa sobrevivência de bactérias lácticas, acima de 8,5 log UFC/g. Tais

parâmetros de processo divergiram quanto aos realizados neste trabalho, principalmente pelo tempo de liofilização.

Além dos pontos citados, os microrganismos presentes nestes grãos podem ter sido danificados ou inativos durante o transporte e/ou algumas espécies presentes podem ser incultiváveis no meio de cultura utilizado. É possível que as condições de estresse ambiental aplicadas durante o transporte dos grãos possam ter impactado a estrutura populacional levando a alterações nos números microbianos.

A pesquisa de *Salmonella* sp. teve como resultado a ausência dessa bactéria, resultado esse esperado. As análises de patógenos possuem como objetivo a verificação da segurança do produto com foco na qualidade higiênico-sanitária. Segundo Soemarie, Milanda e Barliana (2021), os alimentos fermentados contêm naturalmente compostos com a capacidade de inibir organismos deteriorantes e patogênicos que possam estar presentes. Os grãos foram amplamente estudados quanto a esses microrganismos, encontrando ausência em diversas análises de patógenos (JÚNIOR *et al.*, 2020), apresentando resultados positivos esperados.

### **5.3 Avaliação da segurança não clínica**

A seguir são apresentados os resultados encontrados para as análises da atividade locomotora e toxicidade aguda frente ao Zebrafish (*Danio rerio*).

#### **5.3.1 Avaliação da atividade locomotora (teste de campo aberto)**

A crescente utilização de *D. rerio* como modelo animal deve-se à comprovação, por diversos trabalhos, da utilidade do Zebrafish como uma forma adequada, rápida e econômica para testes *in vivo*, uma vez que a fisiologia do animal é bem estabelecida, possuindo componentes celulares necessários para responder aos estímulos ambientais físicos e químicos, principalmente por seu genótipo apresentar 70% de homologia nos receptores de neurotransmissores para mamíferos, além dos padrões semelhantes de colonização da microbiota intestinal (TAYLOR *et al.*, 2017; LEMOS *et al.*, 2020).

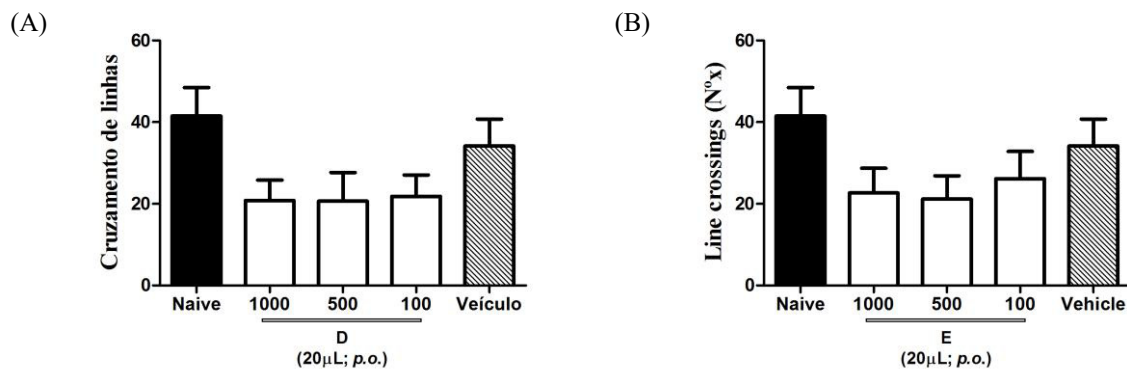
A avaliação da atividade locomotora (Teste de Campo Aberto) foi realizada para avaliar a alteração ou não da coordenação locomotora dos peixes, a capacidade natatória, seja por manifestações comportamentais sugestivas de ansiedade e/ou estresse, ou seja por sedação e/ou relaxamento muscular, representando ações ansiolítica ou ansiogênica após a ingestão de uma substância (SIREENI *et al.*, 2020).



As formulações testadas para ambos os grupos de grãos foram: 1000, 500 e 100 ppm. Como resultado da análise, observou-se que nenhuma das amostras ocasionaram comprometimento locomotor ou efeito sedativo nos animais, uma vez que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quanto a atividade locomotora entre os grupos de amostra, bem como em relação aos controles, naive e veículo.

Os resultados da contagem de cruzamento de linhas são apresentados a seguir na Figura 2.

Figura 2 - Efeito das amostras na atividade locomotora do Zebrafish (*Danio rerio*) no Teste de Campo Aberto.



Legenda: (A)- cruzamento de linhas referente às amostras (GKA) nas concentrações 1000, 500 e 100 ppm. (B)- cruzamento de linhas referente às amostras (GKL) nas concentrações 1000, 500 e 100 ppm. Naive - animais não tratados. v.o. – administração via oral. Veículo – água destilada estéril (20  $\mu$ L; v.o.). Os valores representam a média  $\pm$  desvio padrão da média para 6 animais/grupo. ANOVA seguida de Tukey. Fonte: elaborado pela autora.

Além dos benefícios já relatados na literatura, dos probióticos sobre a saúde humana, principalmente sobre o sistema digestivo, há evidências das interações entre a microbiota intestinal e o sistema nervoso central, evidenciando que os probióticos podem ter efeitos psicotrópicos. Estudos realizados em animais sugerem que os probióticos podem ajudar a reduzir a ansiedade, porém tais descobertas ainda não se traduziram em grandes quantidades de pesquisas clínicas em humanos, possuindo diversas conclusões divergentes (REIS; ILARDI; PUNT, 2018).

Embora elevadas contagens microbianas tenham sido encontradas no presente trabalho, não foi observado o efeito ansiolítico das amostras. Resultado este diferente do encontrado por Davis *et al.* (2016), que observaram reduções significativas no comportamento relacionado à ansiedade, ao suplementar o Zebrafish com *Lactobacillus plantarum*. Para o presente trabalho, foram utilizadas as concentrações 1000, 500 e 100 ppm, sendo necessário a avaliação de concentrações maiores em futuros estudos.

### 5.3.2 Toxicidade aguda (96h)

Para a aprovação e registro de ingredientes alimentícios e aditivos, faz-se necessário a análise de parâmetros toxicológicos para avaliar os efeitos saúde humana. Com o intuito de modernizar e acelerar esses processos, o modelo Zebrafish tornou-se uma melhor ferramenta, quando comparado a outros métodos, como os que se utilizam de roedores, avaliando de forma rápida e econômica a segurança dos novos produtos (BAILONE *et al.*, 2019).

O número de animais mortos para cada tratamento é mostrado na Tabela 4 a seguir. É possível perceber que para todas as amostras e concentrações do estudo não foi registrado nenhuma mortalidade após as 96h, obtendo-se valores  $CL_{50} > 1$  mg/mL para todas as amostras. Assim, as amostras indicam ser seguras para o consumo humano, não apresentando toxicidade capaz de comprometer a saúde humana.

Tabela 4 - Resultados dos testes de toxicidade aguda das amostras frente ao zebrafish adulto.

Amostra	Mortalidades do Zebrafish Adulto				96h
	CN	C1	C2	C3	$CL_{50}$ (mg/mL) / IV
GKA	0	0	0	0	> 1 mg/mL
GKL	0	0	0	0	> 1 mg/mL

Legenda: CN – grupo controle negativo: água destilada estéril; C1 – grupo concentração 1: 1 mg/mL; C2 – grupo concentração 2: 0,5 mg/mL; C3 – grupo concentração 3: 0,1 mg/mL;  $CL_{50}$  – concentração letal para matar 50% dos Zebrafish adultos; IV – intervalo de confiança; Fonte: elaborado pela autora.

## 6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos no presente estudo indicaram que os grãos de kefir de leite e de água liofilizados são dois grãos que possuem diferenças significativas quanto a sua caracterização físico-química. Foi encontrado um menor teor percentual de proteínas para os grãos GKA do que para os GKL e ambos apresentaram carboidratos como componentes majoritários.

Os resultados mostraram ainda uma composição similar ao relatado em outros trabalhos e esperado para as amostras com relação à presença de bactérias lácticas, embora tenha ocorrido divergências na presença de leveduras e bactérias acéticas. Isso indica que os repasses contínuos dos grãos de Kefir alteram a sua composição original, podendo ainda ser influenciada por fatores como o método de produção do Kefir, a origem dos grãos e o método de identificação microbiana, favorecendo a redução de microrganismos característicos. Não houve a ocorrência de patógenos, representando a ausência de riscos à saúde dos consumidores.

A avaliação da segurança não clínica indicou que as amostras são consideradas seguras, pois não alteraram o sistema locomotor e não foram tóxicos frente ao Zebrafish adulto até 96 h de análise. Assim, os pós obtidos podem significar uma nova forma de consumo ou utilização em formulações de produtos alimentícios diversos.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, Farooq; RICHARDSON, Michael K. Exploratory behaviour in the open field test adapted for larval zebrafish: Impact of environmental complexity. **Behavioural Processes**, [s. l.], v. 92, p. 88–98, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.10.014>
- AHMED, T. *et al.* Microbiological quality analysis of different types of popular dried food items. **Food Research**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 1297–1302, 2020. Disponível em: [https://doi.org/10.26656/FR.2017.4\(4\).080](https://doi.org/10.26656/FR.2017.4(4).080)
- ALSAYADI, Muneer *et al.* Evaluation of Anti-Hyperglycemic and Anti-Hyperlipidemic Activities of Water Kefir as Probiotic on Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Journal of Diabetes Mellitus**, [s. l.], v. 04, n. 02, p. 85–95, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/jdm.2014.42015>
- AZIZI, Nor Farahin *et al.* Kefir and its biological activities. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1–26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10061210>
- BAILONE, Ricardo Lacava *et al.* “Zebrafish as an animal model for food safety research: trends in the animal research”. **Food Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 283–302, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/08905436.2019.1673173>
- BALOGH, Tímea; KŐSZEGI, Irén; HOYK, Edit. The market of functional foods. **Gradus**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 161–166, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.47833/2020.2.AGR.031>
- BELL, Victoria *et al.* One health, fermented foods, and gut microbiota. **Foods**, [s. l.], v. 7, n. 12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods7120195>
- BENGOA, A. A. *et al.* Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 126, n. 3, p. 686–700, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- BENSMIRA, Meriem; JIANG, Bo. Total phenolic compounds and antioxidant activity of a novel peanut based kefir. **Food Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 1055–1060, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0135-7>
- BINDA, Sylvie *et al.* Criteria to Qualify Microorganisms as “Probiotic” in Foods and Dietary Supplements. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 11, n. July, p. 1–9, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01662>
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC N° 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. [s. l.], v. 7, n. 2, p. 44–68, 2018.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007**. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Brasília, DF: Diário Oficial da União, Seção 1, 2007.
- BRASIL, Girlandia Alexandre *et al.* The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. **Nutrition**, [s. l.], v. 51–52, n. 2018, p. 66–72, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.12.007>

COLLYMORE, Chereen; RASMUSSEN, Skye; TOLWANI, Ravi J. Gavaging Adult Zebrafish. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 78, p. 1–5, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/50691>

CONCEA-CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO; ANIMAL. **Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018**. O Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA informa que foi publicada, no Diário Oficial da União (22/02/2018), seção I, a Resolução Normativa nº 37, de 15 de fevereiro de 2018, que baixa a nova Diretriz da Prática de Eutanásia do Concea e revoga a Resolução Normativa nº 13, de 20 de setembro de 2013. **Diretriz da prática de eutanásia**, [S. l.: s. n.], 2018. p. 49. Disponível em: [https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes\\_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia\\_site-concea.pdf](https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf)

CONDE-ISLAS, Alicia águeda *et al.* Effect of the freeze-drying process on the physicochemical and microbiological properties of Mexican kefir grains. **Processes**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pr7030127>

DAVIS, Daniel J. *et al.* Lactobacillus plantarum attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, n. September, p. 1–11, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep33726>

DONG, Jian *et al.* The biofilm hypothesis: The formation mechanism of Tibetan kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 71, n. March, p. 44–50, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12473>

EBNER, Jennifer *et al.* Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. **Journal of Proteomics**, [s. l.], v. 117, p. 41–57, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.005>  
FARAG, Mohamed A *et al.* The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products : **Nutrients**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 1–23, 2020.

FELS, Lea *et al.* Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 189, n. February, p. 296–303, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>

FUSIEGER, Andressa. AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE KEFIR ARTESANAL. In: , 2008. **2º Simpósio de Agronomia e Tecnologia em Alimentos**. [S. l.: s. n.], 2008.

GAMBA, Raúl Ricardo *et al.* Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. **International Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 2020, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2020/7019286>

GAO, Wei; ZHANG, Lanwei. Comparative analysis of the microbial community composition between Tibetan kefir grains and milks. **Food Research International**, [s. l.], v. 116, n. September 2018, p. 137–144, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.056>

GAROFALO, Cristiana *et al.* Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 123–133, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.01.017>

GHEDINI, Tamara Gomes Machado *et al.* Qualidade microbiológica do kefir. **Brazilian Journal of Development**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 4336–4349, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv6n1-309>

GILLE, Doreen *et al.* Fermented food and non-communicable chronic diseases: A review. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu10040448>

GÖKIRMAKLI, Çağlar; GÜZEL-SEYDİM, Zeynep B. Water kefir grains vs. milk kefir grains: Physical, microbial and chemical comparison. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 132, n. 6, p. 4349–4358, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.15532>

GRANATO, Daniel *et al.* Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. [s. l.], p. 1–26, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051708>

GRANATO, Daniel *et al.* Functional Foods: Product Development, Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety. [s. l.], p. 1–26, 2019b.

GUZEL-SEYDİM, Zeynep B.; GÖKIRMAKLI, Çağlar; GREENE, Annel K. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 113, n. March, p. 42–53, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físicos-químicos para análise de Alimentos**. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008. *E-book*.

JÚNIOR, Sebastião Moreira *et al.* Avaliação microbiológica de kefir e efeito antagônico de seus isolados frente a patógenos e deterioradores. **Alimentos: Ciência, Tecnologia e Meio Ambiente**, [s. l.], v. 1, n. 5, p. 133–153, 2020.

KESENKAŞ, H.; GÜRSOY, O.; ÖZBAŞ, H. Kefir. **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**, [s. l.], p. 339–361, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00014-5>

KIM, Binna *et al.* A review of fermented foods with beneficial effects on brain and cognitive function. **Preventive Nutrition and Food Science**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 297–309, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3746/pnf.2016.21.4.297>

KIM, Dong Hyeon *et al.* Development of a novel selective medium for the isolation and enumeration of acetic acid bacteria from various foods. **Food Control**, [s. l.], v. 106, n. March, p. 106717, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106717>

KIMI, Shana *et al.* Liofilização de produtos lácteos: Uma revisão Freeze-drying of dairy products: A review. **Pág**, [s. l.], v. 38, 2017.

KOLAKOWSKI, Piotr; OZIMKIEWICZ, Magdalena. Restoration of kefir grains subjected to

different treatments. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 140–145, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2011.00746.x>

LAUREYS, David *et al.* Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 101, n. 7, p. 2811–2819, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>

LEMOS, Cecília Guimarães *et al.* Avaliação da atividade locomotora e teste de toxicidade do eugenol utilizando zebrafish ( danio rerio ) adulto . Obtenção do eugenol Zebrafish Avaliação da Atividade locomotora. [s. l.], p. 67–70, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.24979/ambiente.v1i1.931>

MAGALHÃES, Francisco Ernani Alves *et al.* Adult Zebrafish ( Danio rerio ): An Alternative Behavioral Model of Formalin-Induced Nociception. **Zebrafish**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 422–429, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1436>

MARCO, Maria L. *et al.* Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 44, p. 94–102, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.11.010>

MENG, Jun; ZHANG, Qiu Xiang; LU, Rong Rong. Surface layer protein from *Lactobacillus acidophilus* NCFM inhibit intestinal pathogen-induced apoptosis in HT-29 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 96, p. 766–774, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.085>

MIGUEL, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo. **Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades**. 71 f. 2009. - Universidade Federal de Lavras (UFLA), [s. l.], 2009. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2430>

MORGAN, C. A. *et al.* Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 183–193, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>

NAZIR, Misbah *et al.* Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 88, n. July 2018, p. 513–526, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.04.011>

NEFFE-SKOCI, Katarzyna; RZEPKOWSKA, Anna; SZYDŁOWSKA, Aleksandra. Trends and Possibilities of Probiotics in Food Production. [s. l.], p. 65–94, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811446-9/00003-4>

NIELSEN, Barbara; GÜRAKAN, G. Candan; ÜNLÜ, Gülhan. Kefir: A Multifaceted Fermented Dairy Product. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, [s. l.], v. 6, n. 3–4, p. 123–135, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9168-0>

NOWAK, Dorota; JAKUBCZYK, Ewa. The freeze-drying of foods ⇔ the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. **Foods**, [s. l.], v. 9, n. 10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9101488>  
OECD. Fish, Acute Toxicity Test. **Oecd**, [s. l.], n. July, p. 1–9, 1992.

- OLIVEIRA, Gleison S.; DA COSTA, José M.C.; AFONSO, Marcos R.A. Characterization and hygroscopic behavior of lyophilized yellow mombin in pulp powder. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, [s. l.], v. 18, n. 10, p. 1059–1064, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v18n10p1059-1064>
- PENDÓN, María Dolores *et al.* Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], n. November, p. 1–19, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.15385>
- PLESSAS, Stavros *et al.* Microbiological exploration of different types of Kefir grains. **Fermentation**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 1–10, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation3010001>
- POLO, L. *et al.* Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. **Journal of Applied Microbiology**, [s. l.], v. 122, n. 6, p. 1603–1614, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13465>
- PRADO, Maria R. *et al.* Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. OCT, p. 1–10, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01177>
- REIS, Daniel J.; ILARDI, Stephen S.; PUNT, Stephanie E.W. The anxiolytic effect of probiotics: A systematic review and meta-analysis of the clinical and preclinical literature. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–25, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199041>
- SEARLES, James A.; ARAVAPALLI, Sridhar; HODGE, Cody. Effects of Chamber Pressure and Partial Pressure of Water Vapor on Secondary Drying in Lyophilization. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 2808–2813, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1208/s12249-017-0768-3>
- SIREENI, Jenni *et al.* Profound effects of glucocorticoid resistance on anxiety-related behavior in zebrafish adults but not in larvae. **General and Comparative Endocrinology**, [s. l.], v. 292, n. March, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2020.113461>
- SOEMARIE, YulistiaBudianti; MILANDA, Tiana; BARLIANA, MelisaIntan. Fermented foods as probiotics: A review. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 335, 2021. Disponível em: [https://doi.org/10.4103/japtr.japtr\\_116\\_21](https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_116_21)
- STRINGHETA, Paulo César *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s. l.], v. 43, n. 2, p. 181–194, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1516-93322007000200004>
- SU, Ya; ZHANG, Min; MUJUMDAR, Arun S. Recent Developments in Smart Drying Technology. **Drying Technology**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 260–276, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.985382>
- TAYLOR, J. Christopher *et al.* A novel zebrafish-based model of nociception. **Physiology &**



**Behavior**, [s. l.], v. 174, p. 83–88, 2017. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.009>

TISS, Mohamed *et al.* Fermented soy milk prepared using kefir grains prevents and ameliorates obesity, type 2 diabetes, hyperlipidemia and Liver-Kidney toxicities in HFFD-rats. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 67, n. December 2017, p. 103869, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103869>

VERLHAC, Pierre *et al.* Experimental study and optimization of freeze-drying cycles of a model Casei type probiotic bacteria. **Drying Technology**, [s. l.], v. 38, n. 16, p. 2120–2133, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07373937.2019.1683859>

VIANA, Roberta Oliveira *et al.* Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: microbiological, chemical and sensory analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 592–601, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.11.006>  
 VILLADIEGO, Alba Manuela Durango *et al.* **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2.ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012.

VINDEROLA, Gabriel *et al.* Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, [s. l.], v. 36, n. 5–6, p. 254–260, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2007.01.003>

VOIDAROU, Chrysa *et al.* Fermentative foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues. **Foods**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 1–27, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10010069>

WANG, Hao *et al.* Differences in Protein Profiles of Kefir Grains from Different Origins When Subcultured in Goat Milk. [s. l.], 2022. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c01391>

WITTHUHN, R. Corli; CILLIERS, Annamie; BRITZ, Trevor J. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential of Kefir grains. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 125–128, 2005. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1017/S0022029904000652>

YADAV, Manoj Kumar *et al.* Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 106, n. 2, p. 505–521, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8>

YE, Qianyu; GEORGES, Nicolas; SELOMULYA, Cordelia. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 78, p. 167–179, 2018. Disponível em:  
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>