

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
MESTRADO PROFISSIONAL EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DO LEITE E
DERIVADOS**

Tatiana Pires Rocha

Desenvolvimento de kefir adicionado de luteína

Juiz de Fora
2023

Tatiana Pires Rocha

Desenvolvimento de kefir adicionado de luteína

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

Orientador: Dr. Junio César Jacinto de Paula

Coorientadores: Dr. Paulo Henrique Costa Paiva

Dra. Denise Sobral

Juiz de Fora

2023

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

Rocha, Tatiana Pires.

Desenvolvimento de kefir adicionado de luteína / Tatiana Pires Rocha. – 2023.

73 p.

Orientador: Junio César Jacinto de Paula

Coorientadores: Paulo Henrique Costa Paiva, Denise Sobral
Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados, 2023.

1. Tecnologia de bebida láctea fermentada . 2. Leite fermentado.
3. Probiótico. 4. Corante bioativo. 5. Atividade antioxidante . I. Paula, Junio César Jacinto de, orient. II. Paiva, Paulo Henrique Costa , coorient. III. Sobral, Denise, coorient. IV. Título.

Tatiana Pires Rocha

Desenvolvimento de kefir adicionado de luteína

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

Aprovada em 09 de novembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Junio César Jacinto de Paula - Orientador

EPAMIG/ILCT

Profa. Dra. Denise Sobral - Coorientadora

EPAMIG/ILCT

Profa. Dra. Renata Golin Bueno Costa

EPAMIG/ILCT

Profa. Dra. Alessandra Pereira Sant'Anna Salimena

EPAMIG/ILCT

Juiz de Fora, 26/10/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Junio Cesar J. de Paula, Usuário Externo**, em 10/11/2023, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Golin Bueno Costa, Usuário Externo**, em 10/11/2023, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Denise Sobral, Usuário Externo**, em 10/11/2023, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra Pereira Sant Anna Salimena, Usuário Externo**, em 13/11/2023, às 16:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1548176** e o código CRC **E6847246**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em minha vida, me iluminando e concedendo saúde e sabedoria para trilhar novos caminhos em busca dos meus sonhos.

A minha mãe, pela educação, amor incondicional e pelo exemplo de mulher guerreira e batalhadora. Ao meu esposo pelo companheirismo, amor e apoio. Ao meu pai, irmão e sobrinha que mesmo distantes estão presentes em minha vida.

Ao meu orientador, professor e pesquisador Dr. Junio César Jacinto de Paula por ter acreditado em mim, pelo comprometimento, paciência e orientação na execução de todo o projeto da pesquisa, o tornando possível.

Ao meu coorientador, professor Dr. Paulo Henrique Costa Paiva, por todo tempo dedicado a me orientar, ajudar e apoiar durante todo o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Dr. Paulo Henrique Fonseca da Silva que mesmo sem me conhecer, me estendeu as mãos e me orientou na execução do projeto inicial para ingresso no mestrado.

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

À EPAMIG ILCT pela utilização das instalações industriais, laboratoriais, equipamentos, aos professores e em especial ao funcionário Sebastião Afonso Filho pela brilhante e imprescindível ajuda na execução do projeto. Ao professor Dr. Felipe Alves de Almeida pela orientação em toda parte microbiológica e à aluna bolsista BDCTI Marissa Cancelli pelo auxílio nas análises microbiológicas. À professora Dra. Gisela de Magalhães Machado Moreira e todas as alunas bolsistas que ajudaram na execução das análises físico-químicas.

À Dra. Ana Flávia Coelho Pacheco e sua irmã Flaviana Coelho Pacheco que se propuseram a me ajudar com às análises de antioxidante e não mediram esforços nos vários desafios que enfrentamos ao longo dessas análises.

Às colegas bolsistas BDCTI, Juliene Duarte e Tatiane Tavares por caminharem comigo na busca do meu sonho, me incentivando e ajudando na execução do projeto.

À bolsista BDCTI Letícia Scafutto, pela realização das análises estatísticas do projeto.

Aos professores Dr. Fernando Antônio Resplande Magalhães e Dra. Denise Sobral pelo apoio ao projeto e participação na banca de qualificação.

Aos professores Dra. Renata Golin Bueno Costa, Dra. Alessandra Pereira Sant Anna Salimena, Dra. Denise Sobral, Dr. Felipe Alves de Almeida e Dr. Luiz Carlos G. Costa Jr. pela participação na banca de defesa.

A todos os colegas que fiz ao longo da minha trajetória e que tornaram a caminhada mais leve. E todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que este projeto se tornasse realidade.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro ao projeto.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

A luteína, corante natural lipofílico amarelo-laranja é um carotenoide com capacidade antioxidante e que tem sido especialmente associada à diminuição da ocorrência de catarata e degeneração macular relacionada à idade. Além disso, a luteína também pode ser um importante aliado na redução do estresse oxidativo e danos ao DNA, contribuindo para a prevenção de diversos tipos de câncer. Como a luteína não é sintetizada pelo organismo humano, é necessário que seja suprida por meio da alimentação. Para atingir a ingestão mínima de 6 mg/dia de luteína, seria necessário o consumo de 2 tigelas de espinafre ou uma tigela de salada de couve por dia, o que torna um hábito praticamente impossível para a maioria das pessoas. A aplicação da luteína como ingrediente funcional em derivados lácteos é uma opção atrativa, para disponibilizar a luteína de uma forma saborosa e também ser uma opção para aqueles que buscam por alimentos com ingredientes naturais e mais saudáveis. O kefir se destaca como alimento natural, com boa qualidade nutricional e por promover benefícios à saúde. Devido à presença de proteínas e lipídeos em sua composição, torna-se interessante a adição de luteína ao kefir, uma vez que estas biomoléculas são excelentes carreadores de compostos hidrofóbicos. O objetivo deste estudo foi desenvolver um kefir adicionado de luteína e avaliar o aspecto oxidativo deste corante bioativo ao longo do período de armazenamento. Na fabricação do kefir, leite pasteurizado foi adicionado de sacarose, luteína e fermento. Após o processo fermentativo realizou-se a quebra da coalhada e envase. O kefir apresentou composição de 3,13% de proteína, 2,78% de gordura, 82,20% de umidade, 17,80% de EST e 0,71% de RMF. O pH do produto variou entre 4,32 e 4,35 e a acidez titulável variou entre 0,81 a 0,99 g de ácido láctico por 100 mL, atendendo o parâmetro de acidez determinado pela legislação vigente. A análise instrumental de cor indicou que o kefir apresenta cor clara e devido aos valores positivos iniciais encontrados para as coordenadas cromáticas a^* e b^* , a cor se aproximou mais do eixo da cromaticidade vermelha e amarela, respectivamente. A luteína não interferiu na capacidade de retenção de água do kefir. Houve uma diminuição da viscosidade aparente e aumento não linear da tensão de cisalhamento, de ambos os kefir. A adição de luteína ao kefir aumentou significativamente ($p < 0,05$) o teor de compostos fenólicos totais, porém estes foram reduzindo ao longo do tempo de armazenamento. Em relação à capacidade antioxidante *in vitro* a adição de luteína também aumentou

significativamente ($p < 0,05$) a atividade antioxidante das amostras de kefir, independentemente do método usado (radical ABTS ou DPPH), com reduções ao longo da vida de prateleira. Quanto à qualidade microbiológica, nenhuma das amostras de kefir apresentaram contagens de coliformes a 30 ou 45 °C, atendendo aos critérios estabelecidos pela legislação. A contagem de fungos filamentosos não atendeu o padrão mínimo de 10^4 UFC/g. A contagem de bactérias lácticas inicial foi da ordem de 10^7 UFC/g atendendo a legislação, porém não permaneceu viável ao longo do período de estocagem. O kefir adicionado de luteína apresentou boa aceitação sensorial durante o período de armazenamento, com média geral de aceitação de 6,44 na escala hedônica de nove pontos. Portanto, os resultados encontrados neste estudo são promissores e encorajam novas investigações visando a obtenção e utilização de luteína como ingrediente antioxidante na indústria de alimentos.

Palavras-chave: probiótico; carotenoide; antioxidante; saúde; tecnologia.

ABSTRACT

Lutein, a natural lipophilic yellow-orange dye, is a carotenoid with antioxidant capabilities and has been specifically linked to a reduced occurrence of cataracts and age-related macular degeneration. Furthermore, lutein can also be a significant ally in reducing oxidative stress and DNA damage, contributing to the prevention of various types of cancer. As lutein is not synthesized by the human body, it has to be supplied through food. To reach the minimum intake of 6 mg/day of lutein, you would need to eat 2 bowls of spinach or a bowl of kale salad a day, which makes it practically impossible for most people. The application of lutein as a functional ingredient in dairy products is an attractive option, to make lutein available in a tasty way and also be an option for those looking for foods with natural and healthier ingredients. Kefir stands out as a natural food with good nutritional quality and health benefits. Due to the presence of proteins and lipids in its composition, the addition of lutein to kefir becomes interesting since these biomolecules are excellent carriers of hydrophobic compounds. The aim of this study was to develop kefir with added lutein and evaluate the oxidative aspect of this bioactive dye over the storage period. In the production of kefir, pasteurized milk was supplemented with sucrose, lutein and yeast. After the fermentation process, curd breaking was carried out, and the product was packaged. The kefir had a composition of 3.13% protein, 2.78% fat, 82.20% moisture, 17.80% total solids, and 0.71% fat-free dry matter. The product's pH ranged between 4.32 and 4.35, and the titratable acidity varied between 0.81 to 0.99 g of lactic acid per 100 mL, meeting the acidity parameter determined by current regulations. The instrumental color analysis indicated that the kefir had a light color, and due to the initial positive values found for the chromatic coordinates a^* and b^* , the color approached the red and yellow chromaticity axes, respectively. Lutein did not interfere with the drink's water retention capacity. There was a decrease in apparent viscosity and a non-linear increase in shear stress, of both kefir. The addition of lutein to kefir significantly increased ($p > 0.05$) the total phenolic compound content, but these decreased over the storage period. Regarding in vitro antioxidant capacity, the addition of lutein also significantly increased ($p > 0.05$) the kefir samples's antioxidant activity, regardless of the method used (ABTS or DPPH radicals), with reductions over the shelf life. As for microbiological quality, none of the kefir samples showed coliform counts at 30 or 45 °C, meeting the criteria established by regulations. The count of filamentous fungi

did not meet the minimum standard of 10^4 CFU/g. The initial count of lactic bacteria was around 10^7 CFU/g, complying with regulations, but they were not viable over the storage period. The kefir with added lutein showed good sensory acceptance during the storage period, with an overall acceptance score of 6.44 on the nine-point hedonic scale. Therefore, the results of this study are promising and encourage further investigations for obtaining and using lutein as an antioxidant ingredient in the food industry.

Keywords: probiotic; carotenoid; antioxidant; health; technology.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1	ASPECTOS ECONÔMICOS E NUTRICIONAIS DO LEITE.....	17
3.2	LEGISLAÇÃO DE LEITE FERMENTADO.....	18
3.3	KEFIR.....	19
3.4	PROBIÓTICOS.....	21
3.5	ANTIOXIDANTES.....	23
3.6	CAROTENOIDES.....	24
3.7	LUTEÍNA.....	25
4	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO.....	29
4.2	ELABORAÇÃO DA BEBIDA À BASE DE KEFIR.....	29
4.2.1	Cálculo da dose de luteína a ser utilizada	30
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	33
4.4	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	35
4.5	ANÁLISE DE COR.....	35
4.6	CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA).....	36
4.7	PROPRIEDADES REOLÓGICAS.....	37
4.8	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	37
4.8.1	Compostos fenólicos totais	37
4.8.2	Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	38
4.9	ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	39
4.10	ANÁLISE SENSORIAL.....	40
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO KEFIR.....	42

5.2	pH E ACIDEZ TITULÁVEL.....	43
5.3	ANÁLISE DE COR.....	44
5.4	CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA).....	48
5.5	PROPRIEDADES REOLÓGICAS.....	50
5.6	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i>	55
5.7	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA.....	57
5.8	ANÁLISE SENSORIAL.....	60
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de leite, figurando entre os cinco maiores do mundo. Nas últimas pesquisas está ocupando o terceiro lugar com soma total de 35 bilhões de litros/ano (EMBRAPA, 2023). E é responsável pela produção de diversos derivados lácteos. Dentre eles, o kefir, que é definido pela legislação brasileira como leite fermentado viscoso e ligeiramente carbonatado, com sabor ácido e com pequenas quantidades de álcool (BRASIL, 2007).

Alguns autores têm relatado que o consumo regular de kefir está associado a benefícios na saúde como: redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, proteção contra microrganismos patogênicos, balanço da microbiota intestinal, atividade anticarcinogênica, regeneração hepática, efeito hipocolesterolêmico, controles da glicose plasmática, hipertensão e peso, atividades antioxidantes e antialérgicas, redução nos depósitos de lipídios vasculares, entre outros (DERTLI; ÇON, 2017; FARNWORTH, 2005; GONZÁLEZ-OROZCO *et al.*, 2022; GUZEL-SEYDIN *et al.*, 2021; HATMAL *et al.*, 2018; IRMÃO; COSTA, 2018; LEBLANC *et al.*, 2007; PRAZNIKAR *et al.*, 2020; RIBEIRO *et al.*, 2020; SHARIFI *et al.*, 2017; TUREK; WSZOTEK, 2022).

O leite utilizado na fabricação do kefir é constituído de uma série de componentes, como: água, lipídeos, carboidratos, proteínas e nutrientes (CRUZ *et al.*, 2015). A membrana do glóbulo de gordura do leite contém várias moléculas, entre elas os hidrocarbonetos, sendo representados de forma mais significativa pelos carotenoides (NÖRNBERG *et al.*, 2022).

A luteína, corante natural lipofílico amarelo-laranja, é um carotenoide da classe das xantofilas com atividades antioxidante e anti-inflamatória principalmente relacionada à redução do risco de doenças oculares relativas à idade, tais como degeneração macular e catarata (STRINGHETA *et al.*, 2006). É geralmente encontrada em vários vegetais folhosos (espinafre e couve), frutas (caqui, manga e melancia) e gema de ovo. Como não é sintetizada pelo organismo, é obtida a partir da ingestão de suas fontes alimentares (ROBERTS; GREEN; LEWIS, 2009; RODÍC *et al.*, 2012).

Neste contexto, a luteína é um corante natural que vem sendo usado pelas indústrias de alimentos e farmacêutica por apresentar ação antioxidante, substituindo os corantes artificiais maléficos à saúde e agregando valor nutricional ao produto

(BUSCEMI *et al.*, 2018). Assim, evitando a ação deletéria dos radicais livres sobre as células, os quais favorecem o envelhecimento celular, danos ao DNA e o aparecimento de doenças como câncer. Além da função protetora dos olhos, a luteína atua também contra o desenvolvimento de doenças crônicas e como agente estimulador do sistema imune (BATISTA, 2022).

Como a luteína é uma molécula hidrofóbica, é capaz de interagir com os glóbulos de gordura e as proteínas do leite. Conseqüentemente, a aplicação da luteína como suplementação em leite pode ser uma alternativa viável, com a gordura ou as proteínas, possivelmente, constituindo uma estrutura protetora e carreadora da luteína, aumentando a solubilidade e disponibilidade desta molécula bioativa (TEIXEIRA, 2022).

Atualmente, os consumidores estão muito mais informados e exigentes, buscando alimentos com ingredientes naturais e mais saudáveis. As indústrias alimentícias cada vez mais procuram inovar para acompanhar as tendências de mercado e ganhar novos consumidores (MORETTI *et al.*, 2022).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante da luteína adicionada ao kefir durante o período de armazenamento, visando o desenvolvimento de uma bebida que possa ter características funcionais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade antioxidante da luteína adicionada ao kefir durante o período de armazenamento, visando o desenvolvimento de uma bebida que possa ter características funcionais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da adição de luteína nas características físico-químicas do kefir após 1, 14, 20 e 42 dias de armazenamento;
- Avaliar o efeito da adição de luteína nas características de cor, capacidade de retenção de água e propriedade reológicas do kefir após 1, 20 e 40 dias de armazenamento;
- Avaliar o efeito da adição de luteína no teor de compostos fenólicos totais e na capacidade antioxidante *in vitro* por dois métodos diferentes ABTS (2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) e DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), do kefir após 1, 20 e 40 dias de armazenamento;
- Avaliar o efeito da adição da luteína na estabilidade microbiológica do kefir após 2 e 42 dias de armazenamento;
- Avaliar o impacto da adição de luteína na aceitação sensorial do kefir.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS ECONÔMICOS E NUTRICIONAIS DO LEITE

A pecuária leiteira tem evoluído de forma muito positiva nos últimos anos, tanto em produtividade e tecnificação quanto em relação às questões de sanidade dos animais, estações de trabalho, infraestrutura e desenvolvimento sustentável do setor (CASAGRANDE, 2021).

A cadeia produtiva do leite é uma das principais atividades econômicas do Brasil e possui forte efeito na geração de emprego e renda. Ela é presente em quase todos os municípios brasileiros, e envolve mais de um milhão de produtores no campo, gerando outros milhões de empregos nos demais segmentos da cadeia (CASTRO, 2023).

Segundo o IBGE o valor da produção leiteira está entre os maiores, ficando à frente de culturas tradicionais como o café. De acordo com a *Food and Agriculture Organization* (FAO), o Brasil é o maior produtor de leite da América Latina e deve ocorrer um aumento na produção de leite em 1% a cada ano no Brasil devido, entre outros fatores, ao melhoramento genético animal (BARBERO *et al.*, 2022).

O Brasil tem um dos parques industriais mais desenvolvidos na área de laticínios, que transformam hoje em dia quase a metade da produção de leite (cerca de 17 bilhões de litros) em produtos lácteos diversos: queijos, iogurtes, leites fermentados, manteiga, sobremesas lácteas, doces de leite, creme de leite, entre outros (CRUZ *et al.*, 2017). Mesmo assim, o Brasil nos últimos 10 anos, importou em média aproximadamente 160 mil toneladas por ano de produtos lácteos. Isso materializa o país como importador, com uma faixa de mercado interno sendo atendida pelo comércio internacional, que tem a Argentina e o Uruguai como os principais fornecedores (EMBRAPA, 2023).

Em países de baixa renda, a população se alimenta relativamente mais de raízes e tubérculos e à medida que a renda cresce ocorre migração para proteínas animais, como o caso do leite e seus derivados (EMBRAPA, 2023).

Segundo dados do *United States Department of Agriculture* (USDA) (2023) de dezembro de 2022, a produção mundial de lácteos deve ser recorde em 2023 com 709,43 milhões de toneladas, alta de 1,20% em relação a 2022, mantendo a tendência de crescimento também de 1,20% a.a. desde 2019. A motivação é estimada pelo

aumento do consumo de lácteos da ordem de 1,23% para 2023 (706 milhões de toneladas), de todos os produtos, especialmente de leite fluido (1,22%) de 657,62 para 665,64 milhões de toneladas, considerando que é usado para produção de outros lácteos (XIMENES; SOARES, 2023).

A tendência e demanda atual é por produtos alimentícios de qualidade sensorial e nutricional elevada que tenham em sua composição pouca ou nenhuma adição de aditivos sintéticos ou conservantes, assim como também de alimentos em cuja composição estejam presentes compostos bioativos como as vitaminas, minerais e compostos fenólicos (HERNÁNDEZ-CARRANZA *et al.*, 2019).

Entre as classes de alimentos funcionais, os produtos lácteos têm sido reconhecidos por pesquisas e profissionais da saúde como uma importante fonte para nutrição humana, especialmente a gordura e a proteína, componentes que estão intimamente relacionados às suas propriedades benéficas e que, por isso, poderiam veicular compostos com propriedades funcionais (POZZO, 2012).

Estudos recentes mostram que alguns componentes da gordura do leite podem carregar efeitos hipocolesterolêmicos, anticancerígenos e antidiabéticos (PARODI, 2016; RODRÍGUEZ - ALCALÁ *et al.*, 2017).

A gordura *trans* presente no leite e seus derivados, denominada de ácido vacênico, é a precursora de ácidos graxos específicos de ruminantes, como o Ácido Linoleico Conjugado (CLA) (PREUSS *et al.*, 2013). O CLA demonstra exercer várias propriedades fisiológicas potenciais benéficas ao homem, incluindo atividades anti-carcinogênicas, anti-obesidade, anti-cardiovasculares e antidiabéticas (LIMA *et al.*, 2018).

3.2 LEGISLAÇÃO DE LEITE FERMENTADO

No Brasil a legislação atualizada pelo Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017 (Novo RIISPOA), define no Artigo 386 que leites fermentados são produtos lácteos ou produtos lácteos compostos obtidos por meio da coagulação e da diminuição do pH do leite ou do leite reconstituído por meio da fermentação láctea, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, com adição ou não de outros produtos lácteos ou de substâncias alimentícias (BRASIL, 2017).

Ainda, no regulamento acima supracitado, são considerados leites fermentados o iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo ou acidofilado,

kumys, kefir e a coalhada, e que os microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto até o final do prazo de validade, conforme disposto em normas complementares (BRASIL, 2017).

De acordo com o conteúdo de matéria gorda, os leites fermentados se classificam em: com creme (aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda mínima de 6,0 g/100 g), integrais (aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda mínima de 3,0 g/100 g), parcialmente desnatados (aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda máxima de 2,9 g/100 g) e desnatados (aqueles cuja base láctea tenha um conteúdo de matéria gorda máxima de 0,5 g/100 g) (BRASIL, 2007).

Quando em sua elaboração tenham sido adicionados ingredientes opcionais não lácteos, antes, durante ou depois da fermentação, até um máximo de 30% m/m, classificam-se como leites fermentados com adições. No caso em que os ingredientes opcionais sejam exclusivamente açúcares, acompanhados ou não de glicídios (exceto polissacarídeos e polialcoóis) e/ou amidos ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou se adicionam substâncias aromatizantes/saborizantes, classificam-se como leites fermentados com açúcar, açucarados ou adoçados e/ou aromatizados/saborizados (BRASIL, 2007).

3.3 KEFIR

O termo kefir é derivado da palavra turca keyif, que significa “bom sentimento” pela sensação experimentada depois de beber o produto. O kefir também é conhecido por outras nomenclaturas como: kefer, kefy, kephir, kepi, kiaphur, kipi e knapon. Embora o kefir comercial seja tradicionalmente fabricado de leite de vaca, pode ser elaborado a partir de leite de ovelhas, cabras e búfalas (CASSANEGO *et al.*, 2018; D'ANGELIS *et al.*, 2020; FERRARI; VINDEROLA; WEILL, 2020).

O kefir é um leite fermentado que está sendo revalorizado nos últimos anos. Como o iogurte, sua origem é atribuída às montanhas do norte do Cáucaso, entre a Europa Oriental e a Ásia Ocidental. A história conta que os grãos de kefir foram um presente de Alá para o povo mulçumano do norte das montanhas. No século XIX, a produção artesanal do kefir, baseada na tradição dos povos do Cáucaso, espalhou-se para outras partes do mundo e, com ela suas indicações nutricionais e terapêuticas (RICHARDS; KINDLEIN; BRACCINI, 2022).

Entende-se por kefir o produto, cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (BRASIL, 2007).

A dupla fermentação do leite por bactérias e leveduras, que ocorre no kefir, resulta na produção de um alimento rico em ácidos láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares. O ácido láctico formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro. O produto é de alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo-se, assim, uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (SOUZA; GARCIA; VALLE, 1984; HERTZLER; CLANCY, 2003).

A composição microbiológica e química indica que o kefir é um produto com características probióticas, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

Ingredientes obrigatórios para o preparo de bebida fermentada: leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura. Cultivos de bactérias lácticas e/ou cultivos de bactérias lácticas específicas. Já os opcionais são: leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos. Frutas em forma de pedaços, polpa(s), suco(s) e outros preparados à base de frutas. Maltodextrinas. Outras substâncias alimentícias tais como: mel, coco, cereais, vegetais, frutas secas, chocolate, especiarias, café, outras, sós ou combinadas. Açúcares e/ou glicídios (exceto polialcoóis e polissacarídeos). Cultivos de bactérias lácticas subsidiárias. Amidos ou amidos modificados em uma proporção máxima de 1% (m/m) do produto final. Os ingredientes

opcionais não-lácteos, sós ou combinados deverão estar presentes em uma proporção máxima de 30% (m/m) do produto final (BRASIL, 2007).

Dentre as características sensoriais destacam-se: consistência firme, pastosa, semisólida ou líquida. Cor: branca ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou corante(s) adicionado(s). Odor e Sabor: característico ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou substância(s) aromatizante(s)/saborizante(s) adicionada(s) (BRASIL, 2007).

Os requisitos físico-químicos para kefir deve atender: < 1,0 de acidez (g de ácido láctico/100g) Norma FIL150:1991 e 0,5 a 1,5 de etanol (% v/m) (BRASIL, 2007).

A contagem de bactérias lácticas totais (UFC/g) Norma FIL 117A: 1988 para kefir deve atender ao requisito mínimo de 10^7 e a contagem de leveduras específicas (UFC/g) Norma FIL 94 B: 1990 deve atender o padrão mínimo de 10^4 (MAPA, 2007).

3.4 PROBIÓTICOS

De acordo com a definição de 2001 da Organização Mundial da Saúde (OMS), os probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro, sendo necessário que este efeito benéfico seja traduzido por uma alegação de propriedade funcional ou de saúde e que esteja relacionado ao benefício comprovado para a linhagem (FAO/WHO, 2002; 2006; HILL *et al.*, 2014; EFSA, 2018).

É possível encontrar produtos caracterizados como probióticos como leites fermentados, queijos, iogurtes, sorvetes, requeijão, kombucha e produtos farmacêuticos na forma de pós, sachês, tabletes e comprimidos. Lácteos fermentados a base de grãos de kefir também vem sendo amplamente consumidos por seu valor nutricional e aspecto probiótico (RABÊLO *et al.*, 2022).

Os produtos fermentados são os primeiros alimentos processados consumidos pelo homem, este processo tem como base a ação de microrganismos e ocorre por meio da ação de suas enzimas em um meio composto por nutrientes essenciais a sua proliferação (YEGIN *et al.*, 2022). Os alimentos fermentados fornecem benefícios para à saúde, pois são ricos em antioxidantes além de possuir compostos antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatórios entre outros (TZAVARAS; PAPAPELLI; NTAIKOU, 2022).

As bactérias pertencentes ao grupo dos microrganismos probióticos possuem particularidade de tolerância a ácido e bile, o que possibilita a sobrevivência ao trato intestinal, proporcionando o controle da microbiota intestinal e mantendo a saúde. *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. são exemplos de bactérias que possuem este perfil (CARNEIRO, 2010). Sendo essas as espécies probióticas mais utilizadas (FAO/OMS, 2001).

De acordo com Parvez *et al.* (2006), os critérios de seleção das bactérias lácticas incluem produzir efeitos benéficos para o hospedeiro; se adaptarem ao alimento e permanecerem viáveis durante o período de validade do produto; resistir as condições do trato gastrointestinal; capacidade de colonização e produção de substâncias que inibam o crescimento de bactérias patogênicas. Além disso, segundo Ouwehand, Salminen e Isolauri (2002), elas precisam ser de fácil cultivo, tolerar a presença de aditivos químicos e contribuir para as propriedades sensoriais dos produtos. A contagem de bactérias lácticas ao longo da validade do produto deve ser da ordem de 10^6 UFC/g (RABÊLO *et al.*, 2022).

O consumo diário de probióticos está associado aos seguintes efeitos: retardo da proliferação de bactérias patogênicas, controle das infecções intestinais, melhora na motilidade e constipação intestinal, controle do pH, melhora da absorção de nutrientes, diminuição da intolerância à lactose, efeito anticarcinogênico, fortalecimento do sistema imunológico, síntese de vitaminas como a K e B12 e proteínas, regulação da microbiota intestinal, sendo este considerado o mais importante dos benefícios (RABÊLO *et al.*, 2022).

Atualmente os produtos lácteos representam uma parte significativa dos produtos probióticos disponíveis no mercado mundial, sendo considerados o principal grupo veiculador alimentícios de probióticos (ORIENTE *et al.*, 2023).

3.5 ANTIOXIDANTES

O leite é um produto muito sensível e sabores estranhos podem ocorrer devido a diversos fatores como presença de microrganismos, exposição à luz artificial ou natural, pela relação tempo x temperatura de estocagem e material de embalagem, dentre outros (BRASIL, 2010).

Quando uma substância consegue inibir ou atenuar a oxidação de substratos, ainda quando a sua presença é dada em concentrações baixas é denominada antioxidante (SILVA *et al.*, 2013).

Os antioxidantes podem atuar no organismo de diversas maneiras, como na proteção da célula contra os radicais livres, impedindo sua formação e reparo já causados pelos radicais. Podem ser classificados em: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos bloqueiam a iniciação da oxidação, as enzimas são responsáveis pela remoção de espécies reativas ao oxigênio. Os não enzimáticos interagem com as espécies radicalares e durante a reação são consumidos, incluindo os compostos fenólicos sintéticos, naturais e outros (ANGELO; JORGE, 2007).

Através de dieta mais saudável podemos consumir alimentos ricos em propriedades antioxidantes, alguns destes antioxidantes presentes nestes alimentos podem ser os flavonoides e carotenoides, assim como algumas vitaminas como E e C, sendo extremamente importantes na interceptação dos radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A vitamina E é o principal antioxidante da membrana celular, capaz de inibir a ação dos radicais livres, prevenindo a propagação de peroxidação lipídica (COZZOLINO, 2009). Pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutathione, a vitamina C e os carotenoides, constituem um dos principais mecanismos de defesa endógena do organismo, inibindo os danos oxidativos (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A vitamina C tem a característica de doar e receber elétrons, que lhe garante papel indispensável como antioxidante. Os carotenoides promovem a pigmentação amarela, laranja ou vermelha nos alimentos (tomate, abóbora, pimentão, laranja) (MORAIS; COLLA, 2006). O β -caroteno está amplamente distribuído nos alimentos e possui ação antioxidante (SILVA, 2010).

Dentre os corantes naturais permitidos na fabricação de alimentos, destaca-se a curcumina e o urucum devido à ação antioxidante. A função primária dos pigmentos é dar cor ao alimento, mas também promover saúde e bem estar através da prevenção e às vezes até auxílio na cura de doenças (CONTE, 2016).

A curcumina é um potente antioxidante que protege contra danos oxidativos a componentes celulares e o câncer, principalmente de pele e de mama. Tem sido relatada sua ação na inibição, promoção e progressão de cânceres, pois inibe a peroxidação lipídica (VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009).

A planta *Bixa orellana* recebe diferentes denominações populares ao redor do mundo: urucu, urucum e açafrão, no Brasil. Dentre os principais compostos do urucum estão os compostos fenólicos e os carotenoides e por vezes estão envolvidos com as propriedades funcionais, entre elas a atividade antioxidante, responsável pela proteção à oxidação celular, podendo agir de modo preventivo contra cânceres, problemas cardiovasculares e envelhecimento (MOREIRA, 2013).

As antocianinas e a luteína, são compostos bioativos encontrados na natureza que além da função de colorir possuem características biológicas específicas que lhes conferem uma excelente atividade antioxidante (ROCHA, 2013).

3.6 CAROTENOIDES

Os carotenoides compreendem um dos principais grupos de pigmentos naturais lipídicos, com coloração amarela, laranja ou vermelha, à exceção dos carotenoides fitoeno e fitoflueno que são incolores (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017). São representados por aproximadamente 850 substâncias já identificadas até o momento (MAOKA, 2020).

A ocorrência de carotenoides na natureza é abrangente e eles podem ser encontrados em vários seres vivos, desde microrganismos até animais. Algumas espécies de bactérias, fungos, algas e plantas superiores são capazes de produzir estes pigmentos. Em animais, como crustáceos (camarão, lagosta, siri), aves (flamingo) e peixes (truta e salmão) esses pigmentos são acumulados no organismo por meio da alimentação (MESQUITA; TEIXEIRA; SERVULO, 2017).

A maioria dos carotenoides tem a estrutura básica de tetraterpeno de quarenta carbonos, formada por oito unidades isoprenoides de cinco carbonos, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica (QUIRÓS; COSTA, 2006). Dentre as estruturas de carotenoides, aproximadamente 50 possuem atividade biológica e, deste total, cerca de 40 podem ser encontradas em alimentos (FRASER; BRAMLEY, 2004).

Existem, basicamente, duas classes de carotenoides: carotenos e xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos representados pelos α , β e γ - caroteno, licopeno e bixina. As xantofilas são derivados oxigenados (oxicarotenoides) representados pela capsorubina, capsantina criptoxantina, zeaxantina, xantofila e luteína (PASSOS *et al.*, 2017).

Apresentam diversas vantagens, incluindo toxicidade baixa, cores altamente desejáveis e de alta resistência tintorial, atividade de pró-vitamina A e estabilidade na presença de agentes redutores (ácido ascórbico) (GOMES, 2012). Sem falar no poder antioxidante que atua combatendo o excesso de radicais livres no organismo que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (PEREIRA; VIDAL; CONSTANT, 2009).

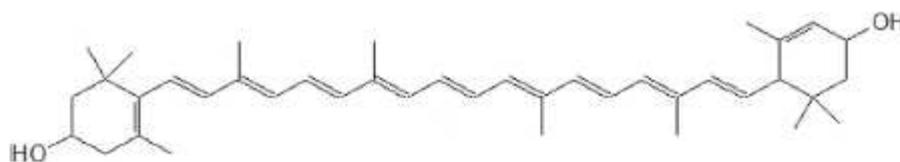
Os carotenoides são conhecidos por seu emprego na indústria de alimentos e farmacêutica como corantes e também por sua atividade biológica, apesar das limitações devido à sua baixa solubilidade em água e baixa estabilidade em diferentes condições de processamento em relação ao pH, temperatura, força iônica, luz e oxigênio (DIMA *et al.*, 2018). O seu consumo tem sido inversamente correlacionado com a ocorrência de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes pigmentos, a luteína se destaca pela sua associação com a diminuição da ocorrência e prevenção da catarata e da Degeneração Macular Relacionada a Idade (DMRI). A DMRI caracteriza-se pela degradação da porção central da retina que é a maior causa de cegueira irreversível em idosos (XAVIER *et al.*, 2012).

Assim, nos últimos anos, tem-se percebido um crescente interesse nos carotenoides, principalmente a luteína, por sua aplicação na tecnologia de alimentos e produtos nutracêuticos.

3.7 LUTEÍNA

A luteína (Figura 1) é um carotenoide di-hidroxilado pertencente à classe das xantofilas e possui uma estrutura química com amplo sistema de ligações duplas conjugadas, o que lhe confere atividade antioxidante (NACHTIGALL, 2007). Tem fórmula geral $C_{40}H_{56}O_2$ e nome sistemático β,ϵ -caroteno-3,3'-diol (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A principal fonte natural da luteína são as pétalas das flores de *Tagete* (*Tagete erecta*), onde é encontrado formando ésteres com diferentes ácidos graxos (SKERGET *et al.*, 2010). Seu pigmento é um dos principais componentes de vegetais verdes, frutas alaranjadas e gema de ovo, onde pode ser encontrado livre ou esterificado com ácidos graxos (HOJNIK; SKERGET; ZELJKO, 2008).

Figura 1 – Estrutura química da luteína.



Fonte: Fernández-García *et al.* (2012).

Como a luteína não é sintetizada pelo organismo humano, é necessário que seja suprida por meio da alimentação. A ingestão de 6 a 20 mg/dia de luteína está associada com a redução da incidência de degeneração macular, bem como de catarata. Para atingir a ingestão mínima de 6 mg/dia de luteína, seria necessário o consumo de 2 tigelas de espinafre ou uma tigela de salada de couve por dia, o que torna um hábito praticamente impossível para a maioria das pessoas (SOBRAL *et al.*, 2016).

A luteína está concentrada na mácula da retina nos olhos, onde sua função é proteger a retina através da absorção da luz azul incidente (DALLAS; TRABER, 2018). Além disso, pode atuar como agente antioxidante através da eliminação de radicais livres ou oxigênio singlete, diminuindo assim o estresse oxidativo na retina (NAGAO, 2014).

Considerada um antioxidante biológico que inativa os radicais livres produzidos na auto-oxidação lipídica. A propriedade antioxidante dos carotenoides está relacionada à sua estrutura, devido à presença de elevado número de ligações duplas alternadas (NACHTIGALL, 2007). Os carotenoides que têm nove ou mais ligações duplas tem maior proteção (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001), uma vez que as ligações duplas permitem a absorção de energia das espécies reativo, canalizando-o através das longas cadeias de ligações duplas que entram em ressonância, a energia é liberada como calor, regenerando a molécula carotenoide ao seu estado inicial (NACHTIGALL, 2007).

Entretanto, a sensibilidade ao calor, oxigênio e luz, assim como a baixa solubilidade aquosa e biodisponibilidade, são fatores que limitam a aplicação da luteína nas indústrias de alimentos (YI *et al.*, 2016). Diante destas limitações, dentre os mecanismos que podem ser utilizados para sua estabilização, se encontra a

microencapsulação, que permite a incorporação de substâncias ativas dentro de um sistema de matriz ou parede para proteger esses compostos, impedindo-os de sofrer reações de oxidação devido a condições ambientais, aumentando sua vida útil (ISLAS, 2002).

A pasteurização e esterilização térmicas são amplamente utilizadas na indústria láctea para promover a segurança microbiológica e aumentar a vida útil dos produtos (MUNOZ *et al.*, 2018). Embora muito utilizada na indústria de laticínios, sabe-se que as altas temperaturas empregadas para eliminar as bactérias também levam à degradação térmica de compostos voláteis e termossensíveis, resultando na perda do valor sensorial e nutricional do leite e produtos lácteos (BHUSHAND *et al.*, 2017; CHANDRASEKARAN; RAMANATHAN; BASAK, 2013). O processamento térmico de acordo com a sua intensidade pode provocar perdas ou alterações na composição dos carotenoides presentes nos alimentos como, por exemplo, a isomerização dos carotenoides trans para isômeros cis. Devido à presença de muitas duplas ligações na sua estrutura, os carotenoides são susceptíveis a várias reações de degradação durante o processamento e estocagem do alimento (GAMA; SYLOS, 2007).

Uma forma de proteger a luteína presente nos alimentos dos efeitos do tratamento térmico é a esterificação. A esterificação ocorre quando um ácido carboxílico reage com um álcool, ocorrendo à liberação de uma molécula de água. Dessa forma, as xantofilas são capazes de formar ésteres porque possuem pelo menos um grupo hidroxila. As formas esterificadas, principalmente com ácidos graxos insaturados, são mais estáveis do que as formas não esterificadas, devido ao aumento na lipossolubilidade (BEMFEITO *et al.*, 2020).

A luteína é uma molécula hidrofóbica rígida que consegue interagir com as porções lipofílicas das células, como exemplo as membranas e glóbulos de gordura (OLSON, 1996). A quantidade de gordura consumida com a fonte de luteína é um fator que afeta a biodisponibilidade, porque um maior teor de gordura aumenta a biodisponibilidade dos ésteres de luteína (HANDELMAN *et al.*, 1999; ROODEMBURG *et al.*, 2000).

As proteínas do leite também são capazes de interagir com compostos hidrofóbicos como a luteína. Constituindo assim, um bom sistema para veicular e estabilizar estas moléculas (SILVA, 2015). Estas são divididas em dois grupos principais, caseínas e proteínas do soro. Sendo muitas vezes utilizadas como agentes emulsionantes em alimentos e podem inibir a oxidação, impedindo a penetração de

pro-oxidantes no complexo formado entre estas proteínas e o carotenoide (LIVNEY, 2010).

Dentre as proteínas do soro destaca-se a β -lactoglobulina, devido sua capacidade de ligação com os ácidos graxos, torna-lhe um eficiente agente emulsificador apreciado pelas indústrias de alimentos (LIANG; SUBIRADE, 2010). Alguns estudos também tem investigado a interação de β -caseína com moléculas hidrofóbicas, sugerindo que as forças de interação hidrofóbica são as responsáveis por esta interação (SILVA, 2015).

Logo, a aplicação da luteína como suplementação em kefir pode ser uma interessante alternativa, com a gordura do leite aumentando a biodisponibilidade e as proteínas agindo como emulsificadoras, melhorando a solubilidade deste composto bioativo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Os experimentos foram conduzidos em escala piloto nas dependências do Laboratório de Pesquisa Desenvolvimento e Inovação (Lab. de PD&I) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG-ILCT), em Juiz de Fora – MG. As análises físico-químicas, microbiológicas e sensoriais foram realizadas nos laboratórios de pesquisa da EPAMIG-ILCT e as análises de cor, capacidade de retenção de água, propriedades reológicas, compostos fenólicos e capacidade antioxidante *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Inovação e Processamento de Alimentos (LIPA) do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DTA) da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

4.2 ELABORAÇÃO DO KEFIR

Um volume de 25 L de leite pasteurizado (72 °C/ 15 s) foi dividido em 5 cubas de 5 litros de leite cada (controle, repetição 1, repetição 2, repetição 3 e repetição 4).

Na cuba do controle branco foi adicionado 6% de sacarose (300g). Nas cubas R1, R2, R3 e R4 foi adicionado 6% de sacarose (300 g) e 3 g de luteína.

As 5 cubas foram colocadas em banho maria e aquecidas à 90 °C / 5 min. Após o tratamento térmico elas foram resfriadas a 25 °C e inoculado em cada uma 0,1 g de fermento comercial Danisco (CHOOZIT® Kefir DC).

Figura 2 - Registro fotográfico do preparo do kefir sem e com luteína. (A) Ingredientes pesados. (B) e (C) Tratamento térmico do kefir.



(A)



(B)



(C)

Fonte: Arquivo pessoal.

4.2.1 Cálculo da dose de luteína a ser utilizada

- A dose diária recomendada de consumo de luteína, pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é de 6 mg. Neste contexto foi adicionado 6 mg de luteína para uma porção diária de 200 mL do produto, logo:

$$\begin{array}{r}
 6 \text{ mg de luteína} \text{ ----- } 200 \text{ mL de leite} \\
 X \text{ ----- } 5000 \text{ mL de leite} \\
 X=150 \text{ mg de luteína}
 \end{array}$$

- Como o corante comercial utilizado tem 5% de luteína:

$$\begin{array}{l} \downarrow \quad 5 \text{ mg de luteína} \text{ -----} 100 \text{ mg do produto} \quad \uparrow \\ \downarrow \quad 150 \text{ mg de luteína} \text{ -----} X \\ X = 3000 \text{ mg} = 3 \text{ g de luteína para 5L de leite} \end{array}$$

As cubas foram incubadas a 25°C e ficaram fermentando até o dia seguinte. Quando atingiram a acidez de 0,9% (m/v) expressa como ácido láctico, foram resfriadas e em seguida realizou-se a quebra da coalhada e envase em garrafas PET (polietileno tereftalato) de 200 mL. As garrafas das bebidas de kefir foram armazenadas a $5 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa incubadora BOD (*Biochemical Oxygen Demand*). As Figuras 3 e 4 mostram as etapas do processamento do kefir.

Figura 3 - Registro fotográfico do preparo do kefir sem e com luteína. (A) Incubação, (B) Quebra da coalhada, (C), (D) e (E) Envase e (F) Armazenamento.



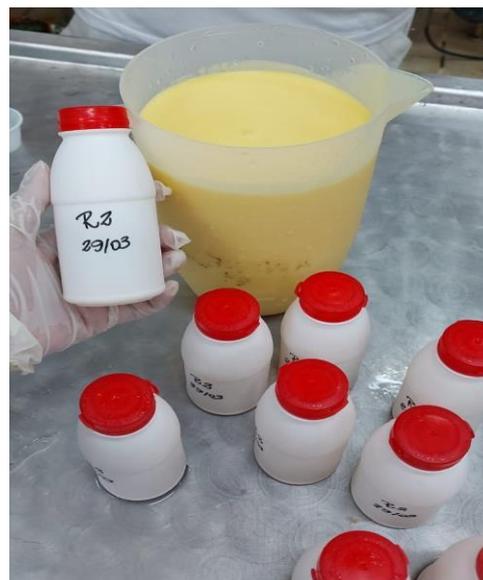
(A)



(B)



(C)



(D)



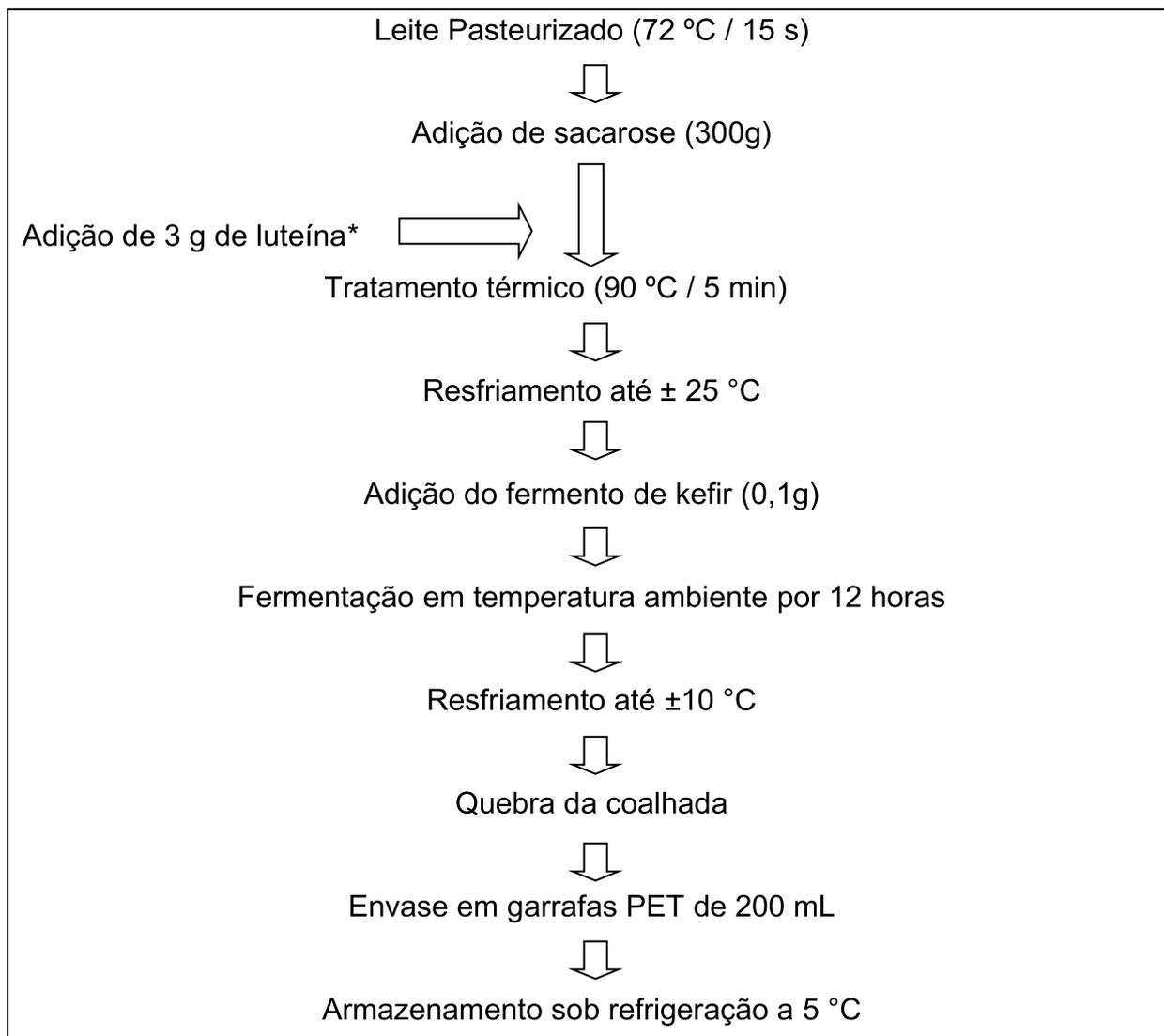
(E)



(F)

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 4 – Fluxograma de fabricação do kefir.



Legenda: * adição de luteína apenas nas bebidas chamadas de repetições.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O processamento e as modificações tecnológicas do processo, assim como os fluxogramas de fabricação foram definidos por meio de testes preliminares realizados no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (Lab. de PD&I) do Instituto de Laticínios Cândido Tostes (EPAMIG ILCT), em Juiz de Fora - MG. A partir da definição de todas as variáveis e do fluxograma de fabricação das bebidas com e sem adição de luteína o produto foi fabricado em 4 repetições. Para dirimir qualquer interferência em algumas análises (capacidade de retenção de água, propriedades

reológicas, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante) e para avaliar o efeito do corante bioativo na formulação do produto foi elaborada uma bebida branca (controle), sem a adição de luteína para fins de comparação e eliminação do efeito dos carotenoides naturalmente presentes no leite de vaca. Após a fabricação, as garrafas das bebidas foram estocadas sob refrigeração ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) para a realização das análises.

As Tabelas 1, e 2 descrevem as análises realizadas ao longo do período de armazenamento, visando verificar as alterações e avaliar a qualidade e a estabilidade do kefir.

Tabela 1 – Resumo das análises realizadas no Lab. de PD&I da EPAMIG- ILCT para o leite e para o kefir.

ANÁLISES									
Tempo (dias)	Gb	Acidez	EST	pH	Lactose	UM	Proteína	Sensorial	Microbiológicas
Leite									
0	✓	✓	✓						
Kefir									
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14		✓		✓				✓	
20		✓		✓				✓	
42		✓		✓				✓	✓

Legenda: Gb = gordura butirométrica; EST= extrato seco total; UM = umidade; Microbiológicas (coliformes a 30 °C e a 45 °C, fungos filamentosos e leveduras e bactérias lácticas); ✓ = análise realizada.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 2 – Resumo das análises realizadas no LIPA da UFV para o kefir.

ANÁLISES					
Tempo (dias)	Cor	CRA	PR	CFT	CA <i>in vitro</i>
1	✓	✓	✓	✓	✓
20	✓	✓	✓	✓	✓
40	✓	✓	✓	✓	✓

Legenda: CRA= capacidade de retenção de água; PR= propriedades reológicas; CFT= compostos fenólicos totais; CA= capacidade antioxidante; ✓ = análise realizada.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

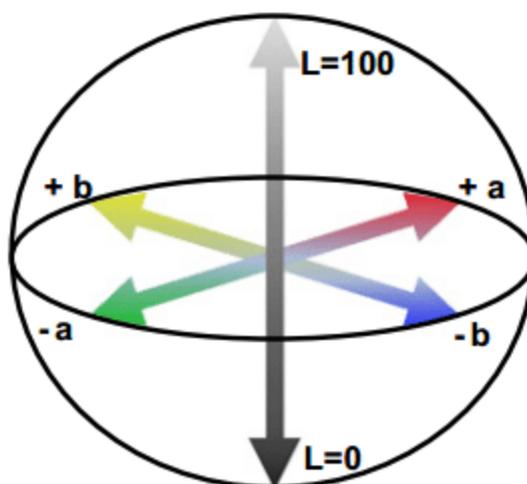
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As análises de teor percentual de gordura (m/m) foram determinadas pelo método butirométrico, acidez titulável (m/v) pelo método Dornic e umidade por secagem em estufa a 105 °C. Todas as análises foram realizadas de acordo com os métodos descritos na Portaria número 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007). O pH foi determinado pelo método potenciométrico (modelo Tecnal, pH Meter Tec - 2). A lactose foi calculada por diferença percentual da soma dos demais constituintes: proteína, gordura, RMF, sacarose, luteína em relação ao EST. O teor percentual de proteína foi determinado pelo método Kjeldahl (PEREIRA *et al.*, 2001). O Resíduo Mineral Fixo (RMF) foi determinado por incineração em mufla a 550 °C (BRASIL, 2007). O teor de carboidrato foi determinado por meio da diferença percentual da soma dos demais constituintes: proteínas, gordura e RMF em relação ao EST somado com a sacarose acrescentada. O valor energético em 100mL de kefir foi calculado pela soma dos resultados da multiplicação das porcentagens de proteínas, carboidratos e lipídeos pelos seus respectivos fatores de conversão (4, 4 e 9 Kcal/g).

4.5 ANÁLISE DE COR

A cor das amostras do kefir foram avaliadas após 1, 20 e 40 dias de armazenamento utilizando o colorímetro triestímulo COLOR QUEST II equipado com software Universe da Hunterlab, Reston, VA. Para determinação da cor foi utilizada a escala CIELab utilizando as coordenadas L*, a* e b*, onde L* representa o nível de luminosidade em uma escala de 0 a 100, sendo 0 preto e 100 branco. O eixo a* representa a variação entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos), enquanto o eixo b* representa a variação entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Figura 5).

Figura 5 – Gráfico de cor demonstrando as coordenadas cromáticas no sistema CIELab.



Fonte: Bisulca *et al.* (2012).

Além disso, a diferença total de cor (ΔE) entre a amostra de kefir sem adição de luteína (definida como referência) e a amostra de kefir adicionada de luteína foi calculada de acordo com a equação 1 (Eq. (1)).

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Eq. (1)}$$

Onde, $(\Delta L = L_1 - L_2)$, $(\Delta a = a_1 - a_2)$ e $(\Delta b = b_1 - b_2)$. Sendo L_1 , a_1 e b_1 são os valores do kefir sem luteína e os valores L_2 , a_2 e b_2 são os valores do kefir com luteína.

4.6 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA)

Para as análises de CRA, 15 g de cada amostra de kefir foi centrifugado a 3000xg durante 10 min a 5 °C (Hanil Scientific, modelo combi 514R, Gimpo, Rep. da Coreia). O sobrenadante foi cuidadosamente drenado e os tubos foram pesados. A capacidade de retenção de água foi definida como a razão entre o peso do pellet remanescente após a centrifugação e o peso inicial do kefir, expresso em porcentagem (PACHECO *et al.*, 2023).

4.7 PROPRIEDADES REOLÓGICAS

Os estudos das propriedades reológicas foram realizadas utilizando um reômetro de cilindro concêntrico rotacional (Brookfield, modelo R/S plus SST 2000, com interface acoplada a um microcomputador conectado ao software RHEOCALC V1.1, equipado com banho-maria) conforme descrito anteriormente por Pacheco *et al.* (2023). As curvas de fluxo foram realizadas utilizando um sensor CC45 com taxa de cisalhamento variando de 0 a 300 s⁻¹, com quatro rampas de fluxo (subida, descida, subida e descida) com duração de 3 min cada e com medições a cada 4 s para eliminar o efeito de tixotropia. As amostras de kefir refrigeradas com 1, 20 e 40 dias de armazenamento a 7 °C ± 0,1, foram equilibradas a 5 °C ± 0,1 por 1 h e mantidas nesta temperatura durante os experimentos. Os dados foram ajustados ao modelo Ostwald-de-Waele (Power Law, Eq. (2)) usando o *software* Curve Expert Professional 2.2.0). Valores de K e n foram usados para calcular a viscosidade aparente (η_{app} , Pa·s) do kefir em taxas de cisalhamento de 10, 50 e 100 s⁻¹.

$$\sigma = K \cdot \gamma^n \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde σ é a tensão (Pa), K é o índice de consistência (Pa·sⁿ), γ é a taxa de deformação (s⁻¹) e n é o índice de comportamento do fluxo (adimensional).

4.8 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Para determinar os compostos fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* do kefir, as amostras de kefir refrigeradas com 1, 20 e 40 dias de armazenamento a 7 °C ± 0,1, foram equilibradas a temperatura ambiente por 1 h e mantidas nesta temperatura durante os experimentos.

4.8.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi obtido seguindo o método descrito por Singleton e Rossi (1965), com modificações. Foram preparadas diluições para obtenção de diferentes concentrações (mL L⁻¹) para construção da curva de cada extrato, dentro da faixa linear da absorbância. Alíquotas de 0,6 mL das diluições dos

extratos foram transferidas para tubos de ensaios contendo 3,0 mL de reagente folin-Ciocalteu diluídos em água (1:10 v/v). Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos. Após 3 min de agitação, adicionou-se 2,4 mL de solução saturada de Na_2CO_3 (7,5% m/v). Os tubos permaneceram em repouso, ao abrigo da luz, por 1 h. Após esse período, realizou-se a leitura da absorbância a 760 nm em espectrofotômetro previamente zerado com água. Para o preparo do branco utilizou-se 0,6 mL de água seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente. As análises foram realizadas em duplicata para cada extrato de cada amostra de kefir. Os resultados foram expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por g de kefir (mg AGE g^{-1}). Para quantificar os polifenóis totais, elaborou-se previamente uma curva analítica de diferentes diluições aquosas a partir da solução estoque de ácido gálico (200 mg L^{-1}), de concentrações variando entre $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $150 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.8.2 Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada por meio de dois radicais. O primeiro radical foi o 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo o método descrito por De Camargo *et al.* (2012) e Re *et al.* (1999) e o segundo radical utilizado foi o 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), seguindo o método descrito por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995).

No primeiro método, misturou-se solução de ABTS $7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ e persulfato de potássio $2,45 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ na proporção 1:1 (v/v), que permaneceu ao abrigo da luz durante 12 a 16 h para a geração do cátion cromóforo ABTS⁺. Após esse período, o radical foi diluído em etanol 80% até que se atingiu absorbância de $0,700 \pm 0,005$, no comprimento de onda 734 nm (espectrofotômetro Rayleigh, modelo UV-9200). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de diferentes diluições da amostra de kefir e 3,5 mL de solução ABTS⁺, seguido de homogeneização em agitador de tubos. A absorbância foi então lida após 6 min de reação, no comprimento de onda de 734 nm.

Para o segundo método, preparou-se uma solução metanólica de DPPH com concentração de $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$. A partir dos extratos, preparou-se diluições aquosas para obtenção de diferentes concentrações (mL L^{-1}) para construção da curva de cada extrato dentro da faixa linear da absorbância. Em ambiente escuro, as alíquotas de 0,1 mL das diluições dos extratos foram transferidas para tubos de ensaios, onde

foram adicionados 2,9 mL da solução metanólica do radical DPPH. Em seguida, os tubos foram homogeneizados em agitador e deixados em repouso ao abrigo da luz durante 25 min. Após esse período, realizou-se a leitura da absorbância a 515 nm em espectrofotômetro previamente zerado com etanol 80%.

A atividade antioxidante foi expressa pelo valor da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC), sendo os resultados expressos em μmol de Trolox por g de kefir (μmol de Trolox g⁻¹) para ambos os métodos. Calculou-se o valor da TEAC com base na curva analítica de Trolox, preparada com soluções do padrão de concentrações que variaram entre 4,0 mmol·L⁻¹ e 100,0 mmol·L⁻¹, nas mesmas condições das amostras.

4.9 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

As análises microbiológicas do kefir sem e com luteína foram realizadas após 2 e 42 dias de armazenamento a 5 °C em estufa incubadora BOD. Inicialmente, foram pesadas 25 g das bebidas e adicionados 225 mL de água peptonada 0,1% (m/v) e, em seguida, foram realizadas diluições decimais em 9 mL de água peptonada 0,1%. Estas diluições foram utilizadas para as contagens de coliformes a 30 e a 45 °C, fungos filamentosos e leveduras e bactérias lácticas (SILVA *et al.*, 2017).

As contagens microbiológicas: coliformes a 30 e 45 °C e fungos filamentosos e leveduras, foram realizadas utilizando-se as técnicas de contagem em placas de *Petrifilm*[®], de acordo com a metodologia e material, citados a seguir, e com os procedimentos determinados pelo fabricante, sendo ambos indicados para análises em leite e produtos lácteos (PARK; KALANTARI; FRANK, 2004).

As contagens de coliformes a 30 e 45 °C foram realizadas em *Petrifilm 3M*[™] *E. coli / Coliform Count Plate* (Petrifilm 3M[™], EUA) com incubação a 30 e 45 °C por 48 h, respectivamente, de acordo com o fabricante (AOAC 991.14 – Contagem de coliformes e *E. coli* em alimentos, película reidratável seca).

As contagens de fungos filamentosos e leveduras foram realizadas em *Petrifilm 3M*[™] *Yeast and Mold Count Plate* (Petrifilm 3M[™], EUA) com incubação a 25 °C por 5 dias, de acordo com o fabricante (AOAC 997.02 – Contagem de bolores e leveduras em alimentos, película reidratável seca).

As contagens de bactérias lácticas foram realizadas em ágar *Man Rogosa Sharpe* (MRS) pelo método de plaqueamento em profundidade com incubação a 37 °C em jarras de anaerobiose por 4 dias (SILVA *et al.*, 2017).

4.10 ANÁLISE SENSORIAL

Foram realizados testes de aceitação utilizando a escala hedônica de nove pontos de acordo com a Figura 6, (CHAVES; SPROESSER, 2005; MINIM, 2006). As avaliações foram realizadas no laboratório de análise sensorial da EPAMIG ILCT nos tempos 2,13, 22, 34 e 42 dias após a fabricação do kefir. O teste de aceitação foi realizado para cada repetição do kefir com luteína (R1, R2, R3 e R4) sendo intercalada uma das repetições em cada tempo. Empregou-se um número mínimo de 36 provadores não treinados (estudantes do curso superior em Ciência e Tecnologia de Laticínios da EPAMIG ILCT) e selecionados aleatoriamente por sessão, totalizando 184 julgamentos durante o experimento.

Os testes foram conduzidos em cabines individuais, sob luz branca e a amostra de kefir com luteína foi servida refrigerada a 5 °C, juntamente com água (para lavar a boca), em copos descartáveis de 50 mL.

Figura 6 – Modelo de ficha de avaliação para os testes de aceitação e preferência.

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

Fonte: Adaptado de MINIM (2006).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido no Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC). Foi utilizada a estatística descritiva e análise de variância para apresentação, avaliação e discussão dos resultados, para dados normais. Para a análise estatística ANOVA e o testes de comparação de médias foi utilizado o Teste de Tukey a um nível de 5% de significância. Os dados obtidos foram analisados por meio do software SISVAR, versão 5.6 (FERREIRA, 2014).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as análises dos resultados obtidos neste estudo para todos os parâmetros avaliados.

5.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO KEFIR

A Tabela 3 apresenta a composição centesimal da média das amostras de kefir adicionadas de luteína.

Tabela 3 - Composição centesimal das médias e desvio padrão das amostras de kefir com luteína.

Parâmetro	kefir com luteína (média* ± DP)
Proteína (% m/v)	3,13 ± 0,07
Gordura (%m/v)	2,78 ± 0,03
Umidade (%m/v)	82,20 ± 0,26
EST (%m/v)	17,80 ± 0,26
Carboidrato (%m/v)	17,18 ± 0,22
RMF (% m/v)	0,71 ± 0,01
Luteína**	0,06
Sacarose**	6,00
Lactose***	5,12 ± 0,22
Valor Energético (kcal/100mL)	106,26

Legenda: *média de quatro repetições; **não foi feita análise, essa quantidade foi da formulação; ***não foi feita análise, essa quantidade foi obtida por diferença; DP= Desvio Padrão; EST= Extrato Seco Total; RMF= Resíduo Mineral Fixo.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

O teor médio de proteína encontrado para o kefir com adição de luteína foi e 3,13% (m/v), ou seja, em conformidade com a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 que determina um mínimo de proteína de 2,90% para leite fermentado. Sendo que neste caso, por ser um leite fermentado com adição de açúcar o teor de proteína seria aceitável um valor um pouco abaixo do limite mínimo.

Conforme os valores preconizados pela legislação vigente para o teor de gordura para leite fermentado, o kefir com luteína se classifica como parcialmente desnatado, pois o valor encontrado para a gordura de 2,78% (m/v) está abaixo de 2,90% (m/v) de matéria gorda.

5.2 pH E ACIDEZ TITULÁVEL

A Tabela 4 apresenta os resultados do perfil de pH e acidez titulável (% m/v de acidez expressa em ácido láctico) do kefir com adição de luteína ao longo do armazenamento.

Tabela 4 - pH e acidez titulável (% m/v de acidez expressa em ácido láctico) do kefir com luteína ao longo do armazenamento. Valores médios \pm desvio padrão.

Kefir	Dias	pH (média* \pm DP)	Acidez titulável (%m/v) (média* \pm DP)
Com luteína	1	4,33 \pm 0,02	0,98 \pm 0,01
	14	4,32 \pm 0,00	0,86 \pm 0,02
	20	4,32 \pm 0,02	0,99 \pm 0,09
	42	4,35 \pm 0,02	0,81 \pm 0,04

Legenda: *média de quatro repetições; DP= Desvio Padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

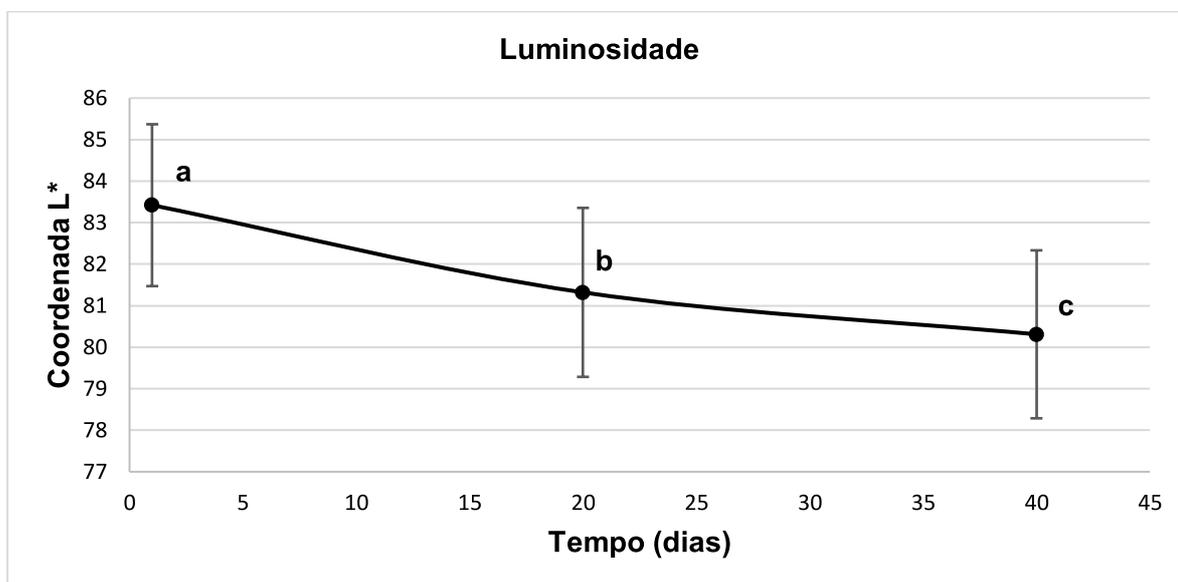
O kefir fabricado com luteína apresentou pH entre 4,32 a 4,35 ao longo do período de armazenamento. A IN nº 46, de 23 de outubro de 2007, não traz definições de valores de pH para leite fermentados. Mas segundo Silva, Souza e Marinho (2010) o pH ideal para elaboração de leites fermentados é próximo de 4,6. Thamer e Penna (2006); Preci *et al.* (2011) relatam que o valor do pH é importante para o monitoramento da fermentação, aceitabilidade sensorial e para estabilidade da bebida, uma vez que os leites fermentados com baixa acidez (pH inferiores a 4,0) proporcionam maior separação de soro devido à redução da hidratação das proteínas e contração do coágulo, favorecendo a sinérese e influenciando no aspecto visual do produto durante o armazenamento em refrigeração. Além de alterações nas características sensoriais que poderão tornar o produto indesejável.

As amostras de kefir produzidas com luteína apresentaram acidez titulável entre 0,81 e 0,99, durante o período de armazenamento. De acordo com a Instrução Normativa 46/07, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento –MAPA (Brasil, 2007) a acidez do kefir deve ser menor que 1,0 % de ácido láctico, o que corrobora com os resultados encontrado neste trabalho.

5.3 ANÁLISE DE COR

A cor dos alimentos é um dos principais parâmetros de qualidade avaliados pelos consumidores que podem influenciar no seu julgamento sobre outros atributos, como o sabor (ZHANG; WANG; LAN, 2021). Porém, podem ocorrer alterações de cor e estabilidade no tempo devido a interferências com outros ingredientes e/ou aditivos alimentares, bem como as condições de armazenamento (TERIBIA *et al.*, 2021). Para dirimir qualquer interferência e para avaliar o efeito do corante bioativo na formulação do produto foi elaborada uma bebida branca, sem a adição de luteína para fins de comparação e eliminação do efeito do carotenoide presente naturalmente no leite de vaca. O parâmetro de cor L^* das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento estão representados na Figura 7. Já os parâmetros de cor (a^* e b^*) estão representados na Tabela 5. E a diferença total de cor (ΔE) na Tabela 6.

Figura 7 – Luminosidade (%) versus tempo (dias) das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.



Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as diferentes amostras de kefir ao longo do período de armazenamento pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

De modo geral, constatou-se que ocorreram mudanças no parâmetro de cor L^* das amostras de kefir sem e com luteína ($p < 0,05$), cujas médias e desvio padrão foram $(83,60 \pm 1,552)$ e $(79,77 \pm 1,332)$, respectivamente. Logo, a adição de luteína na concentração (0,06%) utilizada neste estudo foi suficiente para reduzir a luminosidade das amostras de kefir. Mas não houve interação ($p > 0,05$) entre os tratamentos (sem ou com luteína) em relação aos tempos de análises (1, 20 e 40 dias) (Figura 7). A presença de macromoléculas no leite, principalmente micelas de caseína e dos glóbulos de gordura, são os responsáveis por dispersar a luz e, assim, gera a cor branca no kefir (GARCIA *et al.*, 2008).

Tabela 5 - Parâmetros de cor (a^* ; b^*) das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.

ANÁLISE DE COR			
Dia	Coordenada	Sem luteína	Com luteína
1	a^*	$-3,35 \pm 0,009^{Ba}$	$1,69 \pm 0,077^{Aa}$
20		$-3,77 \pm 0,019^{Bb}$	$1,34 \pm 0,019^{Ab}$
40		$-3,95 \pm 0,010^{Bc}$	$-3,35 \pm 0,009^{Ac}$
1	b^*	$6,47 \pm 0,053^{Ba}$	$9,26 \pm 0,012^{Aa}$
20		$6,13 \pm 0,011^{Bb}$	$8,72 \pm 0,007^{Ab}$
40		$5,28 \pm 0,013^{Bc}$	$8,17 \pm 0,017^{Ac}$

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 6 - Diferença total de cor (ΔE) entre as amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.

DIFERENÇA TOTAL DE COR (ΔE)	
Dia	ΔE
1	$6,86 \pm 0,148^a$
20	$6,92 \pm 0,019^a$
40	$4,87 \pm 0,023^b$

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

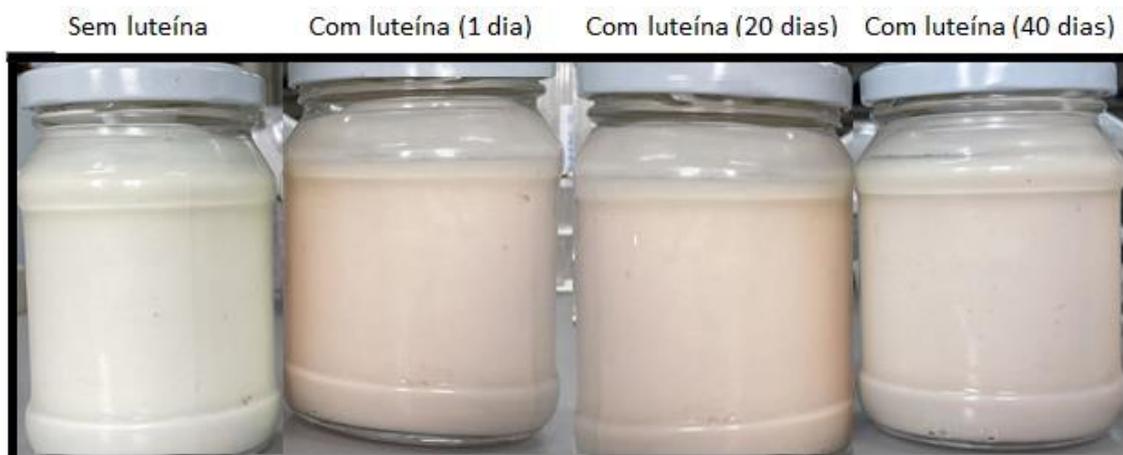
A adição de luteína aumentou significativamente os parâmetros de cor a^* e b^* ($p < 0,05$). A luteína é um carotenoide amarelo-laranja (MORA-GUTIERREZ *et al.*, 2018), assim, os valores positivos para coordenada cromática a^* indica tendência para a cor vermelha enquanto que os valores positivos para a coordenada b^* indica que se aproximaram mais do eixo da cromaticidade amarelo. Da mesma forma, Barros *et al.* (2020) observaram que a adição de luteína no iogurte de ovelha aumentou os valores de a^* e b^* e reduziu os valores de L^* de forma significativa.

Em relação ao tempo de armazenamento, observou-se que houve mudanças significativas nos parâmetros de cor a^* e b^* das amostras sem e com luteína ($p < 0,05$). Ambos os parâmetros de cor a^* e b^* foram reduzindo ao longo do tempo, tanto das amostras sem luteína quanto as da com luteína, e a diferença de cor entre

elas também reduziu. Esta diferença entre as amostras sem e com luteína, provavelmente ocorreu porque, durante o armazenamento, as macromoléculas do leite, principalmente micelas de caseína e dos glóbulos de gordura, conseguiram conferir fotoproteção a luteína, através das complexação entre as macromoléculas e a luteína (MERCADANTE, 2008).

Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram utilizados para calcular a diferença total de cor (ΔE) (Tabela 6), que descreve as alterações gerais em relação a uma amostra de referência (amostra sem adição de luteína). Com base nos valores de ΔE , as amostras de kefir contendo luteína apresentaram valores de $\Delta E \geq 4,87$ em relação à amostra de referência, independente do tempo de armazenamento. De acordo com a interpretação de Choi, Kim e Lee (2002), valores de $\Delta E > 2$ confirmam uma diferença de cor visível entre as amostras. Portanto, com base nos valores obtidos, é possível sugerir que os consumidores seriam capazes de perceber diferenças na cor da amostra após adição de luteína. Além disso, observa-se que o valor de ΔE para amostra com 20 dias de armazenamento não apresentou variação significativa ($p > 0,05$) em relação a amostra com 1 dia de armazenamento, com valores médios de 6,92 e 6,87, respectivamente. Por outro lado, após 40 dias de armazenamento, foi observado uma redução significativa no valor de ΔE (redução de ~29%) quando comparadas com as amostras com 1 e 20 dias de armazenamento. Tais resultados sugerem que com 40 dias de armazenamento, as diferenças perceptíveis na cor da amostra com luteína foram significativamente reduzidas ($p < 0,05$), provavelmente devido a oxidação da luteína causado pelas condições de baixos valores de pH (~4,3) do produto durante o armazenamento (MERCADANTE, 2008; MORA-GUTIERREZ *et al.*, 2018). Para ilustrar as diferenças de cor na aparência das amostras, a Figura 8 apresenta imagens das amostras de kefir adicionadas de luteína nos dias 1, 20 e 40 de armazenamento em comparação com a amostra de kefir sem adição de luteína com 1 dia de armazenamento.

Figura 8 - Influência da adição de luteína na aparência do kefir.

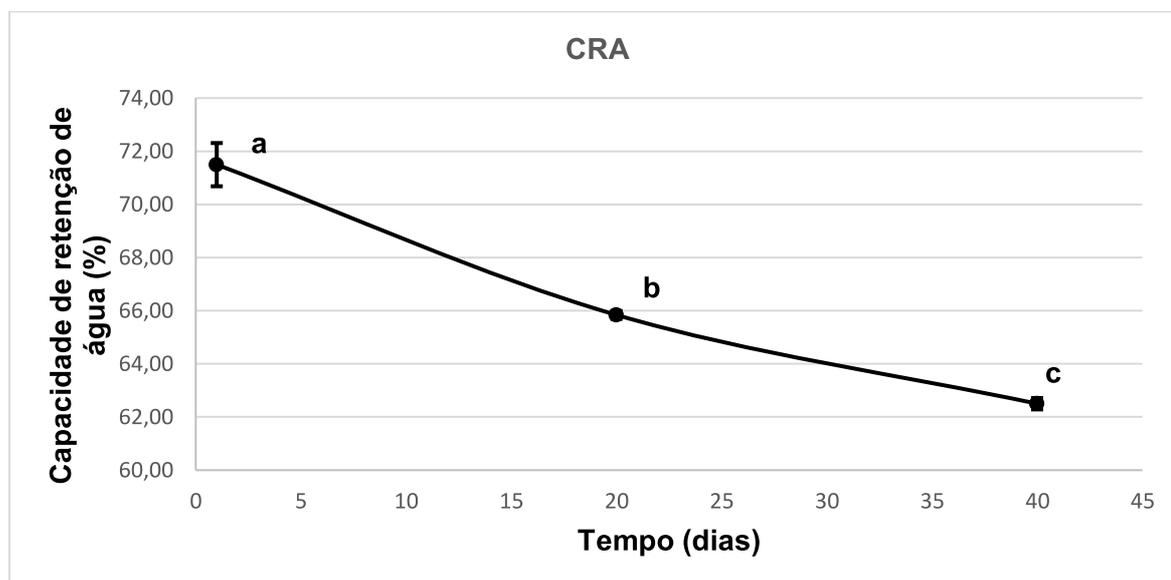


Fonte: Arquivo pessoal.

5.4 CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE ÁGUA (CRA)

A Capacidade de Retenção de Água (CRA) é definida como a capacidade do kefir de reter toda ou parte de sua água. As médias da CRA das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento são mostrados na Figura 9.

Figura 9 – Médias da CRA (%) das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.



Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as diferentes amostras de kefir ao longo do período de armazenamento pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

De modo geral, a adição de luteína não aumentou significativamente ($p > 0,05$) a CRA das amostras de kefir. A luteína possui dois grupos hidroxila terminais (BATISTA *et al.*, 2006) que podem interagir com as proteínas do leite, causando alterações na estrutura tridimensional do gel e, conseqüentemente, alterar a CRA (MEDINA *et al.*, 2023), mas tais alterações são dependentes de diversos fatores como a concentração de luteína. Assim, provavelmente, a concentração de luteína utilizada neste estudo não alterou a estrutura tridimensional do gel e assim, não impactou de forma significativa na CRA.

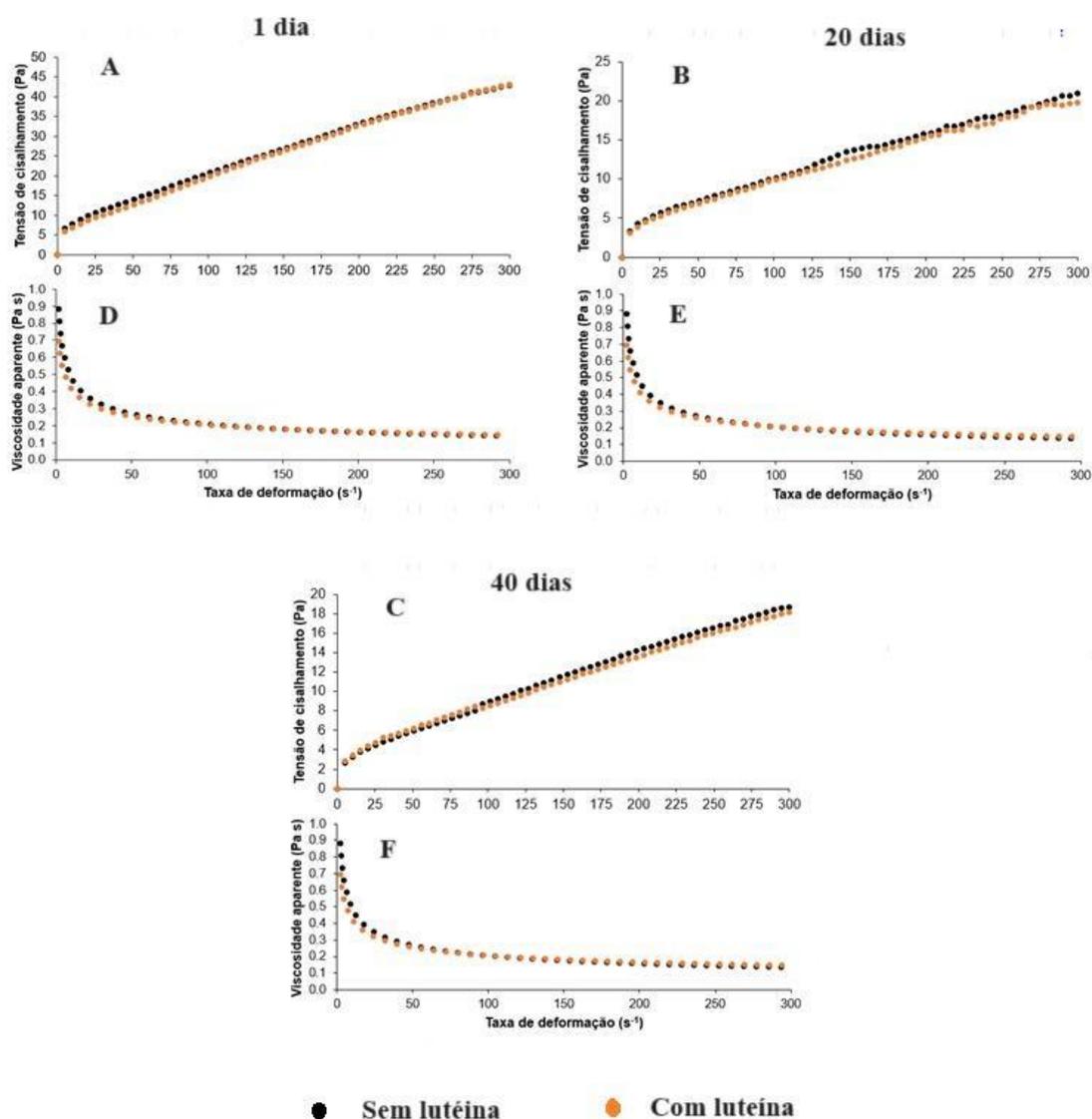
Por outro lado, a CRA das amostras de kefir sem e com luteína foram diminuindo ao longo do período de armazenamento (Figura 9). Os principais fatores que afetam a capacidade de retenção de água de uma proteína são sua composição de aminoácidos, sua estrutura e conformação, a polaridade e a carga na superfície, a força iônica, o pH e a temperatura (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

De acordo com as interpretações de Achanta, Aryana e Boeneke (2007), com o aumento da acidez e conseqüentemente diminuição do pH, pode ocorrer uma contração do coágulo, que pode desestabilizar a estrutura formada e resultar em uma redução da capacidade de retenção de água.

5.5 PROPRIEDADES REOLÓGICAS

A Figura 10 mostra a relação entre a tensão de cisalhamento (σ , Pa)/viscosidade aparente (η , Pa s) e a taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) a 5 °C das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento. As curvas revelaram que ambas as amostras de kefir apresentaram comportamento pseudoplástico, com uma diminuição da viscosidade aparente e aumento não linear da tensão de cisalhamento à medida que a taxa de cisalhamento aumentou (PACHECO *et al.*, 2023). Tais resultados são tradicionalmente observados neste tipo de amostra devido à quebra da rede proteica (RAO, 1999).

Figura 10 - (A), (B) e (C) Tensão de cisalhamento (σ , Pa) *versus* Taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) a 5 °C das amostras de kefir sem e com luteína com 1, 20 e 40 dias de armazenamento, respectivamente. (D), (E) e (F) Viscosidade aparente (η , Pa s) *versus* taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) das amostras de kefir sem e com luteína a 5 °C com 1, 20 e 40 dias de armazenamento, respectivamente.

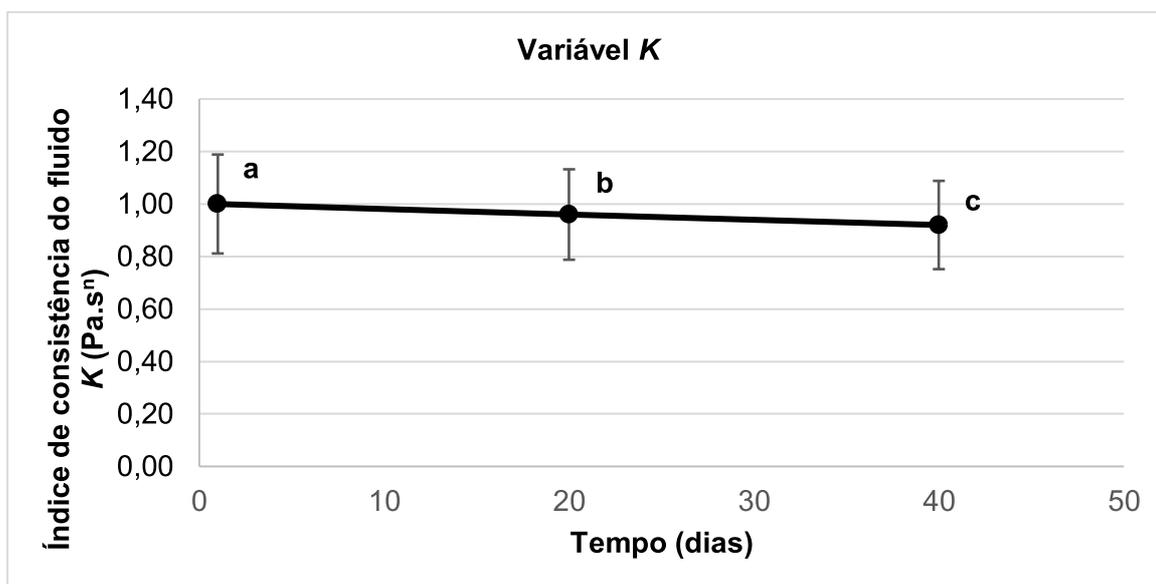


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Para corroborar as observações qualitativas da Figura 10, esses dados experimentais foram bem ajustados ao modelo de Ostwald-de-Waele ($R^2 > 0,99$), e os parâmetros reológicos obtidos do modelo (índice de consistência (K) e índice de

comportamento de fluxo (n) para cada amostra são mostrados na Figura 11 e Tabela 7. De modo geral, as amostras de kefir sem e com luteína apresentaram índice de consistência (K) acima de zero ($K > 0$) e n abaixo de um ($n < 1$) independente do tempo de armazenamento, confirmando um comportamento pseudoplástico durante o escoamento (STEFFE, 1996).

Figura 11 – Médias do índice de consistência do fluido (K) das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.



Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as diferentes amostras de kefir ao longo do período de armazenamento pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

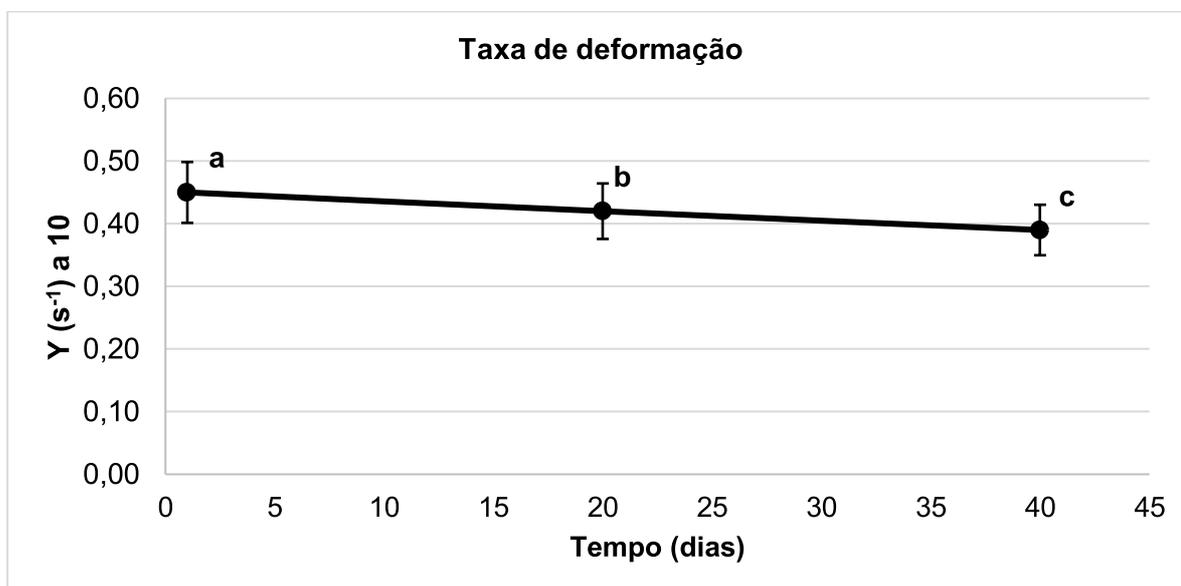
Tabela 7 – Médias do índice de comportamento do fluxo (n) das amostras de kefir sem e com luteína avaliadas a 5 °C, após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.

ÍNDICE DE COMPORTAMENTO DO FLUXO (n)		
Dia	Sem luteína	Com luteína
1	0,63 ± 0,00 ^{Aa}	0,67 ± 0,06 ^{Aa}
20	0,52 ± 0,03 ^{Ab}	0,66 ± 0,05 ^{Aab}
40	0,50 ± 0,02 ^{Ab}	0,62 ± 0,06 ^{Ab}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$); médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 12 – Médias da taxa de deformação γ (s^{-1}) a 10 das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.



Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as diferentes amostras de kefir ao longo do período de armazenamento pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 8 – Médias da taxa de deformação γ (s^{-1}) a 50 e γ (s^{-1}) a 100 das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.

Dia	TAXA DE DEFORMAÇÃO			
	γ (s^{-1}) a 50		γ (s^{-1}) a 100	
	Sem luteína	Com luteína	Sem luteína	Com luteína
1	0,28 ± 0,01 ^{Aa}	0,25 ± 0,01 ^{Ba}	0,21 ± 0,01 ^{Aa}	0,20 ± 0,00 ^{Ba}
20	0,23 ± 0,01 ^{Ab}	0,18 ± 0,01 ^{Bb}	0,18 ± 0,01 ^{Ab}	0,15 ± 0,00 ^{Bb}
40	0,22 ± 0,02 ^{Ab}	0,16 ± 0,01 ^{Bb}	0,16 ± 0,01 ^{Ab}	0,14 ± 0,02 ^{Bb}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Em relação ao tempo de armazenamento, observou-se uma redução no índice de consistência e índice de comportamento de fluxo ($p < 0,05$) para todas as amostras de kefir, sendo mais intenso nas amostras sem adição de luteína (K – redução máxima de ~8% e n – redução máxima de ~21% após 40 dias) do que naquela adicionada de luteína (K – redução máxima de ~7% e n – redução máxima de ~7% após 40 dias)

($p < 0,05$). Por outro lado, o tempo de armazenamento ocasionou redução da viscosidade aparente mais intenso na amostra com adição de luteína (η_{app} – redução máxima de ~14% a γ (s^{-1}) de 10 após 40 dias) quando comparada com a amostra sem adição de luteína (η_{app} – redução máxima de ~12% a γ (s^{-1}) de 10 após 40 dias). Tais reduções desses parâmetros durante o armazenamento também foram observados em outros estudos (PACHECO *et al.*, 2023) e pode ser justificado por alterações na estrutura da rede proteica, devido à sinérese, proteólise causada por proteases residuais, bem como pela redução do pH para valores abaixo do ponto isoelétrico da caseína enfraquecendo a rede proteica (TAMIME; ROBINSON, 2007).

Especificamente, notou-se que o tratamento (sem ou com luteína) não influenciou significativamente ($p > 0,05$) nos valores de K e n , mas o tempo influenciou significativamente ($p < 0,05$), ocorrendo uma redução ao longo do tempo. Em relação os valores de n , o kefir sem luteína com 1 dia de fabricação se diferenciou do com 20 e 40 dias de fabricação, sendo que com 20 e 40 dias eles não se diferenciaram entre si ($p > 0,05$). Já o kefir com luteína com 1 dia de fabricação só diferenciou significativamente ($p < 0,05$) do kefir com 40 dias de fabricação. Além disso, observou-se que a viscosidade aparente com taxa de cisalhamento γ (s^{-1}) a 10 também não alterou com a adição de luteína ($p > 0,05$), mas ambos os kefir sem e com luteína reduziram a viscosidade ao longo do tempo de armazenamento.

Analisando a viscosidade aparente do kefir com taxa de cisalhamento γ (s^{-1}) a 50 e 100, o kefir sem e com luteína se diferenciaram ($p < 0,05$), e ambas as amostras com 1 dia de fabricação se diferenciaram das com 20 e 40 dias de fabricação, sendo que com 20 e 40 dias elas não se diferenciaram entre si ($p > 0,05$).

As propriedades reológicas de lácteos fermentados como o kefir depende das características do gel formado durante a fermentação, bem como a adição de aditivos como a luteína (BATISTA *et al.*, 2006; AHMAD *et al.*, 2023). As proteínas do leite (micelas de caseínas e proteínas do soro desnaturadas) agem formando uma rede tridimensional na fase dispersa que aprisiona moléculas de água, permitindo a estruturação, espessamento e aumento da estabilidade do produto (WALSTRA; WOUTERS; GEURTS, 2006). Considerando que a luteína possui dois grupos hidroxila terminais (BATISTA *et al.*, 2006), alguma competição com moléculas de proteína por locais de ligação à interface pode ser esperada, alterando a estrutura tridimensional do gel (MEDINA *et al.*, 2023). Além disso, a luteína é de natureza hidrofóbica e pode se ligar aos domínios hidrofóbicos de proteínas e lipídios (SOBRAL *et al.*, 2016).

A concentração de luteína (0,06%) utilizada neste estudo, analisada nas taxas de cisalhamento γ (s^{-1}) a 50 e a 100, foi suficiente para causar um impacto significativo nas interações existentes que estabilizam o gel proteico, e conseqüentemente, alterou os parâmetros reológicos do kefir.

5.6 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO*

Os resultados das análises de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante *in vitro* por dois métodos diferentes ABTS (radicais catiônicos e hidrofílicos) DPPH (radicais aniônicos e lipofílicos) das amostras de kefir adicionadas ou não de luteína são mostradas na Tabela 9.

Tabela 9 – Médias dos compostos fenólicos totais da luteína pura e das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.

COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (mg EAG/100g)			
Dia	Luteína pura	Sem luteína	Com luteína
1	39,21 ± 0,38 ^{Aa}	19,98 ± 0,27 ^{Ca}	31,28 ± 0,28 ^{Ba}
20	37,62 ± 0,41 ^{Ab}	16,30 ± 0,32 ^{Cb}	27,40 ± 0,37 ^{Bb}
40	33,80 ± 0,68 ^{Ac}	13,89 ± 0,56 ^{Cc}	23,58 ± 1,13 ^{Bc}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. mg EAG/100g: mg de equivalente em ácido gálico por 100g de amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Tabela 10 – Médias da capacidade antioxidante *in vitro* por dois métodos ABTS e DPPH da luteína pura e das amostras de kefir sem e com luteína após 1, 20 e 40 dias de armazenamento.

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> ($\mu\text{mol ET}/100\text{g}$)						
ABTS				DPPH		
Dia	Luteína pura	Sem luteína	Com luteína	Luteína pura	Sem luteína	Com luteína
1	116,87 \pm 0,29 ^{Aa}	46,33 \pm 0,34 ^{Ca}	98,71 \pm 0,73 ^{Ba}	62,12 \pm 0,23 ^{Aa}	38,99 \pm 0,17 ^{Ca}	49,49 \pm 0,40 ^{Ba}
20	101,66 \pm 0,71 ^{Ab}	41,65 \pm 0,63 ^{Cb}	91,55 \pm 0,55 ^{Bb}	57,62 \pm 0,58 ^{Ab}	31,45 \pm 0,45 ^{Cb}	43,64 \pm 0,53 ^{Bb}
40	96,88 \pm 0,61 ^{Ac}	38,30 \pm 0,76 ^{Cc}	88,21 \pm 0,61 ^{Bc}	52,41 \pm 0,45 ^{Ac}	28,62 \pm 0,71 ^{Cc}	39,28 \pm 0,54 ^{Bc}

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si ($p < 0,05$), médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$: μmol de equivalente em Trolox por 100g de amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Em relação aos compostos fenólicos totais, foi observado que a adição de luteína ao kefir aumentou significativamente ($p < 0,05$) o teor de compostos fenólicos (aumento de ~57%) do kefir, o que é esperado devido ao elevado teor de compostos fenólicos apresentado pela luteína pura (39,21 EAG/ 100 g de amostra). Por outro lado, durante o tempo de armazenamento, foi observada redução de compostos fenólicos em ambas as amostras de kefir, provavelmente devido à degradação da amostra e oxidação da luteína, sendo esta última observada pela redução no teor de compostos fenólicos da luteína pura de 4 e 14% após 20 e 40 dias de armazenamento, respectivamente. No entanto, os resultados do kefir contendo luteína teve uma redução menor (máximo de 12% e 24% após 20 e 40 dias de armazenamento, respectivamente) em comparação com o kefir sem luteína (máximo de 18% e 30% após 20 e 40 dias de armazenamento, respectivamente). Esse resultado é interessante e possivelmente se deve as macromoléculas do leite, principalmente micelas de caseína e dos glóbulos de gordura, conferiram fotoproteção a luteína, devido à complexação entre as macromoléculas e luteína, corroborando com os resultados de cor.

Em relação à capacidade antioxidante *in vitro*, os resultados mostraram comportamento semelhante ao obtido para os compostos fenólicos totais, ou seja, a

adição de luteína ao kefir aumentou significativamente ($p < 0,05$) atividade antioxidante do kefir, independentemente do método de medida (radical ABTS ou DPPH), com reduções ao longo da vida de prateleira para todas as amostras de kefir. Novamente, esse resultado é esperado devido a elevada capacidade antioxidante apresentado pela luteína pura (116,87 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ de amostra por ABTS e 62,13 $\mu\text{mol ET}/100\text{g}$ de amostra por DPPH), que teve reduções com o tempo de armazenamento, assim como observado para compostos fenólicos totais. Nota-se que ambas as amostras apresentaram valores similares de redução para análise de ABTS (até 17% e 11% após 40 dias de armazenamento para as amostras sem luteína e com luteína, respectivamente), enquanto para a análise de DPPH, a amostra sem luteína apresentou maior redução após 20 dias de armazenamento (redução de 19%) e a amostra com luteína apresentou maior redução após 40 dias de armazenamento (redução de 20%). Sobral *et al.* (2016) observaram que a adição de luteína ao queijo prato levou a um aumento da atividade antioxidante.

De forma geral, observou-se que o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* do kefir com luteína foi menor que o da luteína pura, provavelmente devido a interação da luteína com as macromoléculas do leite, tornando-as indisponíveis para quantificação/determinação a partir dos métodos de análise utilizados. Apesar disso, a luteína aumentou a qualidade funcional do produto, o que permite a inserção deste produto no mercado voltado para as macrotendências de funcionalidade, qualidade nutricional e sensorialidade.

5.7 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE MICROBIOLÓGICA

A Tabela 11 apresenta os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras de kefir.

Tabela 11 - Contagens médias (UFC/g) de coliforme a 30 e 45 °C, fungos filamentosos e leveduras e bactérias lácticas das amostras de kefir sem e com luteína após 2 e 42 dias de armazenamento a 5 °C.

Dia	Tratamento	Contagens médias (UFC/g)			
		Coliformes a 30 °C	Coliformes a 45 °C	Fungos filamentosos e leveduras	Bactérias lácticas
2	Sem luteína	<1,0 x 10 ¹ est.	<1,0 x 10 ¹ est.	1,4 x 10 ³	1,4 x 10 ⁷
	Com luteína*	<1,0 x 10 ¹ est.	<1,0 x 10 ¹ est.	1,9 x 10 ³	1,2 x 10 ⁷
42	Sem luteína	<1,0 x 10 ¹ est.	<1,0 x 10 ¹ est.	1,1 x 10 ⁵	6,6 x 10 ⁶
	Com luteína*	<1,0 x 10 ¹ est.	<1,0 x 10 ¹ est.	4,1 x 10 ³	5,6 x 10 ⁶

Legenda: * média de quatro repetições; est: estimado.

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Os resultados da Tabela 11 mostram que as amostras analisadas de kefir sem ou com luteína apresentaram contagens de coliformes a 30 e 45 °C menores que os limites de detecção das técnicas utilizadas, ou seja, <1,0 x 10¹ UFC/g (estimado) após 2 e 42 dias de armazenamento a 5 °C. A Instrução Normativa (IN) nº 46, de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para leites fermentados, incluindo o kefir, estabelece o seguinte critério microbiológico para a contagem de coliformes a 30 °C por grama do produto: n=5; c=2; m=10¹; M=10², ou seja, dentro de 5 amostras, somente duas unidades amostrais podem apresentar contagens entre 10¹ e 10² UFC/g e nenhuma unidade amostral pode apresentar contagem maior que 10² UFC/g. Já para a contagem de coliformes a 45 °C, a IN nº 46 determina: n=5; c=2; m=<3; M=10¹, ou seja, dentro de 5 amostras, somente duas unidades amostrais podem apresentar contagens inferiores ou iguais a 3 e nenhuma unidade amostral pode apresentar contagem maior que 10¹ UFC/g (BRASIL, 2007). Portanto, considerando estes critérios microbiológicos, o kefir elaborado atende à legislação vigente.

As contagens de fungos filamentosos e leveduras do kefir sem e com luteína após 2 dias de fabricação foram da ordem de 10³ UFC/g, bem como do kefir com luteína após 42 de armazenamento a 5 °C. Por outro lado, o kefir sem luteína após 42 dias de refrigeração apresentou contagem de 1,1 x 10⁵ UFC/g (Tabela 9). Vale ressaltar que todas as colônias presentes nos *Petrifilms 3M™ Yeast and Mold Count Plate* de todas as amostras de kefir analisadas eram características de leveduras, sendo pequenas, redondas com bordas definidas, com coloração creme ou azul-

esverdeadas. A IN nº 46 citada acima também traz os critérios microbiológicos para a contagem de leveduras específicas, sendo no mínimo 10^4 UFC/g (BRASIL, 2007). Assim, somente a amostra de kefir sem luteína após 42 dias de armazenamento a $5\text{ }^\circ\text{C}$ está de acordo com a legislação vigente. Nas amostras de kefir após 2 dias de fabricação, independentemente da presença ou não de luteína, possivelmente, o tempo de fermentação do produto pode não ter sido suficiente para atingir o número mínimo de leveduras, apesar de ter atingido 0,9% de ácido láctico (m/v) para a quebra da coalhada. Além disso, após 42 dias, o kefir sem luteína apresenta leveduras da ordem de 10^5 UFC/g diferentemente do kefir com luteína que apresenta em média $4,1 \times 10^3$ UFC/g. Uma hipótese é que a luteína tenha atividade antifúngica, o que ainda não foi relatado na literatura. Entretanto, alguns autores já verificaram que este composto apresenta atividade antibacteriana *in vitro* contra *Pseudomonas aeruginosa* (SAMPATHKUMAR *et al.*, 2019), *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* sorovar. Typhi e *Staphylococcus aureus* (KUSMIATI *et al.*, 2021).

As contagens de bactérias lácticas das amostras de kefir sem e com luteína após 2 dias de fabricação foram da ordem de 10^7 UFC/g, atendendo ao requisito da IN nº 46 de no mínimo 10^7 UFC/g de bactérias lácticas (BRASIL, 2007). Entretanto, após 42 dias de estocagem a $5\text{ }^\circ\text{C}$, o kefir sem e com luteína apresentaram contagens da ordem de 10^6 UFC/g, não atendendo à IN nº 46 que estabelece que esta contagem mínima de 10^7 UFC/g bactérias lácticas devem ser mantidas viáveis durante todo o prazo de validade do produto (BRASIL, 2007). Além disso, como o kefir sem luteína também não atendeu à legislação, não é possível afirmar que a luteína inibiu a multiplicação deste grupo de bactérias. Entretanto, essa redução em relação as contagens iniciais podem ser devido a outras características do produto, tais como acidez, pH, presença de compostos do metabolismo microbiano, entre outros que inibiram as bactérias lácticas (PERES, 2019). De acordo com Hill *et al.* (2014), as contagens para que um produto apresente características benéficas a saúde do consumidor deve ser de no mínimo 10^6 UFC/g e segundo Moraes *et al.* (2017), as bactérias lácticas presentes no kefir podem agir como probióticos. Sendo assim, o kefir sem e com luteína pode ser um alimento que confira benefícios a saúde dos consumidores.

5.8 ANÁLISE SENSORIAL

O teste de aceitação do kefir com luteína foi realizado com 184 provadores não treinados, utilizando-se uma escala hedônica de nove pontos (STONE; SIDEL, 1985).

Análise sensorial foi conduzida, de modo a avaliar o grau de atratividade do kefir adicionado de luteína perante os consumidores. Os testes foram conduzidos após 2, 13, 22, 34 e 42 dias de armazenamento das bebidas à $5 \pm 1^\circ\text{C}$.

A Tabela 12 apresenta os dados dos índices de aceitabilidade das amostras de kefir adicionadas de luteína.

Tabela 12 – Pontuação média e desvio padrão da aceitação sensorial das amostras de kefir com luteína avaliadas durante o período de armazenamento. Valores médios \pm desvio padrão.

Tempo (dias)	Nº de provadores	Média de aceitação (média \pm DP)
2	36	6,61 \pm 1,92 ^a
13	36	5,93 \pm 0,98 ^a
22	36	6,00 \pm 1,93 ^a
34	39	6,92 \pm 1,48 ^a
42	37	6,76 \pm 1,64 ^a
Geral	184	6,44 \pm 0,45

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si quanto a preferência, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade ($p > 0,05$).

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

As médias dos 36 provadores (aproximadamente) no teste de aceitação das amostras de kefir com luteína após 2, 22, 34 e 42 dias de armazenamento oscilaram entre “gostei moderadamente” e “indiferente”.

Na escala hedônica de 9 pontos, a aceitação média do kefir adicionado de luteína variou entre 5,93 a 6,92 pontos ao longo do tempo de estocagem. A análise de variância (ANOVA) realizada com os escores obtidos no teste de aceitação (Tabela 12), verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias durante os tempos analisados 2, 13, 22, 34 e 42 dias.

Não foi informado aos provadores sobre os benefícios nutricionais e de saúde advindos do consumo desse produto, ainda assim o kefir com luteína apresentou boa

aceitação sensorial, com média geral de 6,44. Outro ponto importante é que os provadores não treinados foram os estudantes do curso de Tecnologia em Laticínios e que talvez não sejam consumidores frequentes de kefir, pois no Brasil, o kefir ainda é uma bebida pouco comercializada e conseqüentemente pouco conhecida em comparação com os iogurtes e bebidas lácteas fermentadas, mas mesmo assim, a variabilidade dos resultados não foi significativa.

Segundo Vasconcelos *et al.* (2013), a qualidade sensorial aliada à funcionalidade do produto pode representar efeito muito promissor no mercado, pois atendem à demanda de consumidores por produtos saudáveis.

Em estudo realizado por Weschenfelder (2009), onde foram avaliadas a aceitabilidade de três formulações alimentares lácteas tipo antepasto, a base de kefir leban (e a fase sólida do kefir), também constataram que a acidez do kefir pode interferir na aceitabilidade das amostras.

A adição de açúcar a 6% pode ter auxiliado na melhor aceitação do produto uma vez que o kefir apresenta sabor ácido, decorrente da ação de bactérias e leveduras (OTLES; CAGINDI, 2003), que pode não ser apreciado por aqueles que nunca tiveram contato prévio. Porém, neste estudo, mesmo as formulações apresentando elevada acidez, a aceitação foi satisfatória, o que reforça o afirmado por O'Brien *et al.* (2017) de que além dos consumidores que desaprovam os produtos ácidos, existem muitos outros que desfrutam da acentuada acidez e perfil de sabor complexo associado ao kefir tradicional.

A positividade dos testes de aceitação ao longo do período de armazenamento demonstra que o kefir adicionado de luteína apresenta-se como uma alternativa tecnológica promissora de inovação no segmento de leites fermentados.

6 CONCLUSÃO

Pela primeira vez foi avaliada a adição da luteína ao kefir de leite e seus impactos nas características de qualidade do produto durante o armazenamento. A composição físico-química do kefir atendeu aos critérios da Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 do MAPA. A adição de luteína ao kefir, trouxe cor ao produto o que aumenta a atratividade e aceitação do produto, principalmente pensando no público infantil. De modo geral, a adição de luteína teve pouca influência na CRA e nas propriedades reológicas do kefir durante o armazenamento. A luteína foi capaz de aumentar o teor dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante *in vitro* das amostras de kefir, com perda significativamente menores desses compostos durante o armazenamento em comparação com as amostras de kefir sem luteína. A contagem de bactérias lácticas inicial atendeu a legislação, porém não permaneceram viáveis ao longo do período de estocagem, existe alguns ajustes tecnológicos que talvez possa solucionar, como regular o tempo de fermentação e a dosagem do fermento. Na avaliação sensorial realizada o kefir com luteína foi bem aceito pelos provadores, resultado importante para avaliações futuras de um possível desenvolvimento em escala industrial. A partir dos resultados obtidos neste estudo é possível concluir que a adição de luteína tornou o kefir ainda mais funcional e atrativo quando pensamos no novo perfil de consumidores que cada vez mais procuram por alimentos com propriedades funcionais. O kefir desenvolvido é promissor e encoraja novas investigações, usando a luteína como ingrediente antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHANTA, K.; ARYANA, K.; BOENEKE, C. A. Fat free plain set yogurts fortified with various minerals. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 424-429, 2007.
- AHMAD, I. *et al.* Physicochemical, rheological and antioxidant profiling of yogurt prepared from non-enzymatically and enzymatically hydrolyzed potato powder under refrigeration. **Food Science and Human Wellness**, v. 12, n. 1, p. 69-78, 2023.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 1-9, 2007.
- BARBERO, M. M. D. *et al.* Estimação de parâmetros genéticos na produção leiteira em bovinos girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v. 23, 2022.
- BARROS, R. F. *et al.* Lutein as a functional ingredient in sheep milk yogurt: development, characterization and extraction recovery. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 683-690, 2020.
- BATISTA, A. P. *et al.* Rheological characterization of coloured oil-in-water food emulsions with lutein and phycocyanin added to the oil and aqueous phases. **Food Hydrocolloids**, v. 20, n. 1, p. 44-52, 2006.
- BATISTA, B. **Chlorella sorokiniana como biofábrica para produção de luteína: uma revisão a partir da engenharia metabólica**. 2022. 45 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Biotecnologia, Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.
- BEMFEITO, C. M. *et al.* Carotenoides em alimentos: fatores interferentes na biossíntese e estabilidade frente ao processamento. *In*: CORDEIRO, C.A.M. (Org.). **Tecnologia de alimentos: tópicos físicos, químicos e biológicos**. Guarujá: Científica Digital, 2020. v.1, p. 445-465.
- BHUSHAND, D.M. *et al.* Microwave processing of milk: A review. *In* **Processing technologies for milk and milk products: Methods, applications, and energy usage**; A.K. Agrawal, M.R. Goyal, Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2017; p. 219 – 251.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BISULCA, C. *et al.* Variation in the deterioration of fossil resins and implications for the conservation of fossils in amber. **American Museum Novitates**, n. 3734, p. 19, 2012.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto Nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamenta a Lei Nº 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei Nº 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. **Diário Oficial União**. 30 mar., 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 out., 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 22-31, 11 mar., 1996.

BRASIL. Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificação e emprego. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 28 out., 1997.

BRASIL, F. A. **Principais defeitos de sabor do leite e suas causas**. 2010. Monografia (Especialização *Lato sensu* em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) – Instituto Qualittas de Pós-Graduação, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://docplayer.com.br/6702941-Principais-defeitos-de-sabor-do-leite-e-suas-causas.html>. Acesso em 29 set. 2023.

BUSCEMI, S. *et al.* The effect of lutein on eye and extra-eye health. **Nutrients**, v. 1, p.1321-1345, 2018.

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

CASAGRANDE, A. **A produção de leite e seus desafios**. 2021. Disponível em: <https://animalbusiness.com.br>. Acesso em: 01 de nov. 2022.

CASSANEGO, D. *et al.* Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria. **Food Science and Technology**, v. 38, p. 59-65, 2018.

CASTRO, P. M. de. **Produção bovina leiteira no Brasil: revisão bibliográfica**. 2023. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Agrônoma, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Jaboticabal, 2023.

CHANDRASEKARAN, S.; RAMANATHAN, S.; BASAK, T. Microwave food processing - A review. **Food Research International**, v. 52, n.1, p. 243-261, 2013.

CHAVES, J. B. P.; SPROESSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: Editora UFV, 2005.

CHOI, M., KIM, G., LEE, H. Effects of ascorbic acid retention on juice color and pigment stability in blood orange (*Citrus sinensis*) juice during refrigerated storage. **Food Research International**, v. 35, n. 8, p. 753-759, 2002.

CONTE, F. A. Efeitos do consumo de aditivos químicos alimentares na saúde humana. **Revista Espaço Acadêmico**, v. 16, n. 181, p. 69-81, 2016.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 3.ed. atual. e ampl., São Paulo: Manole, 2009, 1172p.

CRUZ, A. G. *et al.* **Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

CRUZ, A.G. *et al.* **Química, Bioquímica, Análise Sensorial e Nutrição no Processamento de Leite e Derivados**. Coleção Lácteos. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

DALLAS, D. C.; TRABER, M. G. How does breast milk enhance lutein absorption? **Journal of Nutrition**, v. 148, n. 1, p. 1–2, 2018.

D'ANGELIS, D.F. *et al.* Elaboração, caracterização físico-química e sensorial de leite fermentado de kefir aromatizado com frutas verdes e adicionado de inulina. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 9, 2020.

DE CAMARGO, A. C. T. *et al.* Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 3073-3084, 2012.

DERTL, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT – Food Science and Technology**. v. 85, p.151-157, 2017.

DIMA, I. G. *et al.* Binding mechanisms between lycopene extracted from tomato peels and bovine β -lactoglobulin. **Journal of Luminescence**, v. 203, p. 582–589, 2018.

EFSA. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. **Efsa Journal**, v. 16, n. 3, 2018.

EMBRAPA. Anuário leite 2023: leite baixo carbono. **Anuário Leite 2023**. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/1154264/1/Anuario-Leite-2023.pdf>. Acesso em: 16 de outubro de 2023.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Córdoba, 2001.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.** Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, p. 1–11, 2002.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). **Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation.** FAO Food and nutrition Paper n. 85, 2006.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin.** v. 1, n. 2, p.1-17, 2005.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E. *et al.* Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, p. 438–450, 2012.

FERRARI, A.; VINDEROLA, G.; WEILL R. **Alimentos fermentados, microbiología, nutrición, salud y cultura.** 1ª ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Instituto Danone del Cono Sur, 2020.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.38, n.2, p.109-112, 2014.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 228-265, 2004.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of brazilian valencia orange juice. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1686–1690, 2007.

GARCIA, R. V. *et al.* Acceptability and sensory preference of cheese curds elaborated with female buffalo, goat and cow milk. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 363, n. 63, p. 12-16, 2008.

GOMES, L. M. M. **Inclusão de Carotenoides de Pimentão Vermelho em Ciclodextrinas e Avaliação da Sua Estabilidade, Visando Aplicação Em Alimentos.** 2012. 108p. Dissertação (Mestre em Ciências Aplicadas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

GONZÁLEZ-OROZCO, B. *et al.* Invited review: Milk kefir microbiota—Direct and indirect antimicrobial effects. **Journal of Dairy Science**, v. 105, 2022.

GUZEL-SEYDIM, Z. *et al.* A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science & Technology**, v. 113, p. 42-53, 2021.

HANDELMAN, G. J. *et al.* Luteína and zeaxantina concentrations in plasma after dietary supplementation with egg gema. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p. 247-251, 1999.

HATMAL, M. M. *et al.* Exploring the influence of culture conditions on kefir's anticancer properties. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 3771–3777, 2018.

HERNÁNDEZ-CARRANZA, P. *et al.* Antioxidant fortification of yogurt with red cactus pear peel and its mucilage. **CyTA-Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 824-833, 2019.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 153, p. 582-587, 2003.

HILL, C. *et al.* Declaração de consenso da Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos sobre o escopo e o uso apropriado do termo probiótico. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

HOJNIK, M., SKERGET, M., ZELJKO, K. Extraction of Lutein from Marigold Flower Petals – Experimental Kinetics and Modelling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p. 2008-2016, 2008.

IRMÃO, J. S.; COSTA M. R. Conhecimento e hábitos de consumo de kefir na comunidade acadêmica da UFSM. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n.1, p.27-36, 2018.

ISLAS, R. P. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. **Avances en Nutrición Acuicola**, 2002.

KUSMIATI *et al.* Antibacterial and antioxidant activity test of crude lutein extracted from sunflower (*Helianthus annuus* L.). **AIP Conference Proceedings**, v. 2331, n. 1, 2021.

LeBLANC, A. M. *et al.* Study of Immune Cells Involved in the Antitumor Effect of Kefir in a Murine Breast Cancer Model. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1920-1928, 2007.

LIANG, L; SUBIRADE, M. β -Lactoglobulin/Folic Acid Complexes: Formation, Characterization, and Biological implication. **Journal Physical Chemistry**, v.114, p. 6707-6712, 2010.

LIMA, R. N. de *et al.* IMPORTÂNCIA DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) EM PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, n. 4 p. 1307-1331, 2018.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interfaces Science**, v. 15, p. 73–83, 2010.

MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of Natural Medicines**, v. 74, p. 1-76, 2020.

MEDINA, L. *et al.* Effects of carao (*Cassia grandis* L.) on physico-chemical, microbiological and rheological characteristics of yogurt. **LWT**, v. 183, 2023.

MERCADANTE, A. Z. Carotenoids in Foods: Sources and stability during processing and storage. *In*: SOCACIU, C. **Food Colorants: Chemical and Functional Properties**. CRC Press, Boca Raton, p.213-240, 2008.

MESQUITA, S. da S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoids: properties, applications and market. **Revista Virtual de Química**, p. 672-688, 2017.

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

MUNOZ, I. *et al.* Dielectric properties of milk during ultra-heat treatment. **Journal of Food Engineering**, v. 219, p. 137-146, 2018.

MORA-GUTIERREZ, A. *et al.* Complexes of lutein with bovine and caprine caseins and their impact on lutein chemical stability in emulsion systems: Effect of arabinogalactan. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 1, p.18-27, 2018.

MORAIS, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: Definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 99-112, 2006.

MORAES, M. S. *et al.* Efeitos funcionais dos probióticos com ênfase na atuação do kefir no tratamento da disbiose intestinal. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 14, n. 37, p. 144-156, 2017.

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físicoquímica de variedades de urucueiros in natura e encapsulado**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação "Stricto Sensu", Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2013.

MORETTI, A. F. *et al.* Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization. **Future Foods**, v. 5, p. 100-123, 2022.

NACHTIGALL, A. M. **Extração, Saponificação e Atividade Antioxidante de Luteína Obtida de Flores de *Tagetes patula* L. and *Calendula officinalis* L.** 2007. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

NAGAO, A. Bioavailability of dietary carotenoids: Intestinal absorption and metabolism. **Japan Agricultural Research Quarterly**, v. 48, n. 4, p. 385–392, 2014.

NÖRNBERG, M. L. *et al.* Compostos bioativos em manteigas: carotenoides e ácidos graxos Bioactive compounds in butters: carotenoids and fatty acids. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 2, p. 10270-10288, 2022.

O`BRIEN, K. *et al.* Short communication: Sensory analysis of a kefir product designed for active cancer survivors. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 4349-4353, 2017.

ORIENTE, S. F. do *et al.* Potential probiotic goat yogurt – a review. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 5, p. e13712541584, 2023. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/41584>. Acesso em: 24 dec. 2023.

OLSON, J. A. Vitamin A. *In*: ZIEGLER, E. E., FILER, L. J. **Present Knowledge in Nutrition**. 7. ed., Washigton: ILSI Press, 1996, p. 109-119.

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

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

PACHECO, F. C. *et al.* Impact of ultrasound-assisted fermentation on buffalo yogurt production: Effect on fermentation kinetic and on physicochemical, rheological, and structural characteristics. **Applied Food Research**, v. 3, n. 2, 2023.

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

PARODI, P. W. A ação cooperativa de componentes bioativos na gordura do leite com PPARs pode explicar suas propriedades antidiabéticas. **Hipóteses Médicas**, v. 89, n. 2, p. 1-7, 2016.

PARVEZ, S. *et al.* Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171-1185, 2006.

PASSOS, F. R. *et al.* Ethanol production from carrot by-products. **Revista de Ciências Agrárias (Portugal)**, v. 40, n. 1, p. 3-11, 2017.

PRECI, D. *et al.* Desenvolvimento de iogurte *light* com extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) e adição de probióticos. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 27-38, 2011.

PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Dietary antioxidants: chemical and biological importance. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição**, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.

PEREIRA, D. B. C. *et al.* **Físico-química do leite e derivados** – Métodos analíticos. 2. ed. revisada e ampliada. Juiz de Fora-MG: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda., 2001. 234 p.

PERES, M. P. da S. **Desenvolvimento e viabilidade de bactérias ácido láticas na bebida láctea fermentada em diferentes tempos**. 2019. Monografia (Graduação) – Faculdade de Medicina Veterinária, Centro Universitário do Planalto Central Aparecido dos Santos, Gama, 2019.

POZZO, D. N. O perfil do consumidor de alimentos funcionais: um estudo bibliográfico das tendências mundiais. **Revista Cadeia Produtiva**, v. 1, n. 1, p. 1-15, 2012.

PRAZNIKAR, Z. J. *et al.* Effects of kefir or milk supplementation on zonulin in overweight subjects. **Journal of Dairy Science**, v. 103, p. 3961-3970, 2020.

PREUSS, M. B. *et al.* Ácido linoleico conjugado: uma breve revisão. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 3, n. 2, 2013.

QUIRÓS, A. R.; COSTA, H. S. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: a review. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 2-3, p. 97-111, 2006.

RABÊLO, C. A. C. *et al.* Quantificação da microbiota presente em produtos lácteos industrializados comercializados como probióticos. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar**, v. 3, n. 5, p. e351418, 2022. Disponível em: <https://recima21.com.br/index.php/recima21/article/view/1418>. Acesso em: 20 out. 2023.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications**. New York: An Aspen Publication, 1999. 433p.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, A. S.; PREICHARDT, L. D.; RICHARDS, N. S. P. S. Estudo das características de potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de Kefir produzido artesanalmente. *In*: RICHARDS, N. S. P. S. **Produtos Lácteos: Desenvolvimento & Tecnologia**. 2020.

RICHARDS, N. S. P. S.; KINDLEIN, L.; BRACCINI, V. P. Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos: kefir é um leite fermentado com potencial probiótico? *In*: VERRUCK, S. **Avanços em ciência e tecnologia de alimentos**. Brasil: Científica Digital, 2022, p. 275-294. Disponível em: <https://www.editoracientifica.com.br/books/livro-avancos-em-ciencia-e-tecnologia-de-alimentos-volume-6>. Acesso em: 12 mar. 2023.

ROBERTS, R. L.; GREEN, J.; LEWIS, B. Lutein and zeaxanthin in eye and skin health. **Clinics in Dermatology**, v.27, p. 195-201, 2009.

ROCHA, J. de C. G. **Adição de corantes naturais antocianinas e luteína em bebidas formuladas com proteínas de soro de leite**. 2013. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Tecnologia de Laticínios, Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

RODÍC, Z. *et al.* Determination of lutein by high-performance thin-layer chromatography using densitometry and screening of major dietary carotenoids in food supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1231, p. 59-65, 2012.

RODRÍGUEZ – ALCALÁ, L. M. *et al.* Milk fat componentes with potential anticancer activity – a review, **Bioscience Reports**, v. 37, n. 2, 2017.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. 1. ed. Washington: ILSI – International Life Sciences Institute, 2001. 64p.

ROODENBURG, A. J. C. *et al.* Amount of fat in the diet effects bioavailability of lutein esters but not of α -carotene, β -carotene, and vitamin E in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1187-1193, 2000.

SAMPATHKUMAR, S. J. *et al.* Lutein: A potential antibiofilm and antiquorum sensing molecule from green microalga *Chlorella pyrenoidosa*. **Microbial Pathogenesis**, v.135, 2019.

SHARIFI, M. *et al.* Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, v. 34, n. 183, 2017.

SILVA, C. E. L. **Termodinâmica de interação entre betacaroteno e proteínas do leite**: termodinâmica de interação entre betacaroteno e proteínas do leite. 2015. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências e Tecnologia de Laticínios, Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

SILVA, M. L. C. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-681, 2010.

SILVA, M. T. da. *et al.* Avaliação de Bioativos e Atividade Antioxidante de logurte Adicionado de Frutos de Jambolão. *In*: VIII SIMPOSIO DE ALIMENTOS PARA A REGIÃO SUL, 8. 2013, Passo Fundo. **Anais eletrônicos** [...] Passo Fundo. Disponível em:

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwii5e3924D5AhV0F7kGHbh9CTcQFnoECAMQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.upf.br%2F_uploads%2FConteudo%2Fsimposio-sial-anais%2F2013%2Fciencia%2Fc103.pdf&usg=AOvVaw3IN6nGFXgs_OIR_RryQY7N

Acesso em: 17 jul. 2022.

SILVA, N. *et al.* **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blucher, 2017.

SILVA, R. M. DA; SOUZA, P. G. DE; MARINHO, H. A. Caracterização do leite fermentado não probiótico obtido pela fermentação por bactérias lácteas imobilizadas em alginato de cálcio. **XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA**, 2010. Disponível em:

<https://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/1/39349/1/Ricardo%20Macedo%20da%20Silva.pdf>. Acesso em: 25 set. 2023.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagentes. **American Journal of Ecology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SKERGET, M.; BEZJAK, M.; MAKOVSEK, K.; KNEZ, Z. Extraction of Lutein Diesters from *Tagetes erecta* using supercritical CO₂ and Liquid Propane. **Acta Chimica Slovenica**, v. 57, p. 60-65, 2010.

SOBRAL, D. *et al.* Can lutein replace annatto in the manufacture of Prato cheese? **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 349–355, 2016.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J. L. Kefir e sua tecnologia: aspectos gerais. **Boletim Ital**, v.21, p. 137-155, 1984.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process engineering**. 2. Ed., Michigan: Freeman Press, 1996.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. Redwood: Academic Press, 1985.

STRINGHETA, P. C. *et al.* Luteína: Propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**, v. 17, n. 2, p. 229-238, 2006.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology**. Amsterdam: Elsevier, 2007.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TEIXEIRA, G. A. B. **Desenvolvimento de sorvete de maracujá enriquecido com luteína nanoencapsulada**. 2022. Dissertação (Mestrado em Ciências de Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, University of São Paulo, Pirassununga, 2022.

TERIBIA, N. *et al.* Impact of processing and storage conditions on color stability of strawberry puree: The role of PPO reactions revisited. **Journal of Food Engineering**, v. 294, 2021.

TUREK, K.; WSZOTEK M. Effect of walnut oil on the fatty acid content of probiotic kefir produced either with kefir grains or kefir starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 127, 2022.

TZAVARAS, D.; PAPADELLI, M.; NTAIKOU, I. From Milk Kefir to Water Kefir: Assessment of Fermentation Processes, Microbial Changes and Evaluation of the Produced Beverages. **Fermentation**, v. 8, n. 3, p. 135, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation8030135>. Acesso em: 13 out. 2023.

VASCONCELOS, C. M. *et al.* Desenvolvimento e avaliação sensorial de sobremesa láctea potencialmente simbiótica. **Revista do Instituto de Laticínio Cândido Tostes**, v. 68, n. 391, p. 11-17, 2013.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n.1, p. 157-166, 2009.

XAVIER, A. A. O. *et al.* Desenvolvimento e validação de método espectrofotométrico para determinação de corante à base de luteína adicionado em iogurte desnatado. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 2057-2062, 2012. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422012001000028&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 22 de nov. 2020.

XIMENES, L. F.; SOARES, K. R. Agropecuária: Lácteos. **Caderno Setorial Etene**. Fortaleza: BNB, ano 8, n. 266, fev. 2023.

ZHANG, W.; WANG, J.; LAN, F. Dynamic hand gesture recognition based on short-term sampling neural networks. **Journal of Automatica Sinica**, v. 8, p. 110–120, 2021.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy science and technology**. 2a ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

WESCHENFELDER, S.; **Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorial e atividade anti-*Escherichia coli***. 2009. Dissertação (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

WESCHENFELDER, S. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473–480, 2011.

YEGIN, Z. *et al.* Determination of bacterial community structure of Turkish kefir beverages via metagenomic approach. **International Dairy Journal**, v. 129, p. 105337, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105337>. Acesso em: 13 out. 2023.

YI, J. *et al.* Characterization of milk proteins-lutein complexes and the impact on lutein chemical stability. **Food Chemistry**, v. 200, p. 91–97, 2016.