

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

ROBERTA MARIA LINS MENDES

**INFLUÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE MARACUJÁ SOBRE A VIABILIDADE,
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS DURANTE O ESTOQUE DO
KEFIR**

RECIFE, 2018

Universidade Federal de Pernambuco

Programa de Pós-graduação em Nutrição

Dissertação

Área de concentração: Ciência dos alimentos

ROBERTA MARIA LINS MENDES

**INFLUÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE MARACUJÁ SOBRE A VIABILIDADE,
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS DURANTE O ESTOQUE DO
KEFIR**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
da Universidade Federal de Pernambuco,
para obtenção do título de Mestre em
Nutrição. Área de concentração: Ciência
dos alimentos.

Orientadora: Prof. Dra. Ester Ribeiro De Andrade

Co-Orientadora: Dra. Maria De Fátima Fonseca Marques

RECIFE, 2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M538i Mendes, Roberta Maria Lins.
Influência de duas espécies de maracujá sobre a viabilidade, parâmetros físico-químicos e sensoriais durante o estoque do kefir / Roberta Maria Lins Mendes.– 2018.
64 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ester Ribeiro de Andrade.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Probióticos. 2. Suco de frutas. 3. Passiflora edulis. 3. Passiflora cincinnata. I. Andrade, Ester Ribeiro de (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2018-145)

ROBERTA MARIA LINS MENDES

Dissertação

**“INFLUÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE MARACUJÁ SOBRE A VIABILIDADE,
PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS DURANTE O ESTOQUE DO
KEFIR”**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Nutrição da
Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de Mestre em Nutrição.
Área de concentração: Ciência dos alimentos.

Data de Aprovação: 23/02/2018

Profª Drª Gláucia Manoella de Souza Lima

Profª Drª Jaciana dos Santos Aguiar

Profª Drª Norma Buarque de Gusmão

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força e guiar meus passos em todos os momentos importantes e difíceis em minha vida, me trazendo o discernimento necessário em minhas escolhas.

A minha família (Roberto, Ione e Rapha) por todo amor, carinho e apoio durante todas as etapas da minha formação.

A minha querida orientadora Ester Ribeiro, pela paciência, apoio e dedicação ao meu trabalho, pelo carinho com alunos do LabBio e pelos ensinamentos durante este tempo de convivência.

Aos que fazem parte do LabBio (Eloyza, Mariana, Zilmar, Ricardo e todos os outros), que sempre estavam dispostos a me ajudar no que podiam, agradeço também de forma especial a Raissa que mesmo não fazendo mais parte do laboratório, me auxiliou de forma tão cuidadosa, para que eu conseguisse conduzir este trabalho da melhor forma possível.

A Dra. Fátima Fonseca, Cris e todos que fazem a empresa Biologicus por toda colaboração.

Aos meus colegas de turma (Marina, Érika, Edvaldo, Alberto e Manu), que mesmo distante neste último ano, não deixaram de compartilhar seus conhecimentos, dúvidas e angústias também.

As minhas queridas Gabi, Cris, Natália Fernandes, Nathália Melo e Dani; amigas da residência, que tanto incentivaram para que eu continuasse com elas neste mestrado, mesmo sendo aprovada em outro.

Por fim, a Claudia Sabino, minha grande motivadora para fazer o mestrado e um exemplo de profissional a ser seguido.

Muito Obrigada!

RESUMO

A microbiota intestinal é considerada um ecossistema predominantemente bacteriano que reside normalmente no intestino do homem, exerce o papel de proteção, impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas que geralmente são ocasionadas pelo seu desequilíbrio. O uso de probióticos proporciona benefícios ao trato gastrointestinal humano. O Kefir consiste de um consórcio microbiano, ou seja, espécies de bactérias e leveduras probióticas que se desenvolvem no substrato à base de leite. Entretanto, a busca por alimentos probióticos não lácteos tem crescido nos últimos anos devido ao aumento do número de indivíduos com distúrbios relacionados a ingestão de leite e derivados, sendo os sucos de frutas uma das bebidas mais utilizadas para este fim. O maracujá é uma das frutas mais populares no Brasil e sua produção apresenta grande importância econômica para o país. Seu cultivo é baseado em uma espécie única – maracujá amarelo (*Passiflora edulis*), entretanto, o maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*), outra variedade nativa do semiárido brasileiro representa um alvo potencial de ações para o desenvolvimento sustentável desta região que é uma das mais pobres do país. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de duas espécies diferentes de Maracujá na elaboração de um Kefir quanto à sobrevivência de bactérias e de leveduras, parâmetros físico-químicos e sensoriais durante o estoque. Os Kefirs foram elaborados na empresa Biológicus e o acompanhamento do estoque foi realizado no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. As bebidas foram produzidas a partir da polpa de ambos os tipos de maracujá. As análises foram realizadas com 0, 30 e 60 dias. Foram avaliados os ácidos orgânicos (lático, cítrico e málico), carboidratos (glicose e frutose) e etanol por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A viabilidade microbiana durante o estoque e após simulação das condições do trato gastrointestinal foram determinadas por contagem de unidade formadora de colônias, tanto para bactérias, quanto para leveduras. A análise sensorial das bebidas foi realizada com provadores não treinados, avaliou-se o gosto pelas bebidas e intenção de compra. Bactérias e leveduras apresentaram viabilidade acima de 6 Log UFC/mL após 60 dias de estoque refrigerado. O Kefir do maracujá da Caatinga apresentou melhor estabilidade e sobrevivências tanto de bactérias, quanto de leveduras superiores a 70%. Ambos os tipos de maracujá se mostraram veículos favoráveis para a produção de kefir, contribuindo para a sobrevivência dos microrganismos probióticos e desta forma permitindo que seus atributos benéficos sejam aproveitados pelos consumidores.

Palavras-chave: Probióticos. Suco de frutas. *Passiflora edulis*. *Passiflora cincinnata*.

ABSTRACT

The intestinal microbiota is considered a predominantly bacterial ecosystem that normally resides in the intestine of man, plays the protective role, preventing the establishment of pathogenic bacteria that are usually caused by its imbalance. The use of probiotics provides benefits to the human gastrointestinal tract. Kefir consists of a microbial consortium, ie probiotic bacteria and yeast species that develop in refined harmony on the milk-based substrate. However, the search for non-dairy probiotic foods has increased in recent years due to the increase in the number of individuals with disorders related to milk and dairy products intake, with fruit juices being one of the most used beverages for this purpose. Passion fruit is one of the most popular fruits in Brazil and its production has great economic importance for the country. Its cultivation is based on a single species - yellow passion fruit (*Passiflora edulis*), however, the passion fruit of the Caatinga (*Passiflora cincinnata*), another native variety of the Brazilian semiarid is a potential target for actions for the sustainable development of this region which is one of the most the country's poor. Therefore, the objective of this work was to evaluate the influence of two different species of passion fruit in the elaboration of a Kefir for the survival of bacteria and yeasts, physical-chemical and sensorial parameters during the stock. The Kefirs were elaborated in the company Biológico and the stock monitoring was carried out in the Laboratory of Bioprocesses and Bioproducts of the Department of Antibiotics of UFPE. The drinks were produced from the pulp of both types of passion fruit. The analyzes were performed at 0, 30 and 60 days. Organic acids (lactic, citric and malic), carbohydrates (glucose and fructose) and ethanol were evaluated by high performance liquid chromatography (HPLC). Microbial viability during storage and after simulation of gastrointestinal tract conditions were determined by colony forming unit counts for both bacteria and yeasts. The sensorial analysis of the drinks was performed with untrained tasters, and the taste for the drinks and purchase intention were evaluated. Bacteria and yeasts showed viability above 6 Log CFU / mL after 60 days of refrigerated stock. The Caatinga passion fruit Kefir showed better stability and survival of both bacteria and yeasts higher than 70%. Both types of passion fruit have proved to be favorable vehicles for the production of kefir, contributing to the survival of probiotic microorganisms and thus allowing their beneficial attributes to be used by consumers.

Key words: Probiotics. Fruit juice. *Passiflora edulis*. *Passiflora cincinnata*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação ilustrativa dos Grãos de Kefir.....	19
Figura 2 – Fluxograma geral de produção de Kefir.....	20
Figura 3 – Frutos do Maracujá amarelo (<i>Passiflora edulis</i>).....	24
Figura 4 – Frutos do Maracujá da Caatinga (<i>Passiflora cincinnata</i>).....	24
Figura 5 – Esquema ilustrativo para a determinação da viabilidade de bactérias e leveduras presentes no Kefir de maracujá amarelo e maracujá da Caatinga.....	31
Figura 6 – Esquema ilustrativo do teste de simulação gastrointestinal para verificação da resistência de bactérias e leveduras no Kefir de maracujá amarelo e maracujá da Caatinga.....	32
Figura 7 – Viabilidade de bactérias no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.....	35
Figura 8 – Viabilidade leveduras no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.....	36
Figura 9 – Sobrevivência de bactérias no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.....	37
Figura 10 – Sobrevivência de leveduras no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), após simulação das condições do TGI durante o estoque.....	37
Figura 11 – Valores de pH no Kefir de maracujá amarelo (KMA) e Kefir de maracujá da Caatinga (KMC), após simulação das condições do TGI durante o estoque.....	38
Figura 12 – Concentração dos Ácidos Cítrico e Málico no Kefir de maracujá amarelo (KMA) durante o estoque	39

Figura 13 – Concentração dos Ácidos Cítrico, Málico e Lático no Kefir maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.....	39
Figura 14 – Variação nas concentrações de etanol, glicose e frutose no Kefir de maracujá amarelo (KMA) e no Kefir de maracujá da Caatinga (KMC) durante o estoque.....	40
Figura 15 – Histogramas de frequência das respostas de satisfação (gosto) no Kefir de maracujá amarelo (KMA) e Kefir de maracujá da Caatinga (KMC) após 60 dias de estoque.....	41
Figura 16 – Histogramas de frequência das respostas de intenção de compra no Kefir de maracujá amarelo (KMA) e Kefir de maracujá da Caatinga (KMC) após 60 dias de estoque.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da polpa do maracujá amarelo por 100 gramas de polpa.....25

Tabela 2: Composição físico-química da polpa de maracujá da Caatinga em 100 gramas de polpa.....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC Ácidos Graxos De Cadeia Curta

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC Association of Official Analytical Chemists

ATCC American Type Culture Collection

CEP Comitê de Ética em Pesquisa

CLAE Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

KMA Kefir de Maracujá Amarelo

KMC Kefir de Maracujá da Caatinga

TGI Trato Gastrointestinal

UFC Unidade Formadora de Colônias

UFPE Universidade Federal de Pernambuco

WHO World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Microbiota intestinal	14
2.2	Probióticos	16
2.3	Kefir	17
2.4	Maracujá Amarelo e da Caatinga como veículos para probióticos	22
3	HIPÓTESE	26
4	OBJETIVOS	27
4.1	Objetivo Geral	27
4.2	Objetivos Específicos	27
5	MÉTODOS	28
5.1	Local	28
5.2	Materiais	28
5.3	Produção do Kefir	28
5.4	Condições de Armazenamento	29
5.5	Análises Físico-químicas	29
5.5.1	pH	29
5.5.2	Teor de ácidos orgânicos	29
5.5.3	Teor de carboidratos e etanol	30
5.6	Viabilidade celular	30
5.7	Sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas	31
5.8	Análise Sensorial	33
5.9	Análises estatísticas	33
6	RESULTADOS	35
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido	54
	APÊNDICE B - Formulário de Pesquisa – Análise Sensorial	57
	ANEXO 1 - Certificado de apresentação em evento científico	59
	ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	60

1 INTRODUÇÃO

O uso de culturas bacterianas probióticas exerce influência positiva sobre o trato gastrointestinal humano (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002; KUMAR et al., 2016). Dentre o universo dos produtos probióticos destaca-se o Kefir, o qual é originário do Cáucaso e está atualmente presente na dieta de várias partes do mundo (SARKAR, 2007). Entre os seus atributos pode-se destacar atividades antibacteriana, antifúngica, antitumoral, entre outros (ZUBILLAGA et al., 2001; DICKS E BOTES, 2010).

O Kefir consiste de um consórcio microbiano, ou seja, espécies de bactérias e leveduras probióticas que se desenvolvem em refinada harmonia no substrato à base de leite (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Entretanto, o aumento de pessoas na população com distúrbios relacionados à ingestão de lactose e outros componentes do leite, tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de outros tipos de produtos probióticos não lácteos (RIVERA-ESPINOZA E GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Bebidas probióticas à base de frutas, como o maracujá por exemplo, se mostram uma boa opção para este tipo de produto, que pode agradar todo tipo de consumidor, e por seus atributos nutricionais, que inclui a presença de vitaminas, minerais, antioxidantes e fibras (MARHAMATIZADEH et al., 2012). A produção deste fruto apresenta grande importância econômica no Brasil, colocando o país como o seu maior produtor e consumidor mundial (MELETTI, 2002). Apesar de existirem diversas espécies do fruto, o cultivo comercial está baseado em uma única espécie, o maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) – sendo cultivada em quase todo o território nacional (PITA, 2012; MELETTI, 2001).

Contudo, existem outras espécies de maracujá com aproveitamento alimentar potencial e que são praticamente desconhecidas do consumidor dos centros urbanos, entre elas o maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*), nativo da Caatinga e do semiárido brasileiro. É uma planta de natureza perene e resistente à seca, sobrevivendo em condições de absoluta estiagem, bem como a uma série de pragas que atingem o maracujá comum (ARAÚJO et al., 2002). Muitas famílias do sertão utilizam este fruto na alimentação e o excedente é comercializado em feiras locais. O aproveitamento do fruto representa um alvo potencial de ações para o

desenvolvimento sustentável da região Semiárida do Brasil, que corresponde a 65% do território do Nordeste e é a região mais pobre o país (ARAÚJO et al., 2004).

Atualmente no mesmo laboratório onde ocorreu o estudo outras pesquisas vêm sendo desenvolvidas utilizando como matéria prima o maracujá do mato na elaboração de bebidas probióticas, entretanto, utilizando uma única linhagem de microrganismo o *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Além desta, outras frutas nativas da região nordeste são alvo de estudos envolvendo diversos centros universitários, desta forma é possível contribuir para a popularização de espécies pouco aproveitadas, possibilitando uma alternativa a mais para a utilização destes frutos contribuindo para a diminuição do desperdício durante toda a sua cadeia produtora e representando mais uma fonte de renda para a população produtora.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microbiota intestinal

O processo de colonização da microbiota intestinal inicia-se após o nascimento e continua até o período adulto. A passagem pelo canal vaginal no momento do parto já começa a influenciar a colonização do trato gastrointestinal (TGI) do recém-nascido. A microbiota inicial é caracterizada por baixa diversidade, sendo constituída principalmente por bactérias anaeróbias facultativas pertencentes aos filos Proteobacteria e Actinobacteria (CARLISLE; MOROWITZ, 2010; BACKHED, 2011; MORAES et al., 2014). Este processo de colonização está relacionado com a capacidade de aderência das bactérias nos receptores de adesão da mucosa intestinal. Após completar essa colonização o trato gastrointestinal passa a abrigar uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, variando quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente em função da espécie animal, da localização transversal e longitudinal no trato digestivo, e idade do hospedeiro (NICOLI, 1995).

A estabilização da microbiota ocorre após a primeira infância, mas ocasionalmente outras modificações acontecem em situações específicas ao longo da vida. Indivíduos adultos, por exemplo, podem ter variações na proporção das bactérias em consequência de alterações ambientais ou de estados patológicos e, com o envelhecimento, observam-se redução na população de Bacteroides, Bifidobacteria e menor produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), assim como crescimento de anaeróbios facultativos, tais como Fusobacteria, Clostridia, Eubacteria, e maior atividade proteolítica (WU et al., 2011; MORAES et al., 2014).

O trato gastrointestinal humano é o sítio orgânico mais densamente povoado por microrganismos comensais e simbióticos, em sua maioria bactérias, mas também fungos e vírus, abrigando dez vezes mais bactérias que o número de células que formam nosso organismo (QIN et al., 2010; ARUMUGAM et al., 2011). Tem sido estimado que 10^{14} Unidades Formadoras de Colônia (UFC) de microrganismos habitem várias partes do corpo humano, além do trato gastrointestinal, eles estão presentes nos tratos geniturinário e respiratório, bem como na superfície da pele (HARRIS et al., 2012).

Em geral, a microbiota intestinal é composta em sua maioria por bactérias não patogênicas e promotoras de saúde. Ela exerce o papel de proteção, impedindo o estabelecimento de bactérias patogênicas que geralmente são ocasionadas pelo seu desequilíbrio. Este ecossistema age de forma simultânea e mútua com as células do hospedeiro por um processo de simbiose, no qual nenhum dos dois, os microrganismos e o hospedeiro, é prejudicado. As principais bactérias que compõe a microbiota entérica são benéficas e/ou probióticas, entre as quais se destacam Bifidobacterias e Lactobacilos (BRANDT et al., 2006; SAAD, 2006; SANTOS & VARVALHO, 2011).

A dieta do indivíduo constitui um fator determinante das características da colonização intestinal, desde o período de amamentação até a fase de envelhecimento, contribuindo para modificações na microbiota (MORAES et al., 2014). A fermentação de diferentes tipos de oligossacarídeos (como, por exemplo, fibras alimentares) produz ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico), os quais podem ser absorvidos pela mucosa intestinal e servir de substrato energético e/ou de metabólito regulador para o hospedeiro. A dieta ocidental caracterizada pelo elevado consumo de gordura e baixo teor de fibras, é um dos principais fatores que contribuem com a maior proliferação de bactérias patogênicas na microbiota intestinal, processo denominado disbiose (JUMPERTZ et al., 2011), e o seu equilíbrio pode ser mantido por meio de uma alimentação variada rica em probióticos e prebióticos (SAAD, 2006).

A microbiota intestinal pode ser identificada como órgão ativo que está envolvido na biodisponibilidade de nutrientes, na degradação de compostos não digeríveis e na remoção de substâncias indesejadas. Algumas espécies bacterianas produzem vitaminas, principalmente K e B, fornecendo-as ao hospedeiro (HOOPER et al., 2002). A atividade da microbiota ainda contribui para a desconjugação e desidroxilação de ácidos biliares, e metabolismo de aminoácidos (LAPARRA & SANZ, 2010).

O uso de culturas bacterianas probióticas exerce influência positiva sobre o trato gastrointestinal humano, incluindo efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos que, por meio do estímulo à multiplicação de microrganismos benéficos e conseqüente inibição de desenvolvimento de bactérias potencialmente

prejudiciais, reforça os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

2.2 Probióticos

A palavra probiótico deriva-se da língua grega, e significa "para a vida" (KANDYLIS et al., 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011) são organismos vivos que ao serem administrados em quantidades adequadas conferem benefícios na saúde do hospedeiro.

Diversos testes em animais e humanos tem demonstrado os benefícios para a saúde com a utilização de linhagens probióticas na prevenção e redução de riscos e de várias doenças (KUMAR et al., 2016). Dentre os efeitos benéficos relacionados à sua utilização destacam-se a estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; resistência gastrintestinal à colonização por microrganismos patógenos; melhora da integridade da barreira intestinal, resultando na manutenção da tolerância imunológica e diminuição da translocação de bactéria; melhora dos sintomas da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas; diminuição das concentrações de colesterol, efeitos anti-hipertensivos e inibição da mutagenicidade (KAUR, CHOPRA, SAINI, 2002; TUOHY et al., 2003; HEMARAJATA et al., 2013; PAIXÃO & CASTRO, 2016).

Alguns critérios são considerados fundamentais para que o microrganismo seja caracterizado como probiótico. Primeiramente, o mesmo não deve ser patogênico ou causar efeitos colaterais ao hospedeiro, devem ser capazes de sobreviver à passagem ao longo do trato gastrointestinal, resistindo às condições ácidas no ambiente gástrico e atingir o intestino grosso em quantidades adequadas possibilitando a sua colonização e proliferação no trato digestivo (COLLADO et al., 2009; LI et al., 2011; CARICILLI & SAAD, 2013).

Conhecendo o metabolismo e as condições de crescimento é possível determinar de forma mais eficaz o veículo a ser incorporado o probiótico (BONGAERTS; SEVERIJNEN, 2016). Recomenda-se que os alimentos que contenham bactérias probióticas possuam aproximadamente de 10^8 a 10^9 UFC/g antes da sua ingestão para garantir que um mínimo terapêutico suficiente de 10^6

e 10^7 UFC/g possa chegar ao cólon (NAZZARO et al., 2009; KANDYLIS et al., 2016). Ao chegar ao intestino, o microrganismo deve se aderir, modular o ambiente, estabilizando a microbiota, inibindo ou até mesmo eliminando os patógenos intestinais, fornecendo assim, seus benefícios (SLEATOR & HILL, 2008).

No caso de formulações alimentares, essas devem ser estáveis durante a vida de prateleira do produto, conter o número de células viáveis para conferir os benefícios esperados e manter as características sensoriais desejadas (COLLADO et al., 2009). Os probióticos têm sido formulados em diversas matrizes incluindo, chocolate (RAYMOND; CHAMPAGNE, 2015), sorvetes (MATIAS et al., 2016), doces e barras de cereais (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015) no entanto, produtos láteos convencionais como Kefir, iogurtes e queijos são mais eficazes na manutenção da viabilidade dos probióticos, pois agem como um tampão, facilitando assim a passagem dos microrganismos através do TGI durante o processo digestivo (PINTO et al., 2006).

Os mecanismos através dos quais se explicam os efeitos benéficos dos probióticos ainda são desconhecidos, no entanto, acredita-se que envolvem modificações no pH intestinal, produção de compostos antimicrobianos, competição com patógenos tanto por receptores locais, quanto por nutrientes disponíveis e fatores de crescimento, estimulantes imunomoduladores e células produtoras de lactase (PARVEZ et al., 2006; AMARA & SHIBL, 2015).

2.3 Kefir

Dentre o universo dos produtos probióticos destaca-se o Kefir, o qual é originário do Cáucaso, região localizada entre a Europa Ocidental e a Ásia. No final do século XIX, sua produção espalhou-se para a Europa Central e Oriental entre outras partes do mundo. No século XXI, teve início a sua produção industrial em diferentes regiões do mundo e comercializado apresentando diferentes nomes locais, como kefir, kefer, kiaphur, kefyr, knapon, kepi, e kippi. Esta bebida tem tido um notável sucesso, vem ganhando popularidade e atualmente está presente na dieta de diversas populações (SARKAR, 2007; ÖZER, KIRMACI, 2014).

No Brasil, a disseminação do uso do Kefir começou no início do século XX, e os estudos científicos envolvendo sua a caracterização de todo o processo de preparação tiveram início no final do mesmo século. No entanto, sua produção a nível industrial ainda é baixa, sendo o maior produção do tipo artesanal para consumo pessoal e não é muito difundida (LEITE, et al. 2012).

A palavra Kefir e derivada da palavra, em Turco, *keif* a qual pode ser traduzida como “sentir-se bem”, sensação experimentada após ingeri-lo (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). Tradicionalmente, os caucasianos preparavam o Kefir pela fermentação do leite em sacos feitos do couro cru (ou estômago) de animais. O leite fresco era adicionado do leite fermentado e após um tempo, ocorria um acúmulo de camadas de microrganismos embebidos em um material com proteína e polissacarídeo e, eventualmente, a formação dos grãos (REA et al.,1996).

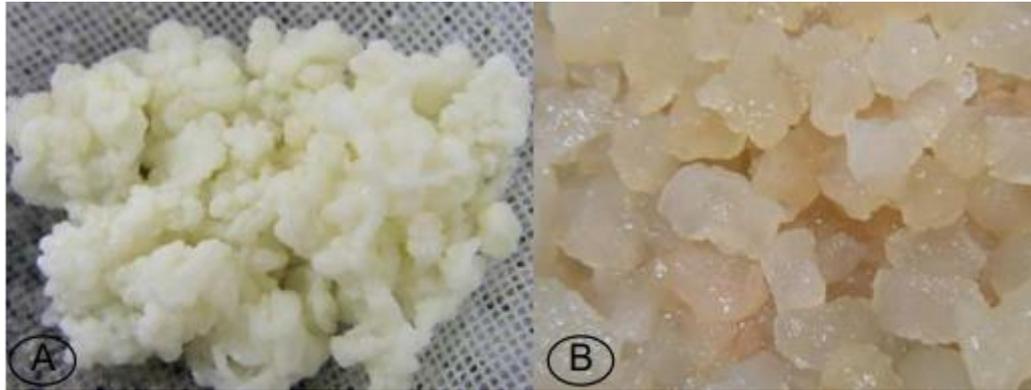
O Kefir é uma bebida viscosa, refrescante, de sabor levemente ácido e picante, produzida a partir de grãos de Kefir, cuja associação simbiótica entre leveduras e bactérias lácticas é responsável pela fermentação ácido-láctica do leite, que tem sido historicamente utilizado para promover e manter a boa saúde (LOPITZ-OTSOA et al., 2006; MARSH et al., 2013; SATIR; GUZEL-SEYDIM, 2016; VIANA et al, 2017).

Segundo a legislação brasileira vigente (Instrução Normativa N°46 de 26 de outubro de 2007), o Kefir, definido como leite fermentado, é um “produto resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, cuja fermentação se realiza com cultivos acidolácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefiri*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono”, sendo seus grãos constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnispurus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*” (BRASIL, 2007).

Os grãos de Kefir são massas gelatinosas irregulares com coloração que varia de branca para amarelada em formato de couve-flor, possuem de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro, com uma textura viscosa, mas firme (Figura 1) (HSIEH et al., 2012; SINKO et al., 2013; LEITE et al., 2015). Os grãos foram passados de geração para geração

entre as tribos do Cáucaso, sendo estes considerados uma fonte de riqueza familiar (LOPITZ-OTSOA et. al., 2006).

Figura 1: Representação ilustrativa dos Grãos de Kefir de leite (A) e de água (B).



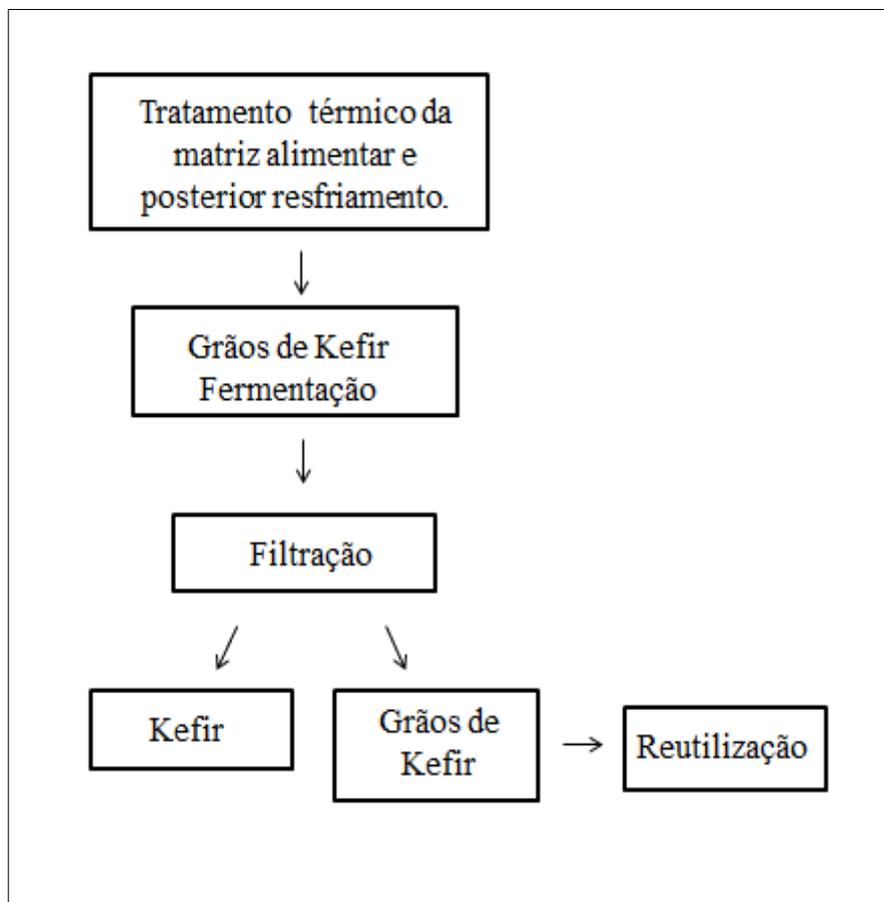
Fonte: Miguel, 2009.

A população microbiana encontrada em grãos de Kefir tem sido citada como exemplo de comunidade simbiótica, ou seja, diversas espécies de microrganismos vivendo de forma harmônica e vantajosa para ambos, que não podem ser sintetizadas artificialmente, sendo a composição da microbiota do leite fermentado pelo Kefir variável de acordo com o meio de cultura e o seu método de produção (KANDYLIS et al., 2016). Além destes, outros fatores tais como a região geográfica de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas utilizadas para manipulação (WSZOLEK et al., 2001; WITTHUHN et al., 2004). Entretanto, apesar dessa composição variável, os gêneros de bactérias lácticas mais comuns em grãos desse alimento são *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (JIANZHONG et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2011; LEITE et al., 2012).

De acordo com a norma para fermentados (CODEX ALIMENTARIUS, 2011), o Kefir deve conter no mínimo: 2,7% de proteínas do leite, menos de 10% de gordura, 0,6% de acidez titulável expressa em ácido láctico, soma de microrganismos específicos que constituem o mínimo de cultura iniciadora de 10^7 UFC/g e de levedura de 10^4 UFC/g. A fabricação pelo processo tradicional consiste na adição dos grãos de Kefir ao leite, este por sua vez é mantido em repouso

aproximadamente 24 horas. Durante esse tempo, os grãos, geralmente, aumentam sua massa em 25% (FARNWORTH, 2005). O leite é em seguida filtrado para recuperar os grãos, que serão utilizados em um novo processo de fermentação (KANDYLIS et al., 2016). A biomassa de grãos de Kefir aumenta lentamente durante a fermentação, e as propriedades dos grãos inicialmente formados são transmitidas aos demais grãos que irão se formando (GARROTE et. al., 2012; FARNWORTH, 2005). De forma geral, o processo de produção do Kefir está descrito na Figura 2.

Figura 2: Fluxograma geral de produção de Kefir.



Fonte: O autor, 2018.

Embora o Kefir tradicionalmente seja produzido a partir do leite de vaca, e de outros mamíferos, o leite de coco, arroz e soja também tem sido utilizado para a fabricação da bebida (PUERARI et al, 2012). Outra variação produzida é o Kefir d'água, cujo substrato é constituído apenas de água e açúcar mascavo na concentração de 3 a 10% (FARNWORTH, 2005).

O crescente aumento de pessoas na população com distúrbios relacionados à ingestão de lactose, assim como de colesterol, ambos componentes do leite, tem impulsionado a pesquisa e o desenvolvimento de outros tipos de produtos probióticos não lácteos, incluindo matrizes alimentares à base de frutas, legumes e cereais (RIVERA-ESPINOZA & GALLARDO-NAVARRO, 2010; FARIAS et al, 2016; SANTOS et al., 2017). Além disso, a tendência em curso do vegetarianismo estabeleceu uma importância mundial a estes produtos (CORONA et al, 2016).

Devido ao aumento do consumo da bebida em diversos países do mundo, o Kefir, grãos de Kefir e as bactérias encontradas no Kefir têm sido objeto de estudos científicos que visam demonstrar os benefícios potenciais dos mesmos para a saúde humana. Além das bactérias e leveduras benéficas, o Kefir é reconhecido também por seus atributos nutricionais, presença de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam o tratamento e manutenção das funções corporais (ZUBILLAGA et al., 2001; OTLES e CAGINDI, 2003; MAGALHÃES et al., 2011; VIANA et al, 2017). Além disso, durante o processo de fermentação, metabólitos microbianos e/ou constituintes degradados da matriz alimentar se acumulam na bebida e também podem produzir efeitos benéficos à saúde (FARNWORTH, 2003).

Os microrganismos presentes no kefir apresentam a capacidade de produzir prebióticos (como o kefirano), que são oligossacarídeos não digeríveis pelo trato gastrointestinal do consumidor e utilizados como fonte de energia pela microbiota para o seu crescimento (JOHN; DEESEENTHUM, 2015). As vias metabólicas que levam à produção de kefirano não são completamente compreendidas, no entanto, sabe-se que é composto por unidades repetitivas de carboidratos, principalmente de glicose e galactose, com ramificações e pode ser produzido por uma variedade de bactérias isoladas dos grãos de kefir, obtido de diferentes fontes (FARNWORTH, 2005; GUZEL-SEYDIM et. al., 2005). Além dos efeitos positivos à saúde, o kefirano também pode ser usado como aditivo alimentar para produtos fermentados a fim de realçar as propriedades reológicas dos géis de leites fermentados, aumentando sua viscosidade aparente e a estabilidade desses géis durante o armazenamento (WANG et. al., 2008).

Outros benefícios para a saúde associados com o Kefir são atribuídos a sua capacidade de proliferação gastrointestinal, atividade antibacteriana, efeito

anticancerígeno, efeito hipocolesterolêmico, propriedades antidiabéticas, atividade antimutagênica, atividade β -galactosidase, atividade antioxidante, efeito sobre o nível de lipídios e pressão arterial, proteção contra apoptose, propriedades antialérgicas, ação anti-inflamatória, e reforço do sistema imunitário (AHMED et al., 2013).

2.4 Maracujá Amarelo e da Caatinga como veículos para probióticos

Sucos de frutas constituem um veículo ideal para culturas probióticas por ser um substrato rico em compostos antioxidantes, ácido ascórbico, minerais, vitaminas, fibras dietéticas, não contém alérgenos lácteos e são consumidos regularmente pela população (YOON; WOODAMS & HANG, 2006). Além disso, contêm quantidades elevadas de açúcares, o que poderia incentivar o crescimento dos microrganismos e não contêm culturas iniciantes que competem com mesmos pelos nutrientes (DING & SHAH, 2008). Ademais, a fermentação a partir destes substratos faz com que a bebida produzida seja apreciada pelo seu sabor ácido, refrescante, levemente gaseificado, e baixo conteúdo alcoólico e acético. Uma vez que o consumo de frutas e legumes é fortemente recomendado por muitos governos para reduzir o risco de várias doenças e declínios funcionais associados com o envelhecimento, a sua fermentação pode aumentar a escolha pelo consumo destes produtos. Isto também contribuiria para minimizar as perdas relacionadas a sua produção, já que estes produtos são altamente susceptíveis à deterioração (RANDAZZO et al., 2016) .

O maracujá que, na língua tupi, significa “alimento em forma de cuia”, é uma das primeiras frutas silvestres que os descobridores conheceram nas Américas (GURGEL, 2004). O maracujazeiro pertence à família *Passifloraceae*, é amplamente distribuída nos trópicos e regiões temperadas, composta por 18 gêneros e mais de 630 espécies. O gênero *Passiflora* é o mais importante economicamente e possui 129 espécies conhecidas, nativas do Brasil, das quais 83 são endêmicas (CERVI et al., 2010). De forma geral, é rico em vitamina C, cálcio e fósforo, além de possuir valor medicinal, em função das suas propriedades terapêuticas: as folhas e o suco contêm passiflorina, conhecido como um sedativo natural, e o chá preparado com as folhas, tem efeito diurético. Conhecido também pelo valor ornamental por suas belas

flores, que são um atrativo devido ao seu tamanho, exuberância das cores e pela originalidade das formas (MELETTI, 2001; EMBRAPA, 2007).

A produção de maracujá apresenta grande importância econômica no Brasil tornando-o o maior produtor e consumidor mundial, principalmente devido às condições climáticas do país que permite o seu cultivo em diversos estados, gerando emprego e renda durante o período de safra que perdura quase o ano todo. Estes fatores favorecem o aumento do consumo por todos os brasileiros, seja *in natura*, ou na forma processada, podendo ser utilizado tanto no comércio interno quanto para a exportação (ARAÚJO et al., 2002).

A espécie *Passiflora edulis*, mais conhecida como maracujá amarelo (Figura 2) é a principal espécie explorada comercialmente sendo cultivada em quase todo o território nacional. O maracujá amarelo possui a película externa amarela, casca branca, formato arredondado, polpa ácida, suco amarelo a amarelo-alaranjado. De uma maneira geral o maracujá é bem conhecido como uma fruta rica em vitaminas, principalmente a vitamina C (Tabela 1) (EMBRAPA, 2007).

O maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*), também conhecido como maracujá do mato, é uma fruta silvestre nativa da Caatinga e do semiárido brasileiro, ocorrendo espontaneamente no Nordeste. Possui a película externa verde, com a casca branca, formato arredondado, polpa ácida, suco amarelo a amarelo claro (Figura 3). É uma planta de natureza perene e resistente à seca, sobrevivendo em condições de absoluta estiagem, bem como a uma série de pragas que atingem o maracujá amarelo (ARAÚJO et al., 2002). A fruta é amplamente conhecida por suas propriedades medicinais, em especial, por ter efeito calmante e relaxante. Possui um alto valor nutritivo, é extremamente saborosa e perfumada, com um sabor persistente, mais doce e mais ácido que o do maracujá amarelo (*Passiflora edulis*). Tanto o gosto quanto o perfume lembram o mel. Sua composição contém cerca de 8% de açúcares redutores e 1% de proteínas, além de potássio, ferro, fósforo, cálcio e vitaminas A, C e do complexo B. Pode ser consumida fresca ou transformada em geleias, doces e polpa (Tabela 2) (ARAÚJO et al., 2002).

Figura 3: Frutos do Maracujá amarelo (*Passiflora edulis*).



Fonte: Farming, 2017.

Figura 4: Frutos do Maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata*).



Fonte: Embrapa, 2016.

O aproveitamento do maracujá da Caatinga é marcado pelo extrativismo e a subsistência. Muitas famílias do sertão utilizam o maracujá da Caatinga na alimentação, o excedente é comercializado em feiras locais. O aproveitamento do fruto representa um alvo potencial de ações para o desenvolvimento sustentável da

região Semiárida do Brasil, que corresponde a 65% do território do Nordeste e é a região mais pobre o país particularmente se estas ações, que incluem o aproveitamento total dos frutos, forem integradas às atividades de pequenas indústrias de beneficiamento e processamento do maracujá em doces, geleias, mousse e sucos (ARAÚJO et al., 2004).

Tabela 1: Composição química da polpa do maracujá amarelo por 100g de polpa.

Composição da polpa do maracujá amarelo (100 gramas)	
Calorias	90,0 Kcal
Glicídios	21,2 g
Proteínas	2,2 g
Lipídios	0,7 g
Cálcio	13 mg
Fósforo	17 mg
Ferro	1,6 mg
Potássio	360 mg
Vitamina	70 µg
Vitamina B1	150 µg
Vitamina B2	100 µg
Vitamina C	15,6 mg

Fonte: Franco, 2007

Tabela 2: Composição físico-química da polpa de maracujá da Caatinga em 100g de polpa.

Composição da polpa do maracujá da Caatinga (100 g)	
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	11,00
Acidez Titulável	82,33 g
pH	3,2 g
Umidade	90,02 g
Cinzas	0,80 g
Proteínas	0,84 g
Lipídios	3,83 g
Sacarose	0,68 g
Glicose	0,19 g
Frutose	1,79 g
Ácido Cítrico	0,47 g
Ácido Ascórbico	52,01 mg

Fonte: Santos et al., 2017

3 HIPÓTESE

Ambos os tipos de maracujá, amarelo e da caatinga se mostraram matrizes alimentares favoráveis para a produção do Kefir, mantendo viabilidade dos microrganismos presentes nas bebidas, bem como suas características físicas, químicas e sensoriais durante o período de estoque.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do tipo de Maracujá na elaboração do Kefir quanto à sobrevivência de bactérias e de leveduras, parâmetros físico-químicos e sensoriais durante o estoque.

4.2 Objetivos Específicos

- Comparar a viabilidade de bactérias e leveduras, o teor de ácidos orgânicos, glicose, frutose e etanol, durante os estoques de ambos os kefirs;
- Investigar a sobrevivência de bactérias e leveduras sob as condições simuladas do trato gastrointestinal, durante o estoque de ambas as bebidas probióticas;
- Realizar análise sensorial, ao final do estoque, para cada tipo de Kefir.

5 MÉTODOS

5.1 Local

Os produtos para análise (Kefir de Maracujá da Caatinga - KMC e Kefir de Maracujá Amarelo - KMA) foram preparados e armazenados na empresa Biologicus, em Recife-PE, no período de Julho à Setembro de 2017.

As demais etapas do presente estudo que compreendem todas as análises, ocorreram no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (Departamento de Antibióticos) e no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Departamento de Nutrição), ambos localizados na Universidade Federal de Pernambuco.

5.2 Materiais

O maracujá da Caatinga foi obtido através de doação de cooperativa produtora localizada em Tapiramutá, no estado da Bahia; enquanto o maracujá amarelo foi obtido através de compra em feira orgânica localizada na Zona Norte do Recife. Uma vez que no cultivo do maracujá da Caatinga não se utiliza nenhum tipo de agrotóxico, optou-se pelo produto orgânico para evitar uma possível interferência nos resultados obtidos. Os demais materiais (equipamentos, vidrarias, reagentes e outros) faziam parte dos laboratórios onde foram realizadas as análises, ou adquiridos pelos próprios pesquisadores que se responsabilizaram pelos custos.

5.3 Produção do Kefir

Os dois tipos de maracujá adquiridos foram previamente selecionados de acordo com suas características físicas e sensoriais (cor, danos físicos, grau de maturação, qualidade da casca), foram devidamente higienizados e posteriormente manipulados para a retirada da polpa.

Os frutos foram cortados e com auxílio de uma peneira foi separada a polpa das sementes. As cascas e sementes foram descartadas. A produção das bebidas seguiu metodologia da própria empresa, utilizando grãos de Kefir de água adicionados aos sucos dos dois tipos de maracujá. A forma de preparo deste Kefir é

semelhante a dos outros tipos de Kefir de frutas produzidos na empresa, cujo processo de patenteamento está em andamento – Código: BR 10 2014 002784 0 – “Processo de produção de bebida probiótica Kefir à base de sucos naturais de limão e de frutas”.

Considerou-se como o tempo inicial das análises o ponto no qual a empresa considera o Kefir pronto para a comercialização ($t=0$ dias), após 30 e 60 dias de estoque, não foi considerado o tempo de produção do Kefir, uma vez que o este tempo pode variar. Apesar da validade limite determinada pela mesma ser de 90 dias em condições de refrigeração, consideramos o final do estoque aos 60 dias.

5.4 Condições de Armazenamento

As bebidas produzidas foram armazenadas em garrafas PET de 500 mL, hermeticamente fechadas, sob temperatura de refrigeração (entre 0 e 5°C) no mesmo local de fabricação até o momento das análises, onde eram transportadas em embalagens térmicas contendo gelo para manutenção da temperatura.

5.5 Análises Físico-químicas

5.5.1 pH

O pH foi medido utilizando potenciômetro digital (Jenway 3510) em três momentos: no tempo zero, após 30 e 60 dias de estoque ($t=0$, $t=30$ e $t=60$ dias).

5.5.2 Teor de ácidos orgânicos

Os ácidos láctico, cítrico e málico foram determinados com 0, 30 e 60 dias de estoque, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O cromatógrafo (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) era equipado com uma bomba quaternária com desgaseificador, acoplado um forno para controlar a temperatura da coluna (29 °C), um injetor automático e um detector por arranjo de diodos (DAD). O software utilizado para a aquisição de dados foi o Soluções-LC (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Uma coluna de troca iônica de 300 x 7,8 milímetros (Aminex® HPX-87H,

Bio-Rad, EUA), com 9 μm de tamanho de partículas, foi utilizada. Um sistema de eluição isocrática foi aplicado para a fase móvel (H_2SO_4 5 mM) e as condições da corrida foram de 25 minutos com uma vazão da fase móvel igual a 0,6 mL/ min. As amostras foram diluídas em fase móvel e filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,2 μm . Para construção das curvas de calibração foram injetados ácido cítrico (Dinâmica, SP, Brasil), na concentração de 0,1 g/L, málico 0,1 g/L e láctico (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), na concentração de 1 g/L. Os volumes injetados para ambos os ácidos foram de 1, 3, 6, 10 e 20 μL e as curvas apresentaram um R^2 maior que 0,999.

5.5.3 Teor de carboidratos e etanol

A determinação de carboidratos (glicose e frutose) e etanol também foi realizada com 0, 30 e 60 dias de estoque, através da CLAE, com temperatura de 60°C e detector por índice de refração. Foi utilizado a mesma coluna cromatográfica, composição e sistema de eluição de fase móvel usados na determinação dos ácidos. As condições da corrida foram de 15 minutos com uma vazão da fase móvel também igual a 0,6 mL/ min. As amostras foram diluídas em fase móvel e filtradas em membrana com diâmetro de poro de 0,2 μm . Para construção das curvas de calibração foram injetados frutose e glicose (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), na concentração de 1 g/L. Os volumes injetados para ambos os carboidratos foram de 10, 15, 20, 25 e 30 μL e as curvas apresentaram um R^2 maior que 0,999.

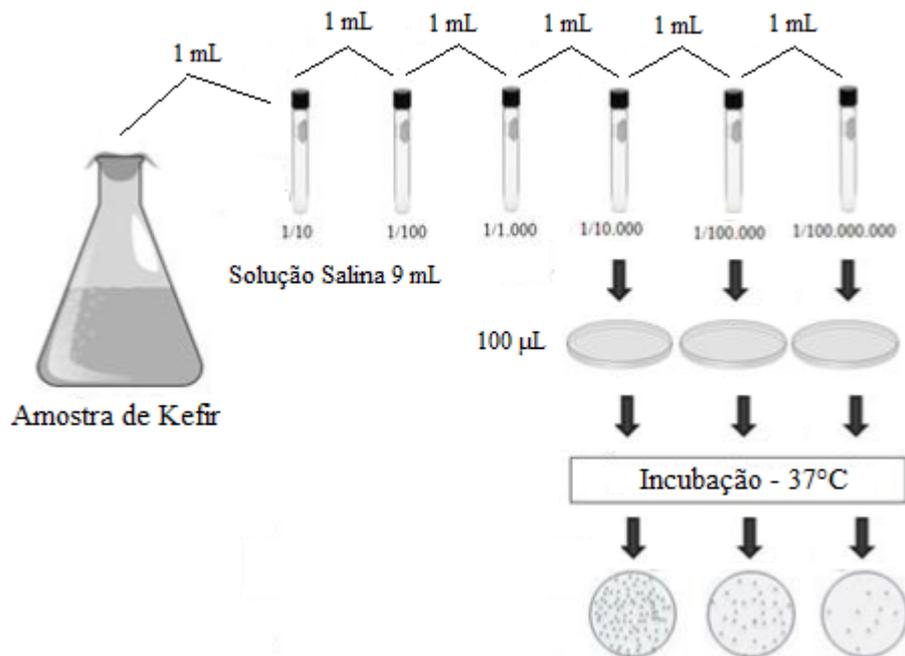
5.6 Viabilidade celular

A quantificação das leveduras e bactérias em cada Kefir, no início do estoque e após 30 e 60 dias. Amostras de 1 mL de cada Kefir foram retiradas, depositadas em tubos de ensaio estéreis e diluídas em 9 mL de solução salina 0,9% estéril. Posteriormente uma nova alíquota de 1 ml foi retirada do tubo inicial e transferida para outro contendo solução salina. As diluições seriadas foram realizadas até a diluição 10^{-9} .

Alíquotas de 100 μL das diluições foram semeadas em placas de Petri estéreis contendo MRS 55 g/L (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e Ágar 20 g/L (Neogen,

Michigan, EUA) adicionada de Cicloheximida (200mg/l) para quantificar bactérias e Sabouraud contendo Cloramfenicol (100mg/l) para quantificar leveduras. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica (SPLABOR 101/216) a 37°C por 48 horas. Após esse período, a contagem foi realizada e o resultado expresso em logaritmo de Unidades Formadoras de Colônias por mililitros de amostra (log UFC/mL). A contagem das células viáveis foi realizada em triplicata e a Figura 5 consiste em uma representação ilustrativa desta etapa.

Figura 5 - Esquema ilustrativo para a determinação da viabilidade de bactérias e leveduras presentes no Kefir de maracujá amarelo e maracujá da Caatinga.



Fonte: O autor, 2018.

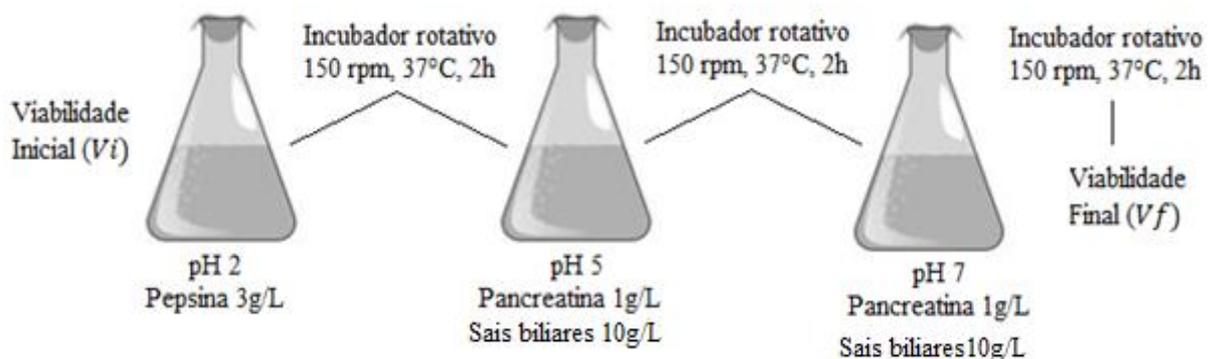
5.7 Sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas

Para a avaliação da sobrevivência das bactérias e leveduras presentes no Kefir do maracujá da Caatinga e no Kefir de maracujá amarelo, inicialmente foi determinada a viabilidade celular das mesmas como descrito no item 5.6, no início, após 30 e 60 dias de estoque. A metodologia foi baseada no trabalho de Santos et

al. (2017). A partir destes resultados foi calculada a sobrevivência ($S\%$) de bactérias e leveduras depois de serem submetidas as condições de simulação gastrointestinal, utilizando a equação: $S(\%) = \frac{V_i}{V_f} \times 100$

Foi utilizado volume inicial de 30 mL para cada amostra. Inicialmente o pH foi ajustado para 2,0 com solução de HCl (1M) e foi adicionada a enzima pepsina (Dinâmica, SP, Brasil) na concentração de 3 g/L, simulando a fase gástrica. Os frascos foram incubados a 37°C em incubadora rotativa a 150 rpm (Tecnal TE-422) durante 2 h. Após esse período, o pH das amostras foi novamente ajustado, desta vez para o 5 utilizando uma solução alcalina (150 mL de 1M NaOH, 14 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e água destilada até 1 L). Sais biliares (HiMedia, Mumbai, Índia) e pancreatina (Êxodo Científica, SP, Brasil) foram adicionados até chegar a uma concentração de 10 g/L e de 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37°C por mais 2 horas, sob agitação de 150 rpm; esta fase simula a fase entérica 1. Na última etapa, o pH foi ajustado para 7 usando a mesma solução alcalina. As concentrações de sais biliares e pancreatina foram ajustadas (10 g/L e 1 g/L, respectivamente), e as amostras novamente incubadas nas mesmas condições (fase entérica 2) (Figura 6).

Figura 6 - Esquema ilustrativo do teste de simulação gastrointestinal para verificação da resistência de bactérias e leveduras no Kefir de maracujá amarelo e maracujá da Caatinga.



Fonte: O autor, 2018.

5.8 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE, número do parecer 2.264.487 (ANEXO 2), bem como após os resultados das análises microbiológicas para *Salmonella* spp (AOAC, 2002, método 967.26) e coliformes termotolerantes g/ 45°C (AOAC, 2002, método 991.14), realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Nutrição – UFPE, para garantir a qualidade sanitária dos produtos oferecidos aos voluntários (BRASIL, 2001).

Os testes foram realizados no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição – UFPE, utilizando os dois tipos de Kefir após 60 dias de estoque, com provadores não treinados na faixa etária de 18 à 45 anos, que informaram não apresentar qualquer tipo de intolerância ou alergia aos componentes do Kefir e apresentassem capacidade de leitura e compreensão do formulário da pesquisa.

Os voluntários foram orientados a ler atentamente o Termo Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), e todas as dúvidas referentes à execução do teste foram esclarecidas, contribuindo para que o participante tivesse segurança durante a execução do teste e minimizando possíveis perdas de respostas. As amostras foram servidas em copos descartáveis de 50 ml numericamente codificados na temperatura de 4°C aproximadamente e água mineral foi fornecida aos voluntários para limpar o seu paladar entre a degustação das amostras.

As amostras foram avaliadas por meio de testes de aceitação e intenção de compra, utilizando duas escalas hedônicas, a primeira de nove pontos variando de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei extremamente), a segunda de 7 pontos variando de 1 (nunca compraria) a 7 (compraria muito frequentemente) os formulário para análise sensorial estão descrito no Apêndice B (Stone & Sidel, 2004).

5.9 Análises estatísticas

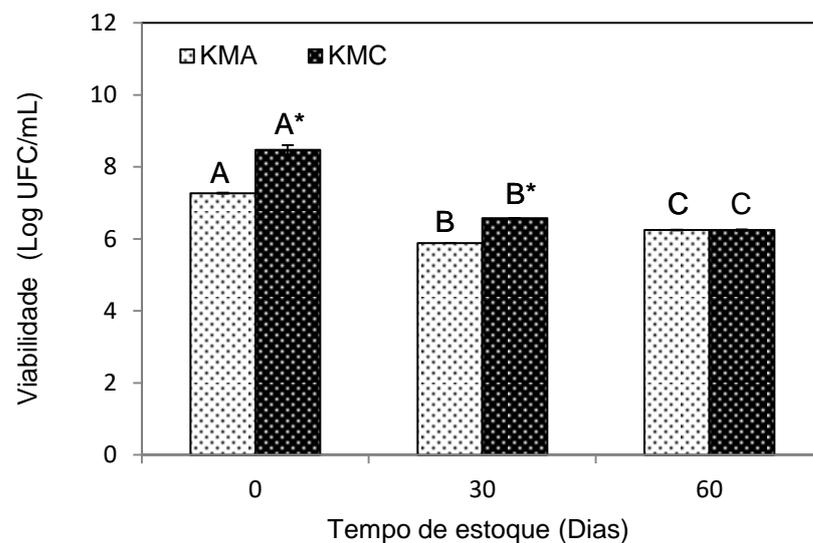
As médias foram obtidas através da realização dos testes em triplicatas para a viabilidade, e em duplicatas para as demais análises. Os dados foram analisados

através do teste estatístico de análise de variância ANOVA, considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$), utilizando o programa OriginPro® 2018.

6 RESULTADOS

A viabilidade de bactérias e leveduras nos dois tipos de Kefir foi avaliada ao longo do estoque nos tempos 0, 30, e 60 dias como apresentado nas Figuras 7 e 8, respectivamente. A viabilidade de bactérias foi significativamente maior no KMC em 0 dias (8 Log UFC/mL) e 30 dias (7 Log UFC/mL), quando comparado ao KMA (7 Log UFC/mL e 6 Log UFC/mL). Não houve diferença significativa na viabilidade de bactérias entre as viabilidades nos Kefir com 60 dias de estoque.

Figura 7 – Viabilidade de bactérias no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.

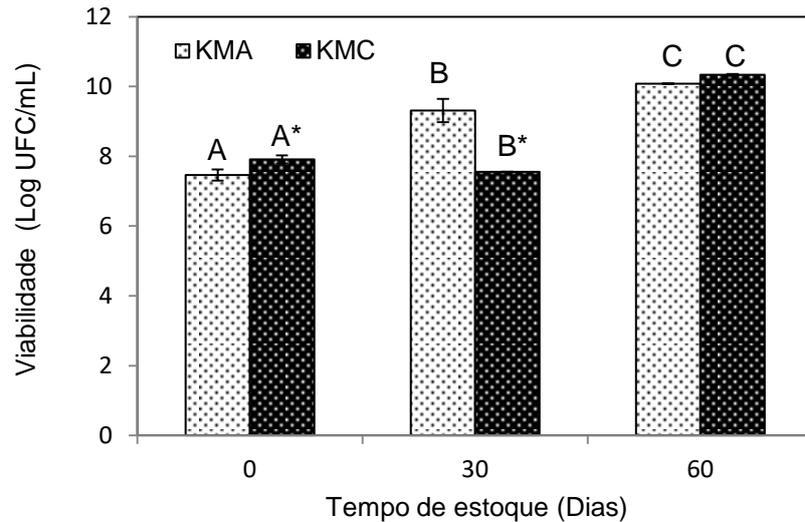


As letras diferentes (A, B, C) indicam que houve diferença significativa em cada um dos tipos de Kefir ao longo do tempo ($p < 0,05$), e a presença do asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando os dois Kefir foram comparados.

No que diz respeito a viabilidade de leveduras, no início do estoque encontrava-se ligeiramente maior no KMC (próxima a 8 Log UFC/mL). No entanto, aos 30 dias houve um aumento significativo no KMA (9 Log UFC/mL) e discreto declínio no KMC (7 Log UFC/mL). Aos 60 dias de estoque, ambos os tipo de Kefir apresentaram viabilidades semelhantes, não havendo diferença significativa entre os

mesmos. Durante todo o estoque a viabilidade de ambos, bactérias e leveduras, diferiram significativamente nas duas bebidas.

Figura 8 – Viabilidade leveduras no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.

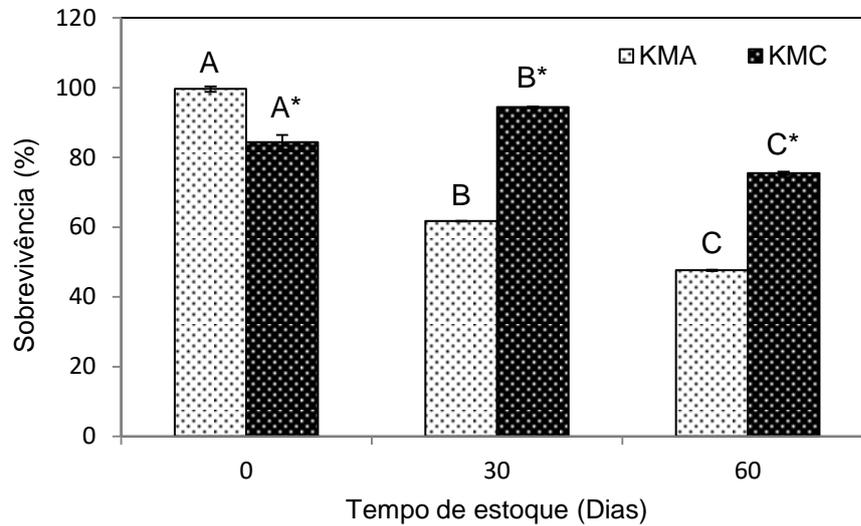


As letras diferentes (A, B, C) indicam que houve diferença significativa em cada um dos tipos de Kefir ao longo do tempo ($p < 0,05$), e a presença do asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando os dois Kefir foram comparados.

De uma forma geral, tanto bactérias quanto leveduras apresentaram alta sobrevivência depois de submetidas às condições simuladas do TGI. No início do estoque, a sobrevivência das bactérias no KMA foi de aproximadamente 99%, entretanto, aos 30 dias decaiu significativamente (61%) e continuou em queda quando avaliado os 60 dias de estoque (47%) (Figura 9). O KMC apresentou sobrevivência superior a 75% durante todo o estoque.

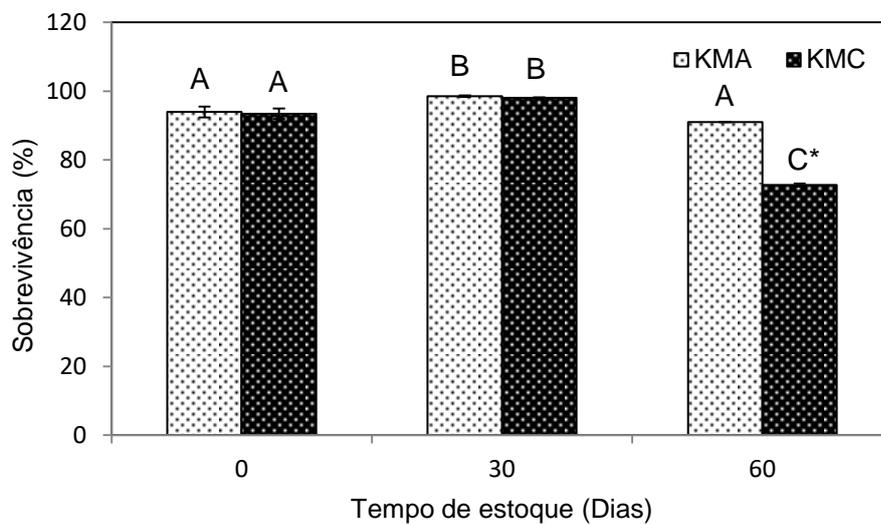
Quanto à sobrevivência de leveduras em ambos os Kefir, a mesma manteve-se superior a 72% no KMC, e 90% no KMA (Figura 9).

Figura 9 – Sobrevivência de bactérias no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), após simulação das condições do TGI durante o estoque.



As letras diferentes (A, B, C) indicam que houve diferença significativa em cada um dos tipos de Kefir ao longo do tempo ($p < 0,05$), e a presença do asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando os dois Kefir foram comparados.

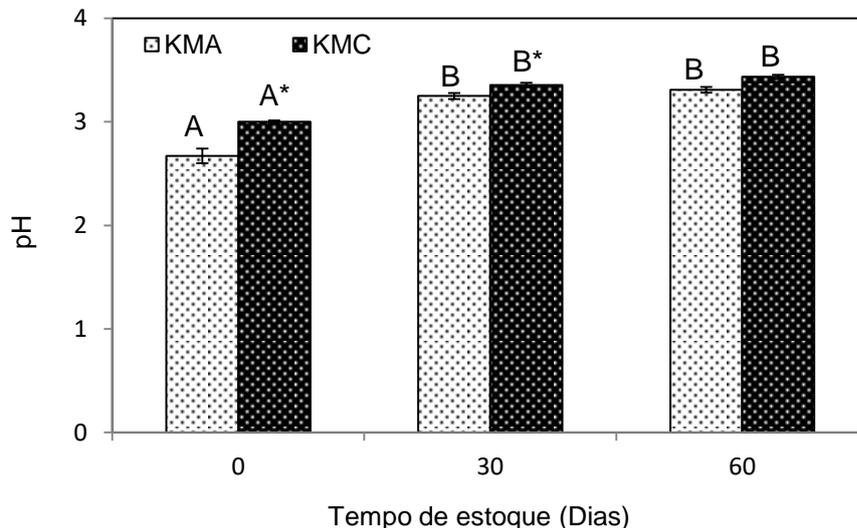
Figura 10 – Sobrevivência de leveduras no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), após simulação das condições do TGI durante o estoque.



As letras diferentes (A, B, C) indicam que houve diferença significativa em cada um dos tipos de Kefir ao longo do tempo ($p < 0,05$), e a presença do asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando os dois Kefir foram comparados.

O pH das bebidas variou entre 0 e 30 dias, apresentando aumento significativo. Já entre os tempos 30 e 60 dias o pH se manteve constante em ambos. Houve diferença significativa quando se comparou o pH das duas bebidas com 0 e 30 dias e não houve diferença com 60 dias (Figura 11).

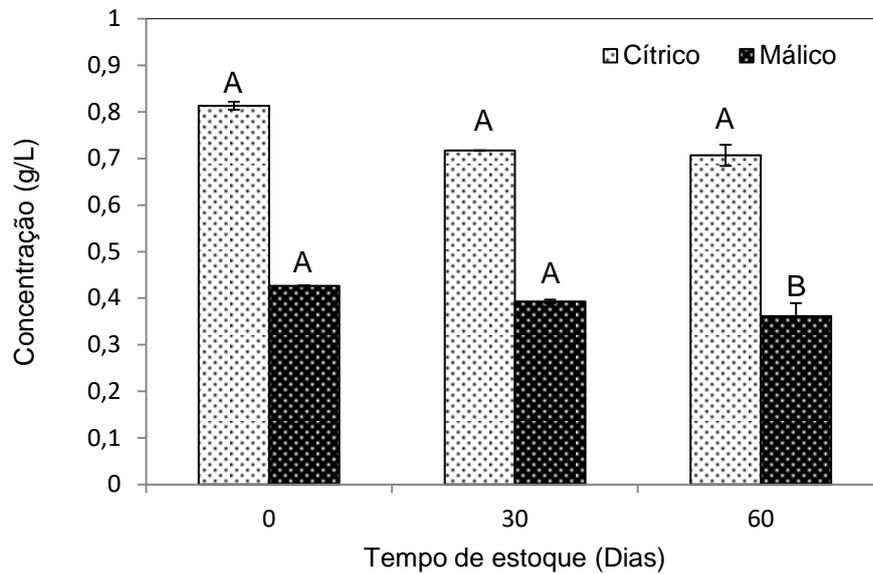
Figura 11 – Valores de pH no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.



As letras diferentes (A e B) indicam que houve diferença significativa em cada um dos tipos de Kefir ao longo do tempo ($p < 0,05$), e a presença do asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando os dois Kefir foram comparados

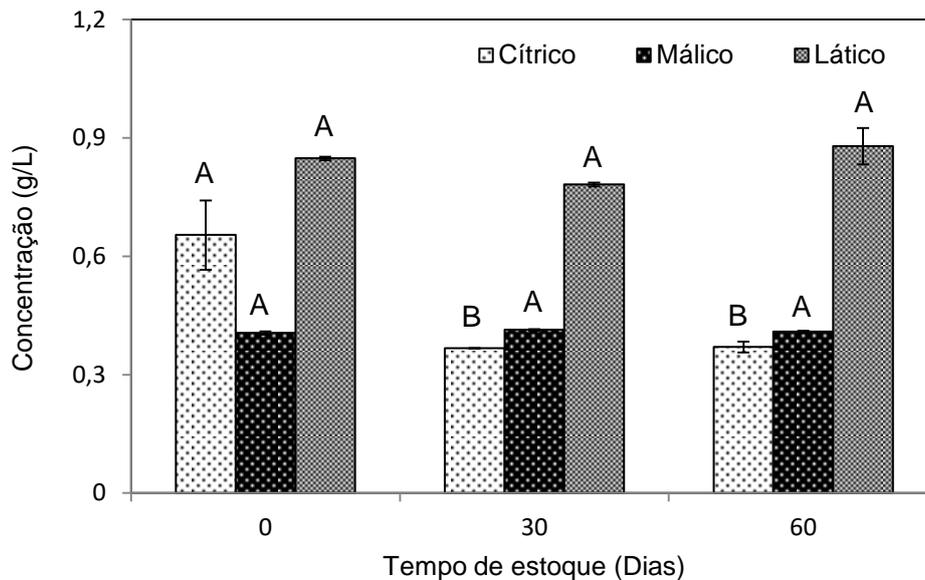
Os ácidos cítrico e málico foram quantificados no KMA (Figura 12). O ácido cítrico manteve sua concentração ao longo dos 60 dias de estoque, entre 0,71 g/L e 0,81 g/L. O ácido málico apresentou declínio aos 60 dias. O ácido láctico não foi encontrado no KMA. Com relação ao KMC, as concentrações de ácido málico e láctico se mantiveram semelhantes ao longo do estoque, entretanto no que diz respeito ao ácido cítrico a concentração inicial foi de 0,65 g/L e decaiu significativamente para 0,35 g/L aproximadamente (Figura 13).

Figura 12 – Concentração dos Ácidos Cítrico e Málico no Kefir do maracujá amarelo (KMA) durante o estoque.



As letras diferentes (A e B) indicam que houve diferença significativa na concentração desses ácidos ao longo do estoque ($p < 0,05$).

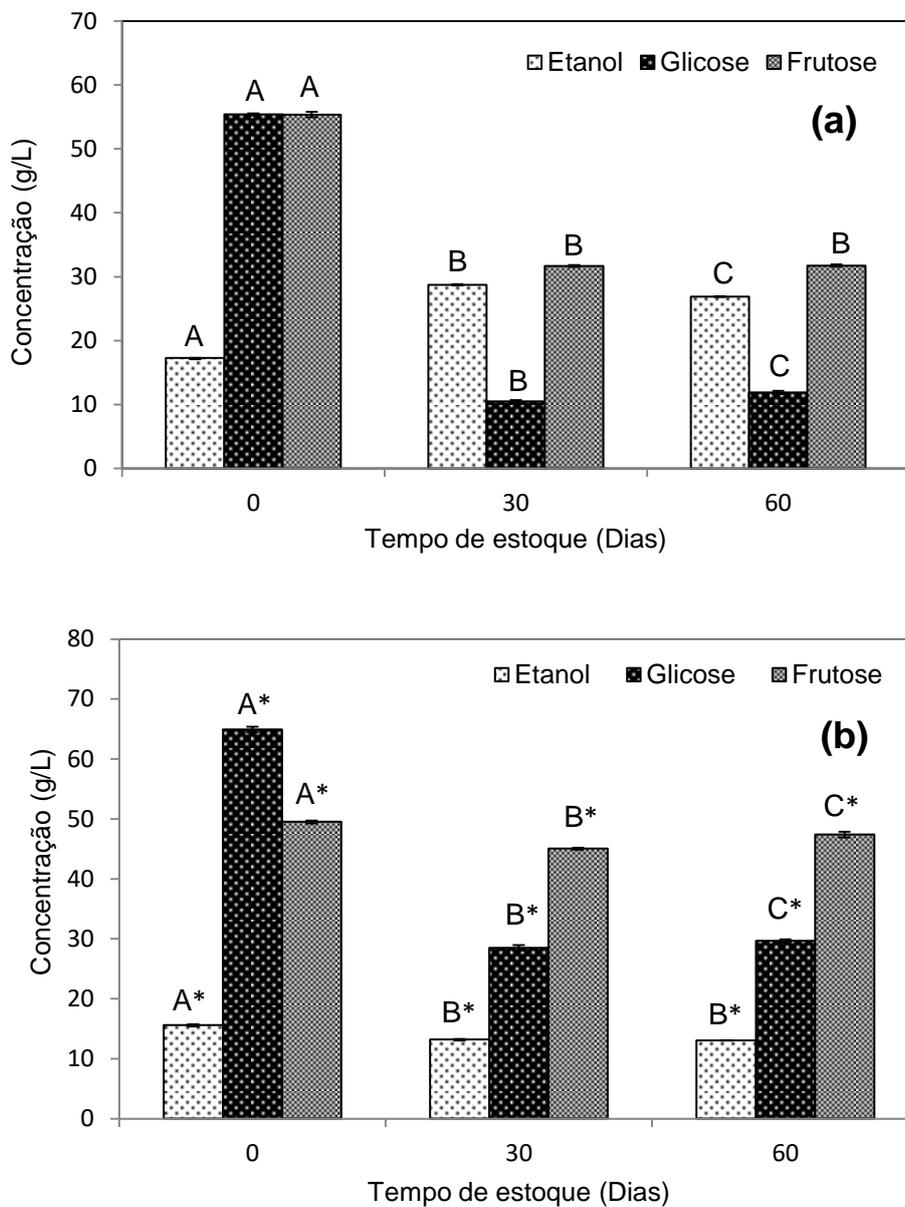
Figura 13 – Concentração dos Ácidos Cítrico, Málico e Láctico no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), durante o estoque.



As letras diferentes (A e B) indicam que houve diferença significativa na concentração dos ácidos ao longo do estoque ($p < 0,05$).

As concentrações de glicose e frutose variaram em cada Kefir ao longo do estoque, bem como quando os dois foram comparados (Figuras 14a e 14b). A concentração de etanol manteve-se constante apenas no KMC entre 30 e 60 dias de estoque.

Figura 14 – Variação nas concentrações de etanol, glicose e frutose no Kefir do maracujá amarelo (KMA) (a) e no Kefir do maracujá da Caatinga (KMC) (b) durante o estoque.

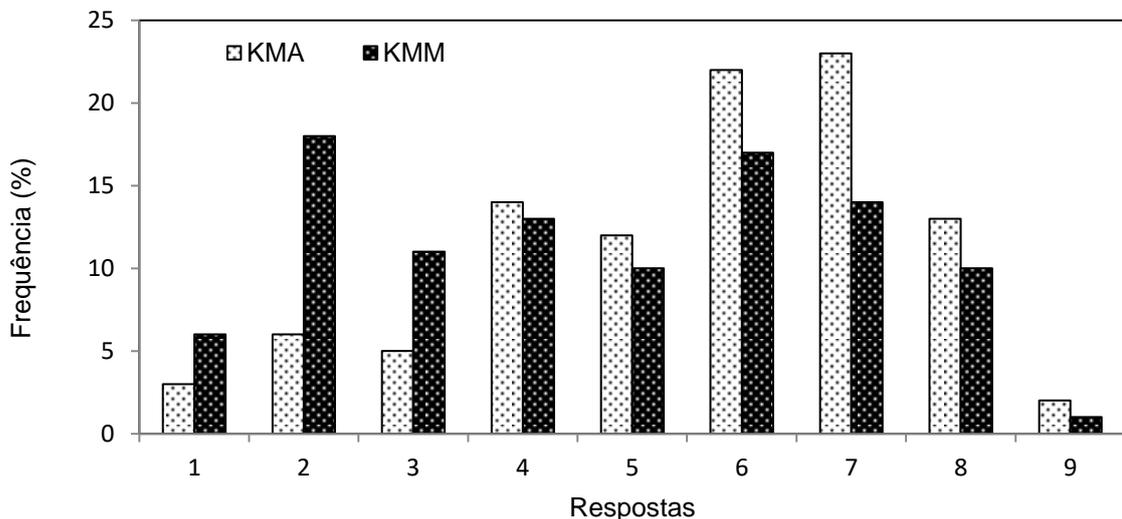


As letras diferentes (A, B, C) indicam que houve diferença significativa nas concentrações de etanol, glicose e frutose ao longo do tempo ($p < 0,05$), e a presença do asterisco indica que houve diferença significativa ($p < 0,05$) quando os dois Kefir foram comparados.

Com relação à análise sensorial, 104 provadores participaram desta etapa, 4 dos questionários respondidos foram excluídos por erro no preenchimento, totalizando 100 provadores, sendo 74 % do sexo feminino. Esta etapa foi realizada após resultado da análise microbiológica que determinou que os produtos estavam próprios para o consumo.

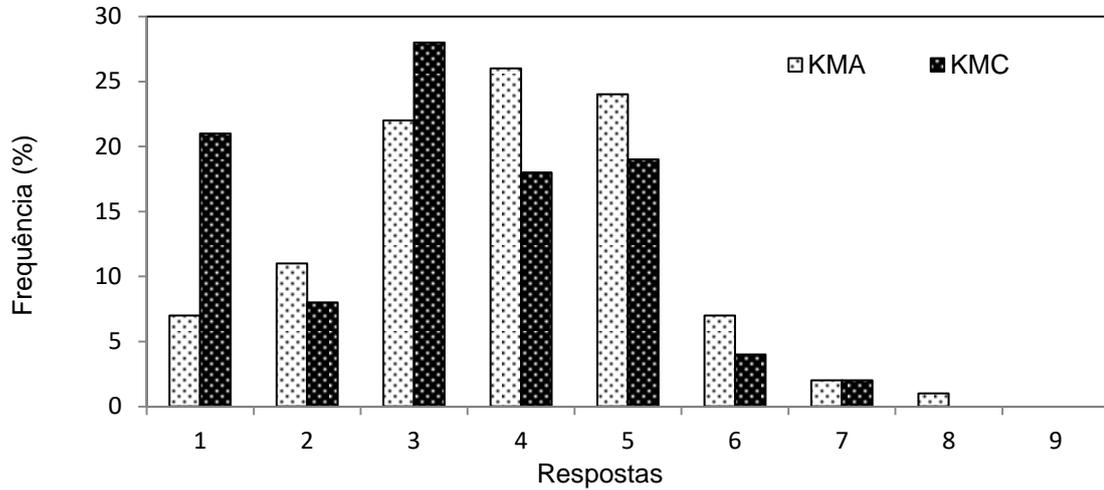
O requisito intenção de compra não diferiu entre o KMA e KMC ($p=0,117$), entretanto, segundo avaliação dos provadores a bebida que apresentou a maior aceitação com relação ao sabor foi o KMA obtendo a média de respostas estatisticamente maior, correspondente a 6 – gostei ligeiramente, quando comparado ao KMC, cuja média atribuída foi 5 – nem gostei, nem desgostei ($p=0,001$). As Figuras 15 e 16 demonstram a frequência em que cada uma das respostas foi dada.

Figura 15 – Histogramas de frequência das respostas de satisfação (gosto) no Kefir do maracujá amarelo (KMA) e Kefir do maracujá da Caatinga (KMC), após 60 dias de estoque.



A representação gráfica demonstra quantas vezes cada resposta foi dada ao questionário para cada tipo de Kefir. Respostas: 1 – Desgostei extremamente, 2 – Desgostei muito, 3 – Desgostei moderadamente, 4 – Desgostei ligeiramente, 5 – Nem gostei/nem desgostei, 6 – Gostei ligeiramente, 7 – Gostei moderadamente, 8 – Gostei muito, 9 – Gostei extremamente.

Figura 16 – Histogramas de frequência das respostas de intenção de compra do Kefir do maracujá amarelo (KMA) e do Kefir do maracujá da Caatinga (KMC) após 60 dias de estoque.



A representação gráfica demonstra quantas vezes cada resposta foi dada ao questionário para cada tipo de Kefir. Respostas: 1 – Nunca compraria, 2 – Compraria se não houvesse outro, 3 – Não compraria, 4 – Compraria se estivesse acessível, 5 – Compraria, 6 – Compraria frequentemente, 7 – Compraria muito frequentemente.

7 DISCUSSÃO

No presente estudo avaliou-se a estabilidade dos microrganismos encontrados no Kefir de duas espécies diferentes de maracujá ao longo de 60 dias de estoque. A produção do maracujá amarelo já é bem estabelecida no Brasil, e os resultados obtidos neste trabalho colaboram para a popularização do maracujá da Caatinga contribuindo para que se dê uma maior ênfase ao seu cultivo, possibilitando a sua utilização para a formulação de novos produtos e gerando renda para a população produtora.

A viabilidade de bactérias e leveduras dos dois tipos de maracujá no início do estoque foi alta, e após os testes de sobrevivência simulando as condições do TGI os microrganismos permaneceram viáveis.

Aos 30 dias de estoque observou-se um discreto declínio da viabilidade de bactérias (1 Log) em ambos os Kefir. No estudo de Farias et al. (2016), que utilizou como matriz alimentar o suco do maracujá da Caatinga para formulação de bebida probiótica fermentada utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, a viabilidade foi acima de 8 Log UFC/mL após 28 dias de estoque refrigerado. Este achado corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, mostrando que o suco do maracujá da Caatinga tem potencial para uso como substrato alimentar na formulação de Kefir. Além do maracujá, outros vegetais vêm sendo estudados na formulação de bebidas probióticas como beterraba, tomate, repolho e cenoura (YOON et al., 2004; YOON et al., 2005; YOON et al., 2006; NAZZARO et al., 2008); bem como na produção do próprio Kefir incluindo frutas como maçã, uva, romã, kiwi e pêra (RANDAZZO et al., 2016). Com 60 dias de estoque, a viabilidade de bactérias permaneceu em queda (caiu para 6 Log UFC/mL) nos os dois Kefir.

A sobrevivência de bactérias após simulação das condições do TGI no início do estoque foi maior no KMA (99%), enquanto aproximadamente 93% das leveduras em ambos os Kefir sobreviveram. Aos 30 dias, assim como a viabilidade, a sobrevivência bactérias também apresentou declínio, que foi mais expressivo no KMA (61%) quando comparado ao KMC, cuja sobrevivência permaneceu superior a 90%. A viabilidade de bactérias ao final do teste de sobrevivência no TGI decaiu para 5 Log UFC/mL no KMC e para 3 Log UFC/mL no KMA, portanto, a

sobrevivência foi maior no KMC (75%) comparada a taxa do KMA (47%). Esta diminuição está relacionada provavelmente à menor disponibilidade de nutrientes no meio, uma vez que passados 60 dias, a maior parte dos nutrientes já foi metabolizada. Apesar disso, mais uma vez, o maracujá da Caatinga foi mais eficiente na manutenção da viabilidade de bactérias. Entretanto, com 60 dias de estoque, a sobrevivência de leveduras foi maior no KMA (91%) quando comparada à sobrevivência no KMC (72%).

De forma geral as leveduras apresentaram maiores viabilidades e sobrevivência do que as bactérias e, portanto, pode-se dizer que foram mais tolerantes ao estoque e às condições gastrointestinais as quais foram submetidas. A viabilidade de bactérias e leveduras apresentou valores superiores a 6 Log UFC/mL no Kefir do Maracujá da Caatinga ao longo de todo o estoque, e a sobrevivência sempre foi maior que 70%. Já o Kefir do Maracujá Amarelo apresentou alta viabilidade e sobrevivência de leveduras durante o estoque, porém em relação às bactérias a viabilidade mais alta foi observada no primeiro dia de análise e declinou ao longo do tempo, este achado também se refletiu na sobrevivência com redução significativa, próxima a 50% no final do estoque.

Kandyliis et al. (2016) sugere que para exercer efeitos terapêuticos os microrganismos probióticos devem estar vivos e disponíveis em numero elevado, geralmente superior a 10^8 a 10^9 células por grama de produto no momento do consumo; portanto, em todo o estoque as duas bebidas estudadas quando somadas bactérias e leveduras apresentaram números superiores a estes, o que garante sua possível ação probiótica. Considerando a sobrevivência, mesmo depois de serem submetidos às condições estressantes do TGI, quando somados, bactérias e leveduras conseguiram se manter em número superior a 10^6 e 10^7 UFC/mL, sugerido por Nazzaro et al., (2009) como sendo o mínimo suficiente que possa chegar ao colon, capaz exercer suas ações benéficas.

No presente estudo, ao levarmos em consideração as reduções na sobrevivência das bactérias e leveduras, podemos observar que o KMC apresentou um resultado mais estável (11% para bactérias e 22,5% para leveduras), com sobrevivência de ambos os microrganismos sempre superiores a 70%.

A concentração de ácidos cítrico (0,37 g/L) e málico (0,41 g/L) no KMC diferiram do estudo de Farias et al., (2016), que encontrou concentrações de ácido cítrico e málico de $5,81 \pm 0,26$ g/L e $0,78 \pm 0,05$ g/L, respectivamente; também utilizando o maracujá da caatinga na elaboração de uma bebida probiótica. No entanto, fatores como o grau de maturação do fruto e a concentração da polpa utilizada na elaboração da bebida podem interferir nas suas concentrações.

O ácido láctico não foi identificado no KMA, bem como a concentração encontrada no KMC foi muito baixa ($0,85 \pm 0,04$ g/L). Magalhães et al. (2010) relataram que a presença de leveduras de gênero *Kazachstania* no Kefir poderia estar relacionada com a assimilação de alguns ácidos produzidos por bactérias ácido lácticas. Em outro estudo, *Kluyveromyces marxianus* mostrou forte atividade sob estado ácido, consumiu parte do ácido láctico com produção de etanol e dióxido de carbono (ZHOU et al., 2009). A presença de *Saccharomyces cerevisiae* também pode contribuir com a redução da concentração de ácido láctico (MAGALHÃES et al., 2010).

O aumento do pH e posterior estabilização durante o estoque, provavelmente foi devido a baixa produção do ácido láctico no KMC e ausência no KMA. Este achado difere do encontrado por Santos et al. (2017), que em seu estudo também utilizando o maracujá da caatinga houve diminuição do pH da bebida fermentada e aumento concomitante da concentração do ácido láctico ao longo do estoque.

As concentrações de etanol encontradas no presente estudos variaram de 2,2% a 3,4% (v/v) no KMA e de 1,64% a 2% (v/v) no KMC; resultados semelhantes aos encontrados por Randazzo et al. (2016), que mencionam em sua investigação as concentrações de 2,67% (v/v) no Kefir do suco de maçã; 1,3% (v/v) no de kiwi e 2,31% (v/v) no Kefir de pera, após 48h de fermentação. Independente do tempo de estoque, as concentrações presentes nos dois tipos de Kefir os caracterizam como bebidas alcólicas segundo a legislação brasileira, por apresentar teores de etanol superiores a 0,5% (v/v) (BRASIL, 2009).

Leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, que apresentam forte metabolismo fermentativo e tolerância ao etanol, é a principal responsável pela produção de álcool e já foi previamente identificada em bebidas tipo Kefir (Pereira et al., 2010). Além disso, algumas espécies do gênero *Lactobacillus* também têm a

capacidade de produzir etanol, uma vez que possuem atividade de álcool desidrogenase, uma enzima capaz de converter acetaldeído em etanol (MAGALHÃES et al., 2011). Beshkova et al. (2003) relataram que o teor de álcool deve ser o suficiente para dar ao Kefir um típico sabor alcoólico leve. Apesar de outros estudos envolvendo Kefir onde os teores de etanol foram inferiores (ZAJSEK, GORSEK, 2010; MAGALHÃES et al, 2010; MAGALHÃES et al., 2011), Güzel-Seydim et al. (2000) afirmam que os produtos finais da fermentação de leveduras como etanol e CO₂ são pontos críticos no sabor e aroma do autêntico Kefir.

A presença de glicose identificada no KMA em maior concentração no início do estoque, seguido de declínio significativo pode ser justificada pelo possível consumo e concomitante elevação das concentrações de etanol resultante do metabolismo dos microrganismos, diferente do KMC, onde houve consumo de glicose, entretanto as concentrações etanol não se alteraram, podendo ser resultado apenas da manutenção da viabilidade microbiana.

A análise sensorial mostrou uma maior preferência pelo KMA (média 6 – “gostei ligeiramente”) quando comparado ao KMC (média 5 – “nem gostei nem desgostei”), o que refletiu na intenção de compra (média 4 – “compraria se estivesse acessível para o KMA e média 3 – “não compraria” para o KMC). Segundo Araujo et al. (2002) o maracujá da Caatinga apresenta um sabor mais longo, mais doce e menos ácido que o maracujá amarelo, atributos sensoriais normalmente mais bem aceitos pela população, entretanto, a preferência pode ser justificada pela popularização do maracujá amarelo.

A intenção de compra pode ser um reflexo do baixo consumo habitual deste tipo produto. O Kefir apresenta um sabor característico incomum, e a falta de conhecimento acerca de produtos fermentados pode induzir a sua rejeição, uma vez que a população normalmente associa bebidas gaseificadas a refrigerantes que são amplamente consumidos e ricos em açúcar, o que melhora seu sabor. Futuramente com a maior popularização deste tipo de bebida, associada ao conhecimento com relação aos diversos benefícios à saúde que ela proporciona, este cenário pode ser modificado.

8 CONCLUSÕES

Ambos os tipos de maracujá se mostraram veículos favoráveis para a produção de Kefir, contribuindo para a sobrevivência dos microrganismos probióticos e desta forma permitindo que seus atributos benéficos sejam aproveitados pelos consumidores.

O Kefir de Maracujá Amarelo apresentou maior sobrevivência de leveduras durante o estoque. Em relação as bactérias a maior viabilidade foi observada no início do estoque e decaiu ao longo do tempo.

Ao levar em consideração as reduções na sobrevivência de bactérias e leveduras, podemos observar que o Kefir de Maracujá da Caatinga apresentou maior estabilidade ao longo de todo o estoque, com taxas de sobrevivência sempre superiores a 70% mesmo depois de submetidos as condições simuladas do TGI.

A análise sensorial demonstrou uma aceitação razoável ao tipo de bebida Kefir, e os provadores se mostraram mais satisfeitos com o Kefir de maracujá amarelo. Do mesmo modo ocorreu ao ser avaliado o requisito intenção de compra, cujo resultado apesar de insatisfatório favoreceu o maracujá amarelo.

REFERÊNCIAS

- AMARA, A. A.; SHIBL, A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.23, n. 2, p.107–114, 2015.
- ARAÚJO, F. P., SANTOS, C. A. F., SILVA, G. C., & ASSIS, J. S. Caracterização de frutos de maracujá do mato (*Passiflora cincinnata* Mast.). In Congresso nacional de botânica, 53. Reunião nordestina de botânica, 25, Recife, 2002.
- ARAÚJO, F.P.; SANTOS, C.A.F.; MELO, N.F. propagação vegetativa do maracujá do mato: espécie resistente à seca, de potencial econômico para agricultura de sequeiro. **Instruções Técnicas da Embrapa Semi-Árido**. v.61, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**, 13 ed., Washington, AOAC, 2002.
- BONGAERTS, G. P. A.; SEVERIJNEN, R. S. V. M. A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. **Nature Biotechnology**, v.34, n.1, p.55–63, 2016.
- BRANDT, K.G.; SAMPAIO, M.M.S.C.; MIUKI, C. J. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**, v.28, n.2, p.117-127, 2006.
- BRASIL, 2001. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 03 de janeiro de 2017.
- COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; SANZ, Y. The impact of probiotic on gut health. **Current Drug Metabolism**, v.10, n.1, p.68-78, 2009.
- CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G. SETTANI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices, **Food Science and Technology**, v.66, p.572-581, 2016.

DICKS, L.M.T.; BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. **Beneficial Microbes**, v.1, n.1, p.11-29, 2010.

EMBRAPA, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/3450/maracuja---brs-sertao-forte-brs-sf>

FARIAS, N.; SOARES, M.; GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**, v.71, p.149-154, 2016.

FARMING, 2017. Disponível em:

https://www.google.com.br/search?q=maracujá+amarelo+embrapa&rlz=1C1CHZL_pt-BRBR693BR693&source=Inms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiFjb-R6vbXAhWKjZAKHWKcCaAQ_AUICygC&biw=1366&bih=662#imgrc=GDOADFyFoTpkgM:

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

HARRIS, K.; KASSIS, A.; MAJOR, G.; CHOU, C.J. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? **Journal of Obesity**, 2012.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v.7, p.58–63, 2016.

KUMAR, M.; NAGPAL, R.; HEMALATHA, R.; YADAV, H.; MAROTTA, F. Probiotics and Prebiotics for Promoting Health. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1^o. ed. Italy: Elsevier Inc., p.75–85, 2016.

LEITE, A.M.O.; LEITE, D.C.A.; DEL AGUILA, E. M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S.; MIGUEL, ET AL. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.4149–4159, 2012.

- LI, X.Y., CHEN, X.G., SUN, Z.W., PARK, H.J., CHA, D-S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.1479-85, 2011.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Revista Iberoamericana Micologia**, v.23, p.67-74, 2006.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.693-702, 2011.
- MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, G.V. DE M., DIAS, D. R., SCHWAN, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, n.7, p.241–1250, 2010.
- MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, M. A., NICOLAU, A., DRAGONE, G., DOMINGUES, L., TEIXEIRA, J. A., et al. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v.101, n.22, p.8843–8850, 2010.
- MARHAMATIZADEH, M.H.; REZAZADEH, S.; KAZEMEINI, F.; KAZEMI, M.R. The Study of Probiotic Juice Product Conditions Supplemented by Culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **Middle-East Journal of Scientific Research**, vol.11, n.3, p.287-295, 2012.
- MARSH, A.J.; O’SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R.P.; COTTER, P.D. Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. 693-71, 2013.
- MELETTI, L.M.M.; BRÜCKNER, C.H. Melhoramento Genético. In: BRÜCKNER, C.H.; PICANÇO, M.C. Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, p. 345-385, 2001.
- MELETTI, L.M.M. Tendências e Perspectivas da Pesquisa em Melhoramento Genético do Maracujazeiro. In: **Reunião Técnica de Pesquisa em Maracujazeiro**. v.3, p. 81-87, 2002.

MIGUEL, Maria Gabriela da Cruz Perozo. Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e água de diferentes localidades. 2009. 71 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., COPPOLA, R., SADA, A., ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v.1, p.319-23, 2009.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., SADA, A., ORLANDO, P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.13, p.2271-2276, 2008.

PAIXÃO, L.A., CASTRO, F.F.S. Colonization of the intestinal microbiota and its influence on health host. **Universitas: Ciências da Saúde, Brasília**, v.14, n.1, p.85-96, 2016.

PITA, J. S.L. Caracterização Físico-Química e Nutricional da Polpa e Farinha da Casca de Maracujazeiros do Mato e Amarelo. Itapetinga, Bahia, 2012.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

PUERARI, C.; MAGALHÃES, K.T.; SCHWAN, R.F. New cocoa pulp-based kefir beverages: microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, v. 48, p. 634-640, 2012.

QIN J, LI R, RAES J, ARUMUGAM M, BURGDORF KS, MANICHANH C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, v.464 (7285), p.59-65, 2010.

RANDAZZO, W.; CORONA, O.; GUARCELLO, R. FRASCESCA, N.; GERMANA, M.A.; ERTEN, H. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v.54, p.40-51, 2016.

- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1-11, 2010.
- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.1, p.01-16, 2006.
- SANTOS, E. ANDRADE, R. GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v. 20, p.56–61, 2017.
- SANTOS, R.; VARAVALHO, M. A importancia de probiotico para o controle e/ou reestruturacao da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, Sao Paulo, v.4, n.1, p.40-49, 2011.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage - a review. **British Food Journal**, v.109, p.280-290, 2007.
- SLEATOR, R. D.; HILL, C. New frontiers in probiotic research. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 143–147, 2008.
- STONE, H.; SIDEL, J.L. **Sensory Evaluation Practices**. 3ª edição. San Diego, 2004.
- VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v.91, n.1, p.6–21, 2015.
- VIANA, R. O.; MAGALHAES-GUEDES, K. T.; BRAGA JR, R. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: microbiological, chemical and sensory analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 592-601, 2017.
- WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, n.1, p.33-37, 2004.
- WSZOLEK, M.; TAMIME, A.Y.; MUIR, D.D.; BARCLAY, M.N.I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Food Science and Technology**, v.34, n.4, p.251-261, 2001.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v.38 n.1, p. 73-75, 2005.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v.42, n.4, p.315-318, 2004.

YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v.97, n.1, p.1427-1430, 2006.

ZHOU, J.; LIU, X.; JIANG, H.; DONG, M. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v.26, n.8, p.770–775, 2009.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v.21, n.3, p.569-579, 2001.

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO – PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
NUTRIÇÃO**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa **“INFLUÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE MARACUJÁ SOBRE A VIABILIDADE, PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS DURANTE O ESTOQUE DO KEFIR”**, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) **Roberta Maria Lins Mendes**, Endereço: Rua Coronel Urbano Ribeiro de Sena, 1039, apt. 201, Cajueiro, Recife – PE, e-mail: betinha_mendess@hotmail.com, Fone:(81) 999240710 orientado pela **Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia**, Fone: (81)997045404, e-mail: esterribeiro1971@gmail.com.

Caso este Termo de Consentimento contenha informações que não lhe sejam compreensíveis, as dúvidas podem ser tiradas com a pessoa que está lhe entrevistando e apenas ao final, quando todos os esclarecimentos forem dados, caso concorde com a realização do estudo pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

Caso não concorde, não haverá penalização, bem como será possível retirar o consentimento a qualquer momento, também sem nenhuma penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

A referida pesquisa tem como objetivo avaliar a influência do tipo de Maracujá na elaboração de um Kefir (bebida probiótica, ou seja, apresenta micro-organismos em sua composição que proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro) quanto à sobrevivência de bactérias e de leveduras, parâmetros físico-químicos e sensoriais durante o estoque.

Nesta fase do estudo será realizada a análise sensorial que consistirá na degustação de amostras dos produtos, onde o participante será convidado a expor sua opinião através de escalas hedônicas para avaliar aceitação e intenção de compra do Kefir. Esta análise contribuirá para avaliar além destes critérios, o período de estoque ideal e condições favoráveis de armazenamento. Os riscos inerentes à execução desta etapa são mínimos, entretanto, caso o voluntário apresente alguma alergia aos constituintes do Kefir, por motivos de segurança é preferível que não participe da pesquisa. A elaboração desta bebida probiótica proporcionará benefícios superiores aos possíveis riscos relacionados à sua

produção, além da contribuição científica para uma maior compreensão sobre o tema proposto, o produto final fornecerá resultados que possam colaborar para o desenvolvimento de um alimento funcional que irá contribuir para a saúde dos consumidores no futuro.

Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (questionário de satisfação) ficarão armazenados em pastas de arquivos, e posteriormente tabulados no computador de propriedade do pesquisador, sob a responsabilidade do mesmo no endereço Rua Coronel Urbano Ribeiro de Sena, 1039, apt. 201, Cajueiro, Recife – PE, CEP: 52221-045, pelo período de mínimo 5 anos.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“INFLUÊNCIA DE DUAS ESPÉCIES DE MARACUJÁ SOBRE A VIABILIDADE, PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E SENSORIAIS DURANTE O ESTOQUE DO KEFIR”** como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

Assinatura do participante: _____

Impressão
digital

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B – Formulário de Pesquisa - Análise Sensorial

NOME: _____ **SEXO:** _____ **IDADE:** _____

PROVE cada amostra e utilizando a escala abaixo avalie o quanto você gostou ou desgostou de cada amostra **DE UM MODO GERAL:**

9	Gostei extremamente (adorei)
8	Gostei muito
7	Gostei moderadamente
6	Gostei ligeiramente
5	Nem gostei/nem desgostei
4	Desgostei ligeiramente
3	Desgostei moderadamente
2	Desgostei muito
1	Desgostei extremamente (detestei)

Amostra

Pontuação

PROVE cada amostra e utilizando a escala abaixo avalie a sua intenção de compra do produto, ou seja, caso o produto estivesse a venda qual o grau de certeza que você compraria ou não cada produto:

7	Compraria muito frequentemente
6	Compraria frequentemente
5	Compraria
4	Compraria se estivesse acessível
3	Não compraria
2	Compraria se não tivesse outro
1	Nunca compraria

Amostra

Pontuação

ANEXO 1 – Certificado de apresentação em evento científico



XXI SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS
XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas

Certificamos que o trabalho intitulado

Survival of bacteria and yeasts in the kefir of passion fruit from Caatinga under simulated gastrointestinal conditions

de autoria de

Roberta Mendes, Raissa Holanda de Andrade, Meire dos S. Falcão de Lima, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Ester Ribeiro Gouveia

Foi apresentado na forma pôster no XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos e XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas, de 3 a 6 de setembro de 2017, realizado em Aracaju - SE, Brasil.

[Handwritten signature]

Dra. Cleide Maria Faria Soares
 Unit (Presidente Comitê Científico)



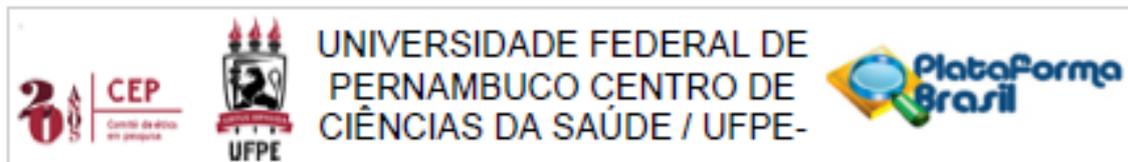
[Handwritten signature]

Dr. Alvaro Silva Lima
 Unit (Presidente do Evento)



d877e1bf368456a484dfe36548b25c684

ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DO TIPO DE MARACUJÁ SOBRE A VIABILIDADE COMERCIAL DO KEFIR DESTES FRUTOS DURANTE O ESTOQUE

Pesquisador: ROBERTA MARIA LINS MENDES

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71328617.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.264.487

Apresentação do Projeto:

Trata-se de Dissertação de mestrado, da aluna do Programa de Pós-graduação ROBERTA MARIA LINS MENDES, sob orientação da profa. Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA.

Objetivo da Pesquisa:

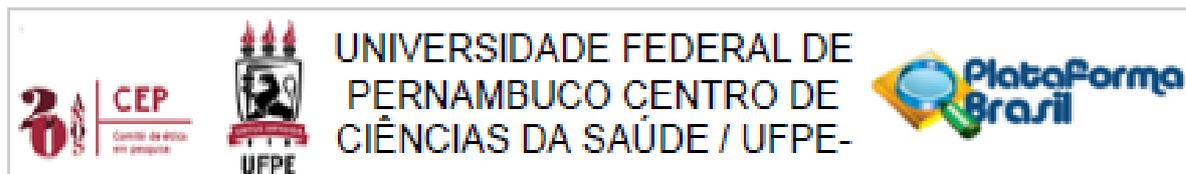
PRIMÁRIO: Avaliar a influência do tipo de Maracujá na elaboração de um kefir comercial quanto à sobrevivência de bactérias e de leveduras, parâmetros físico-químicos e sensoriais durante o estoque. **SECUNDÁRIO:** Comparar a viabilidade de bactérias e leveduras, o teor de ácidos orgânicos, de carboidratos e de etanol, durante os estoques do Kefir do Maracujá da Caatinga e do Kefir do Maracujá Amarelo; •Investigar a sobrevivência de bactérias e leveduras sob as condições simuladas do trato gastrointestinal, durante o estoque de ambas bebidas probióticas; •Realizar análises sensoriais, ao final do estoque, para cada tipo de Kefir de maracujá.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS – Desconforto sensorial ao degustar o produto. Serão tomados os devidos cuidados para minimizar possíveis adversidades.

BENEFÍCIOS: A elaboração desta bebida probiótica proporcionará benefícios superiores aos possíveis riscos relacionados à sua produção, além da contribuição científica para uma maior

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



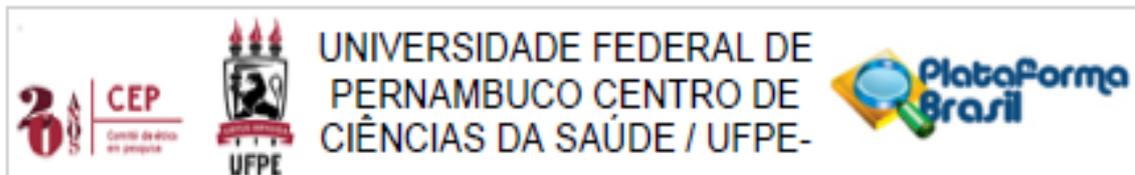
Continuação do Parecer: 2.264.487

compreensão sobre o tema proposto, o produto final fornecerá resultados que possam colaborar para o desenvolvimento de um alimento funcional que irá contribuir para a saúde dos consumidores no futuro.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A elaboração do produto será realizada na empresa BioLogicus, localizada na Avenida Afonso Olindense, 72, Várzea, Recife-PE. As demais etapas do presente estudo ocorrerão no Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (Departamento de Antibióticos) e no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (Departamento de Nutrição), ambos localizados na UFPE. As matérias primas serão obtidas através de doação das cooperativas produtoras das frutas ou através de compra. Os demais materiais (equipamentos, reagentes e outros) já estão disponíveis no laboratório onde serão realizadas as análises, ou serão adquiridos pelos próprios pesquisadores que se responsabilizarão pelos custos. Os maracujás recebidos serão previamente selecionados de acordo com suas características físicas e sensoriais (cor, danos físicos, grau de maturação, qualidade da casca), serão devidamente higienizados e posteriormente manipulados para a retirada da polpa. O fruto será cortado utilizando faca de aço inoxidável e com auxílio de uma peneira será separada a polpa das sementes. As cascas e sementes serão descartadas. A polpa obtida será adicionada dos demais componentes: água, açúcar demerara (10%) e suco de limão (aproximadamente 5 mL para 1 litro produzido). Posteriormente serão adicionados os grãos de kefir para que ocorra a fermentação durante 24 horas a 25°C. Amostras com 24 horas serão submetidas às análises de pH, °Brix, carboidratos, ácidos orgânicos, viabilidade de bactérias e leveduras e sobrevivência destes microorganismos na simulação do trato gastrointestinal. As duas versões do Kefir produzidas serão armazenadas em recipientes hermeticamente fechados em sua embalagem original, sob temperatura de refrigeração (no máximo 4 °C) até o momento das análises. Ambas as condições serão analisadas no início do estoque, após 15 e 30 dias, nos seguintes parâmetros: Viabilidade celular, Sobrevivência dos microrganismos em condições gastrintestinais simuladas, Teor de Ácidos orgânicos, etanol, e carboidratos, através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e ao final do Estoque, após análise microbiológica, será realizada Análise Sensorial. A análise sensorial será iniciada após aprovação do presente estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE. Será realizada ao final do tempo de estoque (30 dias) com ambos os tipos de kefir de maracujá. Os 120 voluntários serão orientados a ler atentamente o Termo Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A), e os pesquisadores deverão esclarecer todas as dúvidas referentes à execução do teste, contribuindo para que o participante tenha segurança durante a execução e que ocorra o mínimo de perdas possíveis. As amostras serão

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefons: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.284.487

avaliadas por meio de testes de aceitação e intenção de compra, utilizando duas escalas hedônicas, a primeira de nove pontos variando de 1 (não gostei muito) a 9 (gostei extremamente), a segunda de 7 pontos variando de 1 (nunca compraria) a 7 (compraria muito frequentemente). O produto será avaliado por 120 provadores não treinados (estudantes, professores e funcionários da UFPE) na faixa etária entre 18 e 45 anos. As amostras serão servidas na temperatura de 4°C aproximadamente, em copos descartáveis numericamente codificados. Água mineral será fornecida aos voluntários para limpar o seu paladar entre a degustação das amostras.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

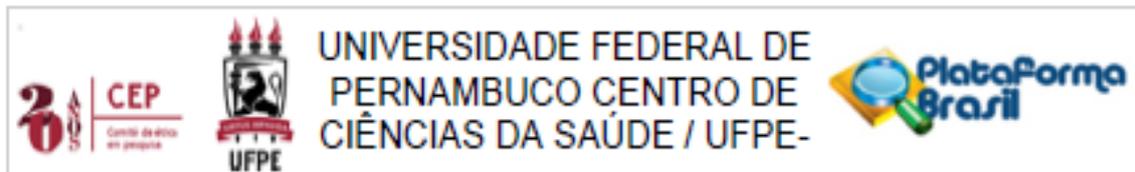
Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.264.487

que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_981248.pdf	17/07/2017 07:52:19		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompletocep.docx	17/07/2017 07:43:53	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostodoc.docx	13/07/2017 08:52:48	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
Outros	lattesroberta.pdf	11/07/2017 22:56:49	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
Outros	cartadeanuencia.JPG	11/07/2017 22:56:10	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
Outros	comprovantematrícula.doc	11/07/2017 22:54:20	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
Outros	lattesorientador.pdf	11/07/2017 22:53:31	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tolemaiores18.doc	11/07/2017 22:51:33	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termodeconfidencialidade.JPG	11/07/2017 22:48:23	ROBERTA MARIA LINS MENDES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 08 de Setembro de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br