



**ROBERTA OLIVEIRA VIANA**

**ELABORAÇÃO DE VINAGRE DE MAÇÃ  
(*Malus spp.*) EMPREGANDO OS GRÃOS DE  
KEFIR COMO INÓCULO**

**LAVRAS - MG**

**2015**

**ROBERTA OLIVEIRA VIANA**

**ELABORAÇÃO DE VINAGRE DE MAÇÃ (*Malus spp.*) EMPREGANDO  
OS GRÃOS DE KEFIR COMO INÓCULO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Rosane Freitas Schwan

Coorientadores

Dr. Disney Ribeiro Dias

Dra. Karina Teixeira Magalhães-Guedes

**LAVRAS - MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Viana, Roberta Oliveira.

Elaboração de vinagre de maçã (*Malus spp.*) empregando os  
grãos de kefir como inóculo / Roberta Oliveira Viana. – Lavras :  
UFLA, 2015.

105 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)—Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientadora: Rosane Freitas Schwan.

Bibliografia.

1. Maçã Kefir. 2. MALDI-TOF. 3. Análise química. 4.  
BioSpeckle. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**ROBERTA OLIVEIRA VIANA**

**ELABORAÇÃO DE VINAGRE DE MAÇÃ (*Malus spp.*) EMPREGANDO  
OS GRÃOS DE KEFIR COMO INÓCULO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 06 de julho de 2015.

Dr. Roberto Alves Braga Junior	UFLA
Dra. Patrícia Pereira Goulart	UNILAVRAS
Dra. Karina Teixeira Magalhães-Guedes	UFLA

Dra. Rosane Freitas Schwan  
Orientadora

Dr. Disney Ribeiro Dias  
Coorientador

**LAVRAS - MG**

**2015**

*Aos meus pais, Roberto e Nádia.  
Às minhas irmãs, Paula e Bruna.  
A toda a carneirada e família Viana.  
E à família que conquistei em Lavras.*

***DEDICO***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me permitir ter fé e forças durante essa jornada, para que eu fizesse sempre o melhor e que nunca desistisse.

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Biologia, em especial ao Programa de Microbiologia, por permitir que eu realizasse o trabalho com todas as ferramentas necessárias.

À professora Rosane, pela orientação, ensinamentos e por confiar a mim esse trabalho e ceder o espaço necessário em seu laboratório para a realização do mesmo.

Ao professor Disney, pela coorientação e confiança.

À doutora Karina, pela coorientação, ensinamentos valiosos, disponibilidade, paciência e confiança durante o trabalho.

Ao professor Whasley, Gabriela e Suzana, pela contribuição valiosa em algumas análises essenciais do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa.

A todos os amigos que conquistei no laboratório, em especial: Tia Deia, que sempre me apoiou no trabalho e na vida, aconselhando-me em tudo que precisei durante a realização do trabalho; Camila, que me ajudou em momentos desesperadores, alegrou-me e me ajudou a crescer; Lulu, por toda a amizade e momentos de descontração na sua casa; Angélica, por toda a ajuda tanto no trabalho quanto em outros quesitos, por sua amizade e companheirismo; Vanessa, por todas as risadas e momentos de alegria; Tenille, por sua amizade sem cobranças e ajuda quando mais precisei; Monique, por seus conselhos sobre o vinagre, e sua amizade, mesmo de longe. E aos demais amigos do laboratório: Ivani, Ana Luiza, Juliana Amorim, Carol, Mariana, Igor, Nádia, Dayana, Juliana Tensol, Pedro, Lucas, Josi, Cintia, William, Pâmela, Annayara, Iara, José, Silvia, pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas do curso de biologia, Juliana, Nathália e Ana, que não me esqueceram depois da formatura e fizeram parte da minha vida durante todo o mestrado e continuarão durante toda a vida.

Aos meus amigos de Viçosa, Sarah, Léo, Isa, Fabiana, Jéssica, Daiane e Waldemiro, por toda a amizade e momentos de alegria em Viçosa.

À família que conquistei em Lavras: Cleusa, Dona Valdete e Sô Geraldo, por todo o acolhimento durante grande parte da minha vida em Lavras, e por ainda me acolherem sempre que necessário.

À minha família: pais, irmãs, primos, tios, avós, tios-avós, que são parte essencial da minha vida, se não fosse por eles, eu não teria motivação para lutar dia a dia.

Obrigada, eu agradeço a todos de coração!

## RESUMO

Preocupações com a valorização de frutos de maçã têm levado a um interesse recente na produção de vinagre kefir de maçã. Conduziu-se, este estudo, com o objetivo de elaborar um vinagre de maçã a partir dos grãos de kefir e estudar esse processo fermentativo, usando a nova metodologia do BioSpeckle laser. Grãos de kefir provindos do Brasil foram inoculados em suco de maçã para a produção de vinagre. Foram analisadas amostras da bebida e grãos. Neste estudo, a comunidade microbiana presente no kefir e vinagre correspondente, foi investigada pela técnica de MALDI-TOF. Os microrganismos foram identificados como *Lactobacillus paracasei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter syzygii*. O consumo de glicose e a produção de etanol e ácido acético, bem como a formação de ácidos orgânicos e compostos voláteis foram determinados durante a fermentação do suco de maçã por grãos de kefir. Os resultados mostraram que os grãos de kefir foram capazes de utilizar o suco de maçã como substrato e produzir etanol e ácido acético. Acetatos, ácidos graxos voláteis, cetonas, e ésteres etil foram também produzidos em vinagre de kefir. O vinagre kefir produzido apresentou um bom rendimento de ácido acético de 79%. O vinagre kefir de maçã apresentou boa aceitação na análise sensorial. Os grãos de kefir demonstraram potencial para serem utilizados como inóculo para o desenvolvimento de vinagre à base de maçã.

Palavras-chave: Maçã. Kefir. MALDI-TOF. Análise química. BioSpeckle.

## ABSTRACT

Concerns regarding the valorization of apple fruits have led to a recent interest on the production of apple kefir vinegar. The aim of this study was to develop an apple vinegar-based kefir and study this fermentation process using new BioSpeckle laser method. Brazilian kefir grains were inoculated in apple juice for the production of vinegar. Samples of the beverage and grains were analyzed. In this study, the microbial community present in kefir and correspondent vinegar, was investigated by means of the MALDI-TOF technique. The microorganisms were affiliated to *Lactobacillus paracasei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* and *Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter syzygii*. Glucose consumption, the production of ethanol and acetic acid, as well as the formation of organic acids and volatile compounds were determined during apple juice fermentation by kefir grains. The results showed that kefir grains were able to utilize apple juice as substrate and produce ethanol and acetic acid. Acetates, volatile fatty acids, ketones, ethyl ester were also produced in vinegar-based kefir. The produced vinegar showed good yield of acetic acid (79%). The apple kefir vinegar showed good acceptance in sensory analysis. The kefir grains showed potential to be used as inoculum for developing apple-based vinegar.

Keywords: Apple. Kefir. Maldi-tof. Chemical analysis. BioSpeckle.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Recipiente utilizado para elaboração de vinagre pelo processo Orleans.....26
- Figura 2 Corte transversal de um acetificador com suporte poroso; A) grade; B) maravalha de madeira; C) bomba para movimentação do vinho em processo de acetificação; D) dispersor do vinho; E) refrigerante de água; F) dispositivo de condensação de vapores.....28
- Figura 3 Corte transversal de um acetificador para elaboração de vinagre pelo método com fermentação acética submersa; a- turbina de ar; b- compensador de ar; c- dispositivo para coletar líquido de condensação; d-e- dispositivo para controlar a formação de espuma; f- dispositivo para medir o álcool; g- serpentina para refrigeração; h- dispositivo para refrigeração; i- termômetro; j- bomba para entrada do vinho; k- bomba para retirada do vinagre.....29
- Figura 4 Grãos de Kefir.....30
- Figura 5 Esquema experimental do aparelho BioSpeckle .....40
- Figura 6 Número de células (LOG UFC/mL) durante a fermentação alcoólica (A) e acética (B): A) Isolados de MRS (—■—), YEPG (---●---), GYC (—▲—); B) MRS 10% (—▲—), GYC 10% (—■—), YEPG 10% (---●---), MRS 20% (—▲—), GYC 20% (—■—), YEPG 20% (—●—). As barras indicam desvio padrão de média .....57
- Figura 7 Identificação microbiana por MALDI-TOF do inóculo grãos de kefir presentes no processo fermentativo do vinagre. A) Início

	do processo fermentativo (0 h). B) Final do processo fermentativo (264 h).....	60
Figura 8	Valores de açúcares totais e pH durante a fermentação alcoólica, descrição: pH (—▲—) °Brix (—■—). As barras indicam desvio padrão de média .....	62
Figura 9	Concentração de glicose (*■—) e Frutose (—●—) durante a fermentação alcoólica. As barras indicam desvio padrão de média .....	64
Figura 10	Concentração de etanol (—●—) e Cncentração de glicerol (—■—) durante a fermentação alcoólica. As barras indicam desvio padrão de média .....	64
Figura 11	Concentração de etanol (—■—) e ácido acético (—●—) durante a fermentação acética conduzida com 10% de inóculo. As barras indicam desvio padrão de média.....	75
Figura 12	Concentração de etanol (—■—) e ácido acético (—●—) durante a fermentação acética conduzida com 20% de inóculo. As barras indicam desvio padrão de média.....	76
Figura 13	Atividade biológica dos grãos de kefir durante a fermentação. As barras indicam desvio padrão de média.....	78
Figura 14	Atividade Biológica dos grãos de kefir durante a fermentação acética: tratamento (1) (■) e tratamento (2) (□). As barras indicam desvio padrão de média .....	79
Figura 15	Perfil sensorial dos vinagres produzidos com grãos de kefir em detrimento do vinagre comercial de maçã. Tratamento (1) - 10% de kefir (—◆—), Tratamento (2) - 20% de kefir (—■—) e Vinagre de maçã Comercial (—▲—). O centro do diagrama corresponde à menor intensidade de sabor, aumentando em direção às extremidades.....	82

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação Taxonômica da maçã .....	17
Tabela 2	Nutrientes presentes na maçã.....	18
Tabela 3	Produção de maçã em 2012 de 20 países.....	21
Tabela 4	Microbiota pertencente ao kefir cultivado em leite, em diferentes locais.....	32
Tabela 5	A composição química do kefir de leite .....	35
Tabela 6	Caracterização bioquímica dos isolados .....	55
Tabela 7	Concentração de ácidos orgânicos durante a fermentação alcoólica.....	66
Tabela 9	Concentração de compostos voláteis (mg.L <sup>-1</sup> ) identificados no fermentado alcoólico por CG-FID .....	68
Tabela 10	Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica.....	73

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Maçã</b> .....	17
<b>2.1.1</b>	<b>Produção de maçã no Brasil</b> .....	20
<b>2.1.2</b>	<b>Produção de maçã no mundo</b> .....	20
<b>2.2</b>	<b>Vinagre</b> .....	21
<b>2.2.1</b>	<b>Tipos de vinagres</b> .....	23
<b>2.2.2</b>	<b>Métodos de produção de vinagre</b> .....	26
<b>2.2.2.1</b>	<b>Método do tonel aberto (Orleans)</b> .....	26
<b>2.2.2.2</b>	<b>Método do gotejamento (vinagre rápido)</b> .....	27
<b>2.2.2.3</b>	<b>Método do borbulhamento (fermentação submersa)</b> .....	28
<b>2.3</b>	<b>Kefir</b> .....	29
<b>2.3.1</b>	<b>Bioquímica do kefir</b> .....	34
<b>2.3.2</b>	<b>Propriedades do kefir</b> .....	37
<b>2.4</b>	<b>Laser Biospeckle</b> .....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	42
<b>3.1</b>	<b>Aquisição das frutas</b> .....	42
<b>3.2</b>	<b>Preparo e caracterização do suco</b> .....	42
<b>3.3</b>	<b>Inóculo</b> .....	43
<b>3.4</b>	<b>Elaboração do vinagre</b> .....	43
<b>3.4.1</b>	<b>Preparo do mosto para fermentação alcoólica</b> .....	43
<b>3.4.2</b>	<b>Fermentação alcoólica</b> .....	43
<b>3.4.2.1</b>	<b>Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica</b> .....	44
<b>3.4.3</b>	<b>Acetificação (fermentação acética)</b> .....	44
<b>3.4.3.1</b>	<b>Cálculo do rendimento e produtividade da fermentação acética</b> ..	45
<b>3.4.4</b>	<b>Análises cromatográficas</b> .....	45
<b>3.4.5</b>	<b>Análises microbiológicas</b> .....	47
<b>3.4.5.1</b>	<b>Análise microbiológica por métodos dependentes de cultivo</b> .....	47
<b>3.4.5.2</b>	<b>Agrupamento dos isolados através de suas características morfológicas e bioquímicas</b> .....	48
<b>3.4.5.3</b>	<b>Análise proteica das células bacterianas</b> .....	48
<b>3.4.5.4</b>	<b>Análise proteica das células leveduriformes</b> .....	49
<b>3.4.5.5</b>	<b>Extração de DNA e PCR (polymerase chain reaction)</b> .....	49
<b>3.4.6</b>	<b>Tratamento do vinagre</b> .....	50
<b>3.4.7</b>	<b>Análises físicas e químicas no vinagre</b> .....	50
<b>3.5</b>	<b>Análise sensorial</b> .....	51
<b>3.6</b>	<b>Análise das atividades metabólicas dos grãos de kefir por laser Biospeckle</b> .....	52
<b>3.7</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	53

<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1</b>	<b>População microbiana durante a fermentação .....</b>	<b>54</b>
<b>4.2</b>	<b>Identificação dos isolados por MALDI-TOF e sequenciamento...</b>	<b>59</b>
<b>4.3</b>	<b>Características da fermentação alcoólica e acética .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises cromatográficas .....</b>	<b>63</b>
<b>4.5</b>	<b>Parâmetros cinéticos.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6</b>	<b>Produção do ácido acético .....</b>	<b>74</b>
<b>4.7</b>	<b>Avaliação da atividade metabólica por Laser BioSpeckle .....</b>	<b>77</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise sensorial .....</b>	<b>81</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>PESPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus spp.*) é uma fruta de clima temperado, que necessita de repouso em temperaturas baixas para quebra de dormência, retomando com floração abundante e conseguinte produção (BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL - BRDE, 2015). Essa fruta apresenta elevados teores de nutrientes, os quais podem trazer benefícios à saúde. No Brasil, a produção da maçã se concentra principalmente no Sul, sendo que os países com maior produção são: China, Estados Unidos, Turquia, Polônia, Índia, Itália, Irã, Chile, Rússia e França, seguidos pelo Brasil (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO, 2015; WOSIACKI; PHOLMAN; NOGUEIRA, 2004).

A maçã é consumida, na maioria das vezes, *in natura*, porém, uma alternativa é o suco de maçã concentrado. O suco da maçã é produzido, geralmente, a partir das frutas que seriam descartadas por não alcançarem um padrão exigido para consumo (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005). Além do suco, a maçã pode ser aproveitada na produção de destilado, sidra, para extração de pectina e elaboração do vinagre.

A elaboração do vinagre de frutas é uma alternativa ao desperdício das frutas que se apresentam fora do padrão de consumo. Algumas frutas utilizadas para a elaboração do vinagre são Carambola, kiwi, laranja, maracujá, toranja, uva, figo, a maçã, dentre outros (ZILIOLI; YOKOYA; SPINOSA, 2011). O vinagre é produzido a partir do processo de fermentação (leveduras produzindo etanol a partir de açúcares), seguido por acetificação (bactérias do ácido acético oxidando o etanol a ácido acético). O vinagre de maçã, especificamente, é obtido a partir da acetificação da sidra, que é o produto da fermentação alcoólica da maçã.

Os principais compostos presentes no vinagre são: ácidos orgânicos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos e outros compostos que apresentam importantes funções fisiológicas (CEREZO et al., 2010; DÁVALOS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVES, 2004; LIU et al., 2008). No processo de fermentação para produção dos vinagres, é necessária a presença de microrganismos fermentadores, como leveduras e bactérias do ácido acético.

A fermentação de produtos em geral é realizada por microrganismos, em razão disso, muitos estudos estão vigentes, visando a encontrar culturas iniciadoras que iniciem o processo (MAGALHÃES et al., 2011b; PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012; SANTOS et al., 2014). Essas culturas iniciadoras devem apresentar as melhores características durante a fermentação e, então, são selecionadas para iniciar o processo. Grãos de kefir são culturas iniciadoras de processos fermentativos como em soro de queijo e bebidas de cacau (MAGALHÃES et al., 2011b; PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012).

O grão de kefir caracteriza-se como uma cultura simbiótica de bactérias e leveduras, sendo considerado um probiótico (GÜZEL-SEYDIM et al., 2005). Os grãos são compostos de água, lipídeos, proteínas, carboidratos e minerais e possuem uma aparência semelhante à couve-flor, com forma irregular, tamanho variando de 3 a 35 mm de diâmetro e coloração amarelada ou esbranquiçada (BERGMANN; PEREIRA; VEIGA, 2010; IRIGOYEN et al., 2005; MACHADO et al., 2012; OTLES; CAGINDI, 2003).

Os grãos de kefir são compostos por uma vasta associação de microrganismos, como: bactérias do ácido láctico (maioria), leveduras e algumas bactérias do ácido acético. Os microrganismos que compõem os grãos têm características probióticas, ou seja, são organismos vivos, que quando ingeridos, exercem efeito benéfico ao hospedeiro.

A atividade metabólica dos grãos de kefir é um importante fator a ser estudado durante o processo fermentativo. Uma alternativa para avaliar essa atividade metabólica é por meio da técnica do BioSpeckle laser (GUEDES et al., 2014). O fenômeno do BioSpeckle laser que tem sido utilizado como uma ferramenta que se aplica ao monitoramento de atividade metabólica, em decorrência das características especiais da luz emitida pelo laser, associadas a fenômenos ópticos que permitem uma série de aplicações (MOREIRA et al., 2002), como, por exemplo, em sementes na avaliação da sua viabilidade, umidade do solo e sementes e qualidade do sêmen de animais.

Tendo como base o descrito acima, conduziu-se, este trabalho, com o objetivo geral de elaboração do vinagre de kefir de maçã e, como objetivos específicos, foi realizado o estudo microbiológico por MALDI-TOF MS e sequenciamento e o desenvolvimento de uma nova metodologia para estudo da atividade biológica dos grãos de kefir.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Maçã

A maçã (*Malus* spp.) é uma fruta de clima temperado, que necessita de repouso em temperaturas baixas para quebra de dormência, retomando com floração abundante e conseguinte produção (BRDE, 2015). Essa fruta apresenta elevados teores de nutrientes, os quais podem trazer benefícios à saúde. Na tabela 1, apresenta-se a classificação da maçã, e a tabela 2, apresenta os nutrientes presentes na maçã.

Tabela 1 Classificação Taxonômica da maçã

Classificação	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Rosales
Família	Rosaceae
Gênero	Mallus
Algumas espécies	<i>Malus domestica</i> , <i>Malus sieversii</i>

Tabela 2 Nutrientes presentes na maçã

Valor Nutritivo de 100 gramas de Maçã		
Nutriente	Unidades	Valor por 100 gramas de porção comestível(*)
Macrocomponentes		
Água	G	83
Energia	kcal	59
Energia	kj	247
Proteína	G	0
Lipídeos (total)	G	0
Carboidratos por diferença	G	15
Fibra dietética (total)	G	2
Cinzas	G	0
Minerais		
Cálcio, Ca	mg	7
Ferro, Fe	mg	0
Magnésio, Mg	mg	5
Fósforo, P	mg	7
Potássio, K	mg	115
Sódio, Na	mg	0
Zinco, Zn	mg	0
Cobre, Cu	mg	0
Manganês, Mn	mg	0
Selênio, Se	mcg	0
Vitaminas		
Vitamina C, Ácido Ascórbico	mg	5
Tiamina (B-1)	mg	0
Riboflavina (B-2)	mg	0

“Tabela 2, conclusão”

Valor Nutritivo de 100 gramas de Maçã		
Nutriente	Unidades	Valor por 100 gramas de porção comestível(*)
Niacina	mg	0
Ácido Pantotênico (B-5)	mg	0
Vitamina B-6	mg	0
Folato (B-9)	mcg	0
Vitamina (B-12)	mcg	0
Vitamina A, IU	IU	53
Vitamina A, RE	mcg_RE	5
Vitamina E	mg_ATE	0

*USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 13 (November 1999)*

A maçã tem propriedades reguladoras, como: ajudar na digestão, moderar o apetite, controlar o colesterol, prevenir alergias e irritações físicas, além de evitar a formação de cálculos renais, limpar o sangue e prevenir o câncer do sistema digestivo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ - ABPM, 2015). Essa fruta possui sabor doce-ácido, com propriedades refrescantes e adstringentes e seu consumo, geralmente, é feito *in natura*. Outras alternativas do uso da maçã, como o suco concentrado de maçã, sidra e elaboração de vinagre, evita o desperdício de frutas que se apresentam fora do padrão de consumo (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005).

De acordo com normas técnicas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, a maçã foi a fruta pioneira no Brasil (BRDE, 2015).

### **2.1.1 Produção de maçã no Brasil**

A produção de maçãs em escala comercial no Brasil começou na década de 1960. A partir de então, a maçã passou de segundo principal item agrícola em importação no começo dos anos 1960, à geradora de divisas, por meio da exportação, a partir do final dos anos 1980 (BRDE, 2015).

O cultivo da maçã no Brasil concentra-se, principalmente, no sul do país. Santa Catarina e o Rio Grande do Sul são os principais Estados produtores de maçã. Em 2009, o município de São Joaquim-SC apresentou uma produção de 214.200 toneladas, Fraiburgo-SC produziu 140.506 toneladas e Vacaria-RS apresentou a maior produção, 217.000 toneladas (BRDE, 2015). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2015), a área de produção no Brasil permaneceu estável, desde 2008, em torno de 39000 ha, mas a produção brasileira de maçã veio caindo, desde 2013, quando ocorreu uma queda de 8% e, em 2014, a safra teve uma queda de 5% em relação ao ano anterior.

### **2.1.2 Produção de maçã no mundo**

A produção de maçã no mundo, em 2012, foi de aproximadamente 200 milhões de toneladas, tendo como principais países produtores de maçã: a China, os Estados Unidos, a Turquia, a Polônia, a Índia, a Itália, o Irã, o Chile e a Rússia (FAO, 2015).

Na tabela 3, apresenta-se a produção de maçã de 20 países em 2012.

Tabela 3 Produção de maçã em 2012 de 20 países

Ranking	Países	Produção (\$1000)	Produção (MT)
1	China	15647818	37000000
2	Estados Unidos	1738195	4110046
3	Turquia	12211798	2889000
4	Polônia	1216865	2877336
5	Índia	931848	2203400
6	Itália	842153	1991312
7	Irã	718953	1700000
8	Chile	687235	1625000
9	Rússia	593348	1403000
10	França	584848	1382901
11	Brasil	564792	1335478
12	Argentina	1250000	1250000
13	Ucrânia	1126800	1126800
14	Alemanha	972405	972405
15	África do Sul	795758	795758
16	Japão	793800	793800
17	Coréia	785000	785000
18	Uzbequistão	820000	820000
19	Hungria	650595	650595
20	Paquistão	620000	620000

Fonte: FAO (2015) modificado.

## 2.2 Vinagre

O vinagre, que significa “vinho azedo”, é um produto bastante antigo, datado de 8000 a.C. No surgimento do vinagre, tratava-se de um condimento bem aproveitado, em decorrência das propriedades benéficas que proporcionava ao organismo humano, sendo importante na alimentação. O produto era utilizado também de outras formas, como uma bebida refrescante e medicamento

(EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2002).

A obtenção do vinagre pode advir da fermentação de diversos substratos, os quais são fonte de etanol, são eles: o mosto de frutas, vinho e sidra, soro de queijo, mel, dentre outros, além de poder ser elaborado, sinteticamente, a partir de gás natural e derivados do petróleo (GHOSH et al., 2013). Muitos compostos estão presentes no vinagre, dentre eles, os principais são: ácidos orgânicos (ácido acético, ácido tartárico, ácido cítrico, dentre outros), vitaminas, minerais, compostos fenólicos e outros compostos que apresentam importantes funções fisiológicas (CEREZO et al., 2010; DÁVALOS; BARTOLOMÉ; GÓMEZ-CORDOVES, 2004; LIU et al., 2008).

O vinagre é obtido em um processo que envolve duas etapas: 1) fermentação alcoólica, que utiliza mono ou dissacarídeos presentes no mosto, convertendo-os a etanol por ação de leveduras; 2) fermentação acética (acetificação), a qual é conduzida por bactérias do ácido acético (BAA), que oxidam o etanol a ácido acético. Na produção de alguns vinagres específicos, como o vinagre de cerveja e o vinagre de sakê, pode haver a presença de bactérias do ácido láctico e de fungos filamentosos (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001).

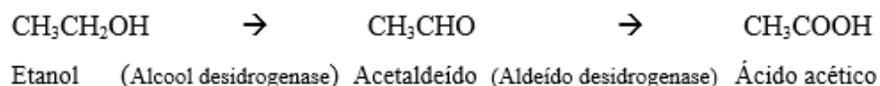
A fermentação alcoólica para produção de vinagre é, na maioria das vezes, realizada por *Saccharomyces cerevisiae*. Essa fermentação consiste em utilizar os açúcares presentes no substrato inicial, como as frutas, e convertê-la em etanol, formando um produto alcoólico.

A fermentação acética, mostrada abaixo, metabolicamente não é uma fermentação, pois é um processo aeróbio, assim sendo chamada acetificação. Durante esse processo, BAA estão presentes oxidando o etanol a ácido acético, principal composto do vinagre. As principais BAA envolvidas na conversão de etanol a ácido acético são *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter oxidans* e

*Gluconacetobacter* sp (BARTOWSKY et al., 2003; GONZÁLEZ et al., 2004).

Abaixo está a equação de conversão do etanol ao ácido acético (Equação 1).

Equação 1 Conversão do etanol à ácido acético



O vinagre é considerado um produto de baixo custo, podendo ser obtido a partir de vários substratos. Nesse sentido, utilizar o suco de maçã associado aos grãos de kefir, pode ser uma alternativa viável para os pequenos produtores ou mesmo para indústrias.

### 2.2.1 Tipos de vinagres

Qualquer substrato que seja fonte de carboidrato fermentescível pode ser usado na fabricação do vinagre. Diversas matérias-primas têm sido usadas, sendo as uvas consideradas o mais tradicional. Além das uvas, também são considerados vinagres tradicionais aqueles feitos a partir de sidra (maçãs), saquê (arroz) e cerveja (malte), porém, ainda existem diversas fontes não tradicionais, como: laranja, mel, manga, banana, abacaxi, amora, caju, tamarindo, kiwi, maracujá, jabuticaba e cebola. No Brasil, a maioria dos vinagres são produzidos a partir do etanol de cana-de-açúcar e nos Estados Unidos a partir de etanol de cereais, especialmente o de milho (BOFFO et al., 2009; HORIUCHI; KANNO; KOBAYASHI, 1999; MALDONADO; ROLZ; CABRERA, 1975; NATERA et al., 2003; SPINOSA, 1996).

A variedade dos vinagres, difere muito de país para país. Alguns dos vinagres mais populares são (CRISCO, 2005).

- a) vinagre balsâmico é de cor marrom com um sabor agridoce, feito a partir da uva e envelhecido em barris de madeira. Alguns vinagres balsâmicos gourmet têm mais de 100 anos;
- b) vinagre de cana-de-açúcar: feito a partir de cana fermentada e tem um sabor rico e doce muito leve;
- c) vinagre de champagne: não tem bolhas. Ele é feito de um vinho branco seco;
- d) vinagre de coco: com baixa acidez, um sabor único, ele é usado em muitos pratos tailandeses;
- e) vinagre de destilado: feito a partir de grãos e é geralmente incolor;
- f) vinagre de malte: muito popular na Inglaterra, feito de cevada fermentada e é aromatizado em madeiras. Ele tem um forte sabor e é frequentemente servido com peixe e batatas fritas;
- g) vinagre de arroz: tem sido feito pelos chineses há mais de 5.000 anos. São três os tipos de vinagre de arroz: vermelho (usado como um mergulho para alimentos e como um condimento em sopas), branco (usado principalmente em pratos doces e salgados) e preto (em frituras e molhos comuns);
- h) vinagre de cereja: envelhecido sob o calor em barris de madeira e tem um sabor de noz-doce;
- i) vinagre pode ser feito a partir de vinho branco, tinto ou rosado. Esses vinagres são os melhores molhos para salada;
- j) o vinagre de cidra é feito a partir de maçãs e é o vinagre mais popular usado para cozinhar nos Estados Unidos.

O vinagre de maçã é composto principalmente de ácido maleico, mas apresenta muitos minerais como potássio, fósforo, cloro, sódio, magnésio,

cálcio, enxofre, ferro, flúor e silício. Ainda contém outros elementos, como enzimas e aminoácidos, que são capazes de atacar os radicais livres que interferem na imunidade do corpo humano. O ácido málico pode fortalecer a resistência do organismo, pois representa um dos ácidos do ciclo de Krebs, que constitui um conjunto de reações responsáveis pela produção de energia no interior das células (ESTRELA et al., 2005; THACKER, 2000).

Um estudo realizado no Japão, Abe et al. (2007) estudaram os componentes bioativos de um tradicional vinagre japonês - Okezukuri Ringosu, produzido com maçãs esmagadas. Os pesquisadores descobriram e caracterizaram uma molécula com atividade antitumoral, que foi encontrada somente após o processo de fermentação acética ocorrido em fermentados alcoólicos de maçã.

Shishebor et al. (2008) estudaram a redução do perfil lipídico em ratos. Nos ratos normais houve redução significativa dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumento significativo de lipoproteína de alta densidade (HDL). O vinagre de maçã também reduziu o nível sérico de triglicérides e aumentou o HDL em ratos diabéticos, sugerindo que o produto pode ser usado no controle de complicações causadas pelo diabetes.

O uso do vinagre de maçã como auxiliar no tratamento do diabetes em humanos, no entanto, é controverso. Hlebowicz et al. (2007) demonstraram que o vinagre afetou pacientes com diabetes *mellitus* insulino-dependentes com gastroparesia diabética. Os indivíduos que consumiram 200 mL de água com 30 mL de vinagre por dia antes de um pequeno almoço tiveram suas taxas de esvaziamento gástrico reduzidas ainda mais, o que pode ser uma desvantagem em relação ao seu controle glicêmico.

## 2.2.2 Métodos de produção de vinagre

Existem três diferentes processos de produção do vinagre, são eles: 1) Método de tonel aberto (Orleans); 2) Método de gotejamento (vinagre rápido) e; 3) Método de borbulhamento (fermentação submersa).

### 2.2.2.1 Método do tonel aberto (Orleans)

O método do tonel aberto (lento, Orleans ou fermentação em superfície), representado na figura 1, é o mais antigo dentre os processos. Nesse processo, as BAA crescem abundantemente, em contato com o oxigênio, formando uma camada de células na superfície do mosto fermentado (contendo etanol) e promovem a acetificação. O etanol formado na fermentação alcoólica é metabolizado por BAA, formando o ácido acético, originando o vinagre.

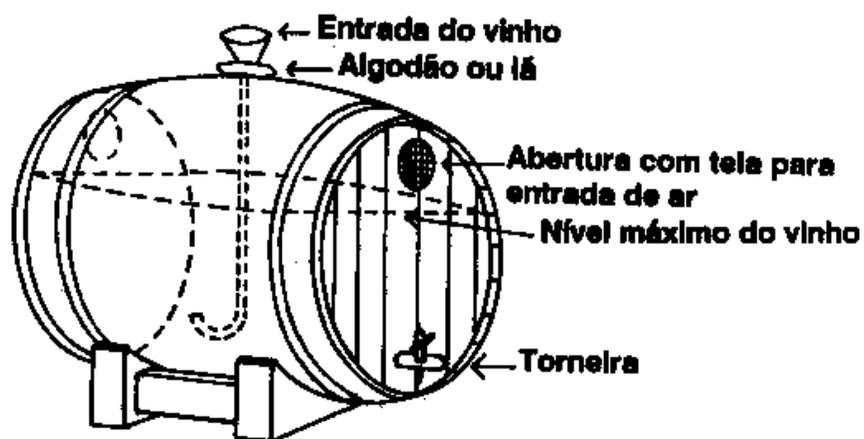


Figura 1 Recipiente utilizado para elaboração de vinagre pelo processo Orleans

Fonte: Aquarone, Lima e Borzani (1983).

#### **2.2.2.2 Método do gotejamento (vinagre rápido)**

O método do gotejamento (rápido ou alemão), também chamado de *Schützenback* ou *Boerhave* (Figura 2), surgiu na Alemanha, no início do século XIX. Em meados do século XX, tornou-se o principal processo para a produção industrial de vinagre (MORETTO et al., 1988, SPINOSA, 1996). Nesse processo, as BAA estão aderidas a um material sólido (carvão, madeira) dentro de um tanque (gerador de vinagre ou vinagreira) no qual se adiciona o vinho a ser acetificado. Esse processo é muito eficiente por estabelecer um contato das bactérias tanto com o ar, como com o substrato (MADIGAN et al., 2010).

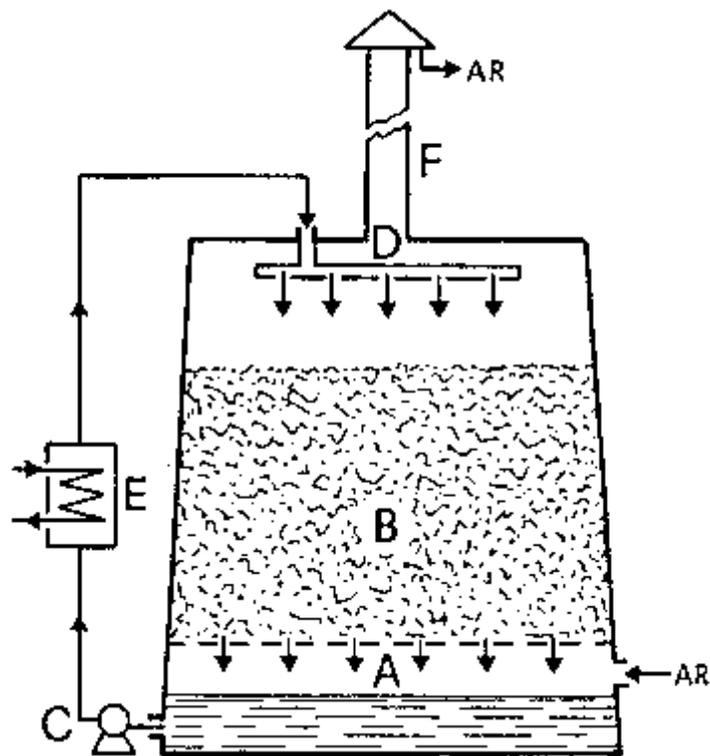


Figura 2 Corte transversal de um acetificador com suporte poroso; A) grade; B) maravalha de madeira; C) bomba para movimentação do vinho em processo de acetificação; D) dispersor do vinho; E) refrigerante de água; F) dispositivo de condensação de vapores

Fonte: Aquarone, Lima e Borzani (1983).

### 2.2.2.3 Método do borbulhamento (fermentação submersa)

No método do borbulhamento ou fermentação submersa (Figura 3), as culturas de BAA são inoculadas em fermentador em processo semicontínuo para a obtenção de vinagre mais rapidamente (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001). Posteriormente, o vinagre é filtrado, engarrafado e pasteurizado para comercialização.

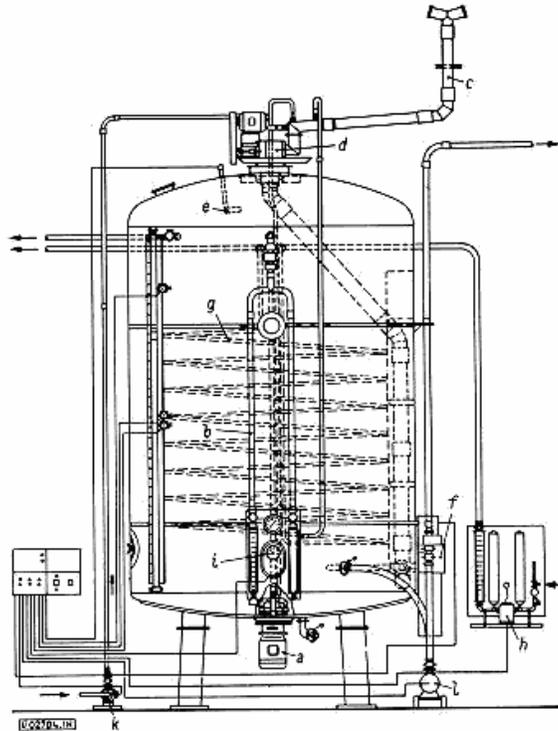


Figura 3 Corte transversal de um acetificador para elaboração de vinagre pelo método com fermentação acética submersa; a- turbina de ar; b- compensador de ar; c- dispositivo para coletar líquido de condensação; d-e- dispositivo para controlar a formação de espuma; f- dispositivo para medir o álcool; g- serpentina para refrigeração; h- dispositivo para refrigeração; i- termômetro; j- bomba para entrada do vinho; k- bomba para retirada do vinagre

Fonte: Mecca, Andreotti e Veronelli (1979).

### 2.3 Kefir

O kefir é um produto lácteo, considerado um probiótico, formado pela ação microbiana de uma associação de bactérias e leveduras, as quais são encapsuladas em uma matriz polissacarídica chamada “kefiran”, formando os grãos de kefir. Os grãos são compostos de água, lipídeos, proteínas, carboidratos

e minerais, possuem uma aparência semelhante à couve-flor, com forma irregular e coloração amarelada e esbranquiçada, como apresentado na figura 4 (BERGMANN; PEREIRA; VEIGA, 2010; MACHADO et al., 2012).



Figura 4 Grãos de kefir

Fonte: Magalhães et al. (2010b).

O cultivo do kefir pode ser feito em diferentes substratos como leite, açúcar mascavo e suco de frutas que resulta num aumento da biomassa de 5% a 7% por dia. O aumento dos grãos é decorrente do crescimento dos microrganismos e a biossíntese dos componentes, sendo sua estrutura considerada um biofilme (MACHADO et al., 2012; WANG et al., 2012).

A combinação de diferentes fatores pode influenciar o aumento da biomassa dos grãos de kefir, como a renovação dos substratos em intervalos regulares, temperatura de cultivo, lavagem dos grãos e a presença de nutrientes em concentrações essenciais no meio de crescimento (CHEN et al., 2009).

A cultura do kefir tem capacidade de produzir uma variedade de produtos de valor agregado, incluindo queijo, requeijão, bebidas alcoólicas à base de soro de leite, álcool potável e fermento (DIMITRELLOU et al., 2007). A fermentação resulta em numerosos componentes, incluindo o ácido láctico, o ácido acético, o CO<sub>2</sub>, o álcool e compostos aromáticos que fornecem

características sensoriais: gasosas, gosto ácido, sabor azedo e refrescante (MAGALHÃES et al., 2011a).

Os grãos de kefir conferem à bebida inoculada características benéficas à saúde humana, pois bactérias presentes nos grãos ou a presença de produtos do metabolismo das mesmas (bactérias do ácido lático) estão associadas a características probióticas (LATORRE-GARCÍA; POLAINA, 2006; LEBLANC et al., 2006). Outra propriedade importante destacada para o kefir é sua atividade antimicrobiana para microrganismos patogênicos (SILVA et al., 2009).

Os microrganismos presentes em relações simbióticas no kefir, são leveduras (*Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis* e *Saccharomyces* sp.), lactobacilos, (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbruecki*), estreptococos (*Streptococcus salivarius*), lactococos (*Lactococcus lactis* ssp. *thermophilus*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, etc) e, ocasionalmente, as bactérias do ácido acético (CHEN et al., 2009; JIANZHONG et al., 2009; HSIEH et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2012; MIGUEL et al., 2010; SIMOVA et al., 2002).

Na tabela 4, estão apresentados os microrganismos já encontrados no kefir, sua localidade e os autores que os encontraram em seu trabalho.

Tabela 4 Microbiota pertencente ao kefir cultivado em leite, em diferentes locais

Microorganismos	Localidade	Referências
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i>	Portugal	Pintado et al. (1996)
<i>Lactobacillus kéfir</i> , <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus parakefir</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Argentina	Garrote et al. (2001)
<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Turquia	Yüksekdağ, Beyatli e Aslim (2004)
<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbruekii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Espanha	Santos et al. (2003)
<i>Lactobacillus viridescens</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Candida holmii</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i>	Espanha	Ângulo, Lopez e Lema (1993)
<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>delbruekii</i> , <i>Leuconostoc lactis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Zygosaccharomyces</i> sp., <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	África do Sul	Witthuhn, Schoeman e Britz (2004b)
<i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>delbruekii</i> , <i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>lactis</i> 1, <i>Candida krusei</i> , <i>Candida kefir</i>	África do Sul	Witthuhn, Schoeman e Britz (2004a)
<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Rússia	Plessas et al. (2007)
<i>Lactococcus</i> sp., <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Espanha	Fontán et al. (2006)

“Tabela 4, conclusão”

Microrganismos	Localidade	Referências
<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus parabuchneri</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Acetobacter lovaniensis</i> , <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kazachstania aerobia</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e <i>Lachancea meyersii</i>	Brasil	Magalhães et al. (2010a)
<i>Gluconobacter japonicas</i> , <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus uvarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus satsumensis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>	Brasil	Miguel et al. (2010)

Atualmente, vários métodos podem ser utilizados na classificação taxonômica e na identificação de espécies microbianas, por exemplo, o procedimento conhecido como MALDI-TOF MS. Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma técnica físico-química robusta para a análise de moléculas orgânicas e tem sido utilizada como uma abordagem fenotípica para a identificação rápida de microrganismos (SANTOS et al., 2010). Essa técnica, analisa as células intactas, onde o espectro gerado é interpretado como um fingerprint celular. Essa abordagem é designada por MALDI-TOF IC (Intact Cell) MS. Essa técnica tem dado grande contribuição para o conhecimento científico sobre a identificação de microrganismos e já tem sido utilizada como ferramenta eficaz para testes rápidos de análises clínicas, alimentar e ambiental (LIMA et al., 2008; PEREIRA et al., 2010).

A utilização de MALDI-TOF é considerada revolucionária na identificação de microrganismos e tem apresentado grande aplicação, sendo

amplamente utilizada na Europa e nos Estados Unidos. Essa metodologia apresenta inúmeras vantagens, como o baixo custo, demanda quantidades muito pequenas de material biológico e pode ser aplicada em larga escala (CHERKAOUI; HIBBS; EMONET, 2010; SENG; DRANCOURT; GOURIET, 2009).

### 2.3.1 Bioquímica do kefir

Além da composição microbiológica, o kefir possui uma matriz gelatinosa com teores aproximados de 13% de proteínas e 24% de polissacarídeos e lipídeos (RIMADA; ABRAHAM, 2006). O principal polissacarídeo do kefir é o kefiran, um exopolissacarídeo que contém quantidades aproximadamente iguais de glicose e galactose (CHEIRSILP; SHIMIZU; SHIOYA, 2002; RIMADA; ABRAHAM, 2006).

Descoberto no final da década de 1960, o kefiran assemelha-se a polissacarídeos de glico-galactano, servindo ao kefir como uma matriz de sustentação entre seus diversos componentes (RIMADA; ABRAHAM, 2006). Foi desenvolvido um método para a obtenção de kefiran em laboratório, obtendo o teor de 2 g do polissacarídeo por litro da bebida fermentada, a partir da atividade bacteriana presente nos grãos (MICHELI et al., 1999).

Sobre essas investigações sobre os produtores de kefiran há controvérsias, entretanto, Kooiman (1968) reportou que o *Lactobacillus brevis*, atualmente conhecido como *Lactobacillus kefir*, é responsável pela produção de kefiran. Porém, de acordo com Tada et al. (2007), o produtor do kefiran nos grãos de kefir é o *Lactobacillus kefiranofaciens*.

A composição química do kefir de leite pode ser variável. Isso depende de fatores, tais como: o conteúdo de gordura do leite ou a concentração de carboidratos no substrato, a composição microbiológica ou o processo

tecnológico de produção (OTLES; CAGINDI, 2003). Os principais produtos formados durante a fermentação são ácido láctico, CO<sub>2</sub> e álcool. A composição química da bebida kefir, dada por componente/100 g, é apresentada na tabela 5.

Tabela 5 A composição química do kefir de leite

Composição química do kefir	Valor/100g
Energia	65 kcal
Gordura	3,5 g
Proteína	3,3 g
Lactose	4,0 g
Água	87,5 g
Cálcio	0,12 g
Fósforo	0,10 g
Magnésio	12,0 g
Potássio	0,15 g
Sódio	0,05 g
Ácido láctico	1,0 g
Colesterol	13,0 mg
Manganês	5,0 µg
Triptofano	0,05 g
Leucina	0,34 g
Vitamina A	0,06 mg
Vitamina B	0,04 mg
Vitamina B2	0,17 mg
Vitamina B6 e B12	0,05 mg
Vitamina C	1 mg
Vitamina D e E	0,11 mg

Fonte: Otles e Cagindi (2003).

Os numerosos benefícios das vitaminas B são regulação dos rins, do fígado e do sistema nervoso, além de aumentar a energia e a longevidade do corpo. Triptofano é um dos aminoácidos essenciais no kefir que promovem um efeito relaxante no sistema nervoso. Cálcio e magnésio são abundantes no kefir, os quais são importantes minerais para a saúde do sistema nervoso. Kefir é também uma boa fonte de fósforo, sendo o segundo mineral mais abundante em nossos corpos e ajuda na utilização de carboidratos, gorduras e proteínas para crescimento, manutenção e energia das células (OTLES; CAGINDI, 2003).

A lactose é um dissacarídeo parcialmente consumido pelos microrganismos presentes na bebida kefir. Esses microrganismos são bactérias lácticas e algumas leveduras. Como produto principal do metabolismo da lactose, pontua-se o ácido láctico (MAGALHÃES et al., 2010a, 2010b). A gordura presente na bebida fermentada é uma função direta da origem e do tipo do leite utilizado em sua produção, se de rebanho bovino ou caprino. A tipificação, como os baixos níveis de gordura (natural, em pó, desnatado e UHT), também possui função direta na gordura presente na bebida. A escolha da fonte láctica para a fermentação também resulta em propriedades organolépticas distintas para a bebida kefir (OTLES; CAGINDI, 2003).

Amostras de grãos de kefir que foram cultivados em leite a 4 °C, durante 21 dias, mostraram alterações no aroma das suspensões produzidas pelo metabolismo de ácidos voláteis, tais como ácido cítrico, pirúvico, láctico, úrico, acético, propiônico, butírico e hipúrico, em análise cromatográfica de alta eficiência (HPLC), e de etanol, acetaldeído e diacetila, em cromatografia gasosa (CG). Dos compostos testados, ácido láctico, cítrico, etanol e acetaldeído apresentaram aumento relevante no 21º dia de cultivo, ao passo que acetoína decaiu em, aproximadamente, 30%. Outros ácidos orgânicos encontrados na bebida foram ácido fórmico, isobutírico, capróico, caprílico e láurico (GUZEL-SEYDIM et al., 2000).

Dióxido de carbono, produzido por algumas bactérias lácticas heterofermentativas e por leveduras, é responsável pela gaseificação típica observada na bebida. Vitaminas do complexo B, como B1, B12, biotina, niacina (B3) e pirodoxina (B6), além de ácido fólico, vitaminas K, cálcio, manganês e aminoácidos, também constituem parte da suspensão probiótica do kefir (GUZEL-SEYDIM et al., 2000).

O etanol, juntamente com o CO<sub>2</sub> e os compostos aromáticos, é o ingrediente marcante na bebida kefir. Seu teor varia em função do período e da temperatura de fermentação permitida, bem como das condições de produção, se predominantemente aeróbica ou anaeróbica. Não obstante, também pode ocorrer variação na concentração de etanol, dependendo de as amostras serem constituídas por grãos de kefir propriamente ditos, ou amostras liofilizadas, uma apresentação comercial bastante utilizada (HALLÉ et al., 1994).

Existem diferentes faixas de teores alcoólicos encontrados na literatura. Foram encontrados teores variáveis entre 0,03 a 1,8 g, a cada 100 g da bebida fermentada com os grãos de kefir no leite. O máximo conteúdo de álcool reportado na bebida kefir foi de 38 g por litro da bebida, o que equivale a um teor aproximado de 5% de etanol, semelhante ao encontrado na cerveja. Esse nível de etanol, porém, só foi alcançado após 7 a 10 dias de fermentação contínua da bebida. O teor alcoólico também varia com a temperatura de fermentação, podendo reduzir-se a quase um terço em 4 °C, quando comparado a 30 °C (GUZEL-SEYDIM et al., 2000; HALLÉ et al., 1994).

### **2.3.2 Propriedades do kefir**

Um dos primeiros registros literários do emprego terapêutico de kefir data do princípio da década de 1970, quando o pesquisador russo Batinkov sugeriu o emprego da bebida probiótica para o tratamento de úlceras pépticas e

duodenais. A partir de então, passaram a surgir diversos trabalhos, em línguas eslavas, sobre a utilização do kefir no tratamento de doenças pancreáticas, pneumonia, bronquite e tuberculose, dentre outras (OTLES; CAGINDI, 2003).

Na atualidade, o kefir tem merecido indicações científicas nos mais variados enfoques, desde a nutrição e a dietoterapia, até mesmo o seu emprego com resultados significativos na oncologia comparada. Vários estudos investigaram os efeitos imunomodulatórios (VINDEROLA et al., 2004), anti-inflamatórios (LEE et al., 2007; RODRIGUES; CARVALHO; SCHNEEDORF, 2005), cicatrizantes (RODRIGUES et al., 2004), antialérgicos (LEE et al., 2007), antitumorais (CEVIKBAS et al., 1994; LEBLANC et al., 2006), antimicrobianos (RODRIGUES et al., 2004), antineoplásticos e pró-digestivos (SALOFF-COASTE, 1996) do kefir.

Os microrganismos presentes na bebida kefir processam o leite e tornam os nutrientes mais acessíveis ao organismo. O kefir possibilita que pessoas com problemas de má absorção da lactose consumam o leite, o qual é modificado e processado pelos microrganismos. O produto também é conhecido por afetar benéficamente o trato intestinal, sendo considerado uma mistura probiótica (OTLES; CAGINDI, 2003; URDANETA et al., 2007). Estudando o metabolismo de indivíduos intolerantes à lactose, foi observado a redução de 30% no teor de lactose, presente em kefir fermentado por 11 dias e foi recomendado o seu consumo por aqueles pacientes (ALM, 1982).

Além da melhoria no metabolismo de carboidratos, para os consumidores, o consumo da bebida kefir também está associado a um aumento na proteólise digestória (VASS; SZAKALY; SCHIMIDT, 1984).

Em estudo com ratos Wistar, foi verificado melhor digestibilidade de produtos à base de proteínas com dieta suplementada com iogurte e kefir com consequente aumento de massa corporal, por grama de proteína consumida pelos animais (VASS; SZAKALY; SCHIMIDT, 1984). Também foi encontrada

correlação direta entre a administração oral de kefir em pacientes com obesidade alimentar e o aumento da proteólise intragástrica (SINTSOVA, 1991). Também foi realizado um estudo com 20 fêmeas de ratos Wistar recebendo a alimentação suplementada com kefir. Os resultados mostraram que a dieta pode beneficiar a digestão de proteínas, em razão do aumento da atividade intestinal. Além disso, a dieta apresentou relação direta com a redução do índice glicêmico dos organismos examinados (URDANETA et al., 2007).

O primeiro estudo *in vitro* sobre as propriedades antimicrobianas de diferentes linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas do kefir foi realizado em 2003. Foi verificado que as melhores propriedades probióticas foram observadas em *Lactobacillus acidophilus* CYC 10051 e *Lactobacillus kefiranofaciens* CYC 10058 (SANTOS et al., 2003).

Efeitos imunomodulatórios também estão associados ao consumo de kefir. Foi determinado em estudos capacidade imunomodulatória de kefir da resposta imune na mucosa intestinal de ratos e para averiguar a importância da dosagem e viabilidade celular nessa resposta (VINDEROLA et al., 2004). Também foi observado que kefir possui várias substâncias, não especificadas, que podem exercer efeitos benéficos no sistema imune e prevenir certos tipos de câncer. Os autores citam como exemplo a resposta imune em tumores localizados em glândulas mamárias (LEBLANC et al., 2006).

Foi demonstrado, *in vivo*, efeitos anti-inflamatórios e antialérgicos em ratos asmáticos. E a atividade cicatrizante de kefir foi verificada usando-se uma pomada à base de kefir, em ratos albinos com ferida dorsal infectada por *Staphylococcus aureus* (LEE et al., 2007). A cicatrização foi mais bem observada nos animais tratados com a formulação com kefir (70%), em relação ao grupo controle, tratado com pomada comercial à base de neomicina-clostebol (RODRIGUES et al., 2004).

## 2.4 Laser Biospeckle

O fenômeno do BioSpeckle laser tem sido utilizado, associado a um aparato ótico, como uma ferramenta que se aplica ao monitoramento de atividade biológica, o que permite uma série de aplicações (RABAL; BRAGA, 2008; ZDUNEK et al., 2014). O *BioSpeckle laser* ou *Speckle laser* dinâmico é o resultado da iluminação de materiais biológicos com a luz coerente de um laser, o que forma uma figura de interferência que lembra um líquido em ebulição (BATISTA; RABELO; SANTOS, 2003).

Segundo Braga et al. (2001), o Speckle Dinâmico caracteriza-se como o resultado da iluminação de um objeto pela luz laser, sendo que o termo dinâmico, expressa o nível de mudança da figura de interferência (Speckle) formada pela iluminação, ao longo do tempo. Na figura 5, mostra-se o esquema básico do aparato experimental que foi utilizado. Na figura 5, a montagem apresenta-se na configuração conhecida como “*backward scattering*”, abordagem que tem sido utilizada quando a amostra a ser iluminada não apresenta transparência suficiente.

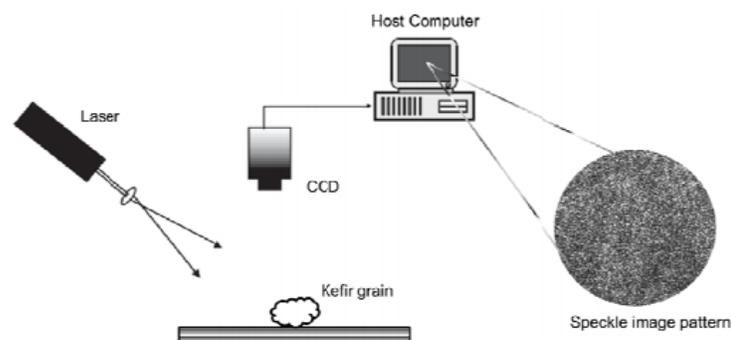


Figure 1. Experimental setup used to illuminate the kefir grain sample.

Figura 5 Esquema experimental do aparelho BioSpeckle

Fonte: (GUEDES et al., 2014).

A metodologia adotada, utilizando o BioSpeckle, pode ser uma nova alternativa de avaliação da atividade metabólica dos grãos de kefir em diferentes processos fermentativos.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi conduzido nos laboratórios de Microbiologia das fermentações (Departamento de Biologia - Setor Microbiologia), fisiologia dos microrganismos (Departamento de Biologia – Setor Microbiologia), Planta Piloto de processamento de produtos vegetais (Departamento de Ciência dos Alimentos), CEDIA (Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária – Departamento de Engenharia).

#### **3.1 Aquisição das frutas**

As maçãs utilizadas no presente trabalho foram adquiridas no comércio local, Lavras, Minas Gerais, Brasil.

#### **3.2 Preparo e caracterização do suco**

Os frutos mais maduros foram selecionados e, após a seleção, foram lavados em água clorada a 5 ppm (para eliminação de possíveis microrganismos existentes) e enxaguados em água corrente. Os frutos foram processados em despoldadeira da marca MACANUDA equipada com peneira de 6 mm, pertencente ao Departamento de Ciências dos Alimentos, para a obtenção do suco de maçã.

A produção da bebida fermentada foi feita a partir de 50 kg de maçãs Fuji (frutos maduros). A fermentação foi realizada por microrganismos presentes nos grãos de kefir que foram utilizados como culturas iniciadoras para a fermentação do suco obtido das maçãs.

Amostra do suco “*in natura*” foi retirada para a caracterização de sólidos solúveis (ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES - AOAC,

2001), açúcares totais (YEMM; WILLIS, 1954) açúcares redutores e pH (AOAC, 2001).

### **3.3 Inóculo**

Foram utilizados os grãos de kefir pertencentes ao laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, Minas Gerais.

### **3.4 Elaboração do vinagre**

O vinagre foi elaborado a partir de fermentação alcoólica, seguida por fermentação acética (acetificação).

#### **3.4.1 Preparo do mosto para fermentação alcoólica**

A polpa obtida após a despolpagem foi coada em coador de pano, para se obter o suco. Foi analisado o °Brix, e o suco foi dividido em três Erlenmeyers de 500 mL para iniciar a fermentação por batelada simples.

#### **3.4.2 Fermentação alcoólica**

O mosto foi inoculado com grãos de kefir na proporção de 10% m/v. Todas as fermentações foram realizadas em triplicata.

Os frascos foram incubados estaticamente à temperatura de 28 °C (estufa tipo BOD) e o processo fermentativo foi acompanhado diariamente até se observar o encerramento da fermentação (que foi considerado quando da estabilização do consumo de açúcares - Brix).

Ao final da fermentação as bebidas foram filtradas sob vácuo em frasco tipo Kitassato, de 4 litros de volume, ao qual é acoplado um funil tipo Büchner, utilizando filtro de celulose (DIAS et al., 2007).

Durante a fermentação, foram realizados, análise microbiológica dos grãos e bebidas, medição do °Brix, e análises de açúcares redutores totais e pH (DIAS et al., 2007).

#### **3.4.2.1 Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica**

Para a determinação do desempenho de fermentação, foram calculados os fatores de conversão de substrato em etanol ( $Y_{p/s}$ ), conversão de substrato em glicerol ( $Y_{g/s}$ ), conversão de substrato em ácido acético ( $Y_{ac/s}$ ) e a produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ ), produtividade de biomassa ( $P_x$ ) e eficiência de conversão ( $E_f$ ). Para cálculo dos parâmetros cinéticos, a concentração total de açúcares foi calculada, considerando-se a conversão de cada mol de sacarose (342 g) em 1 mol de glicose (180 g) e 1 mol de frutose (180).

#### **3.4.3 Acetificação (fermentação acética)**

Os “vinhos” de maçã obtidos no item anterior foram acetificados em Erlenmeyers, e foram controlados à temperatura de 28 °C e agitação de 150 rpm.

A fermentação acética foi conduzida, empregando os seguintes tratamentos:

- a) grãos de kefir a 10% (m/v);
- b) grãos de kefir a 20% (m/v).

Durante a fermentação acética, foram realizadas coletas diárias (6 dias) em triplicata, para análise de acidez (pHmetro) e teor alcoólico (alcoômetro). O volume de trabalho foi de 250 mL.

A fermentação acética foi encerrada no sexto dia, quando o vinagre apresentou teor alcoólico abaixo de 1,0% de etanol (v/v) (BRASIL, 1999).

#### **3.4.3.1 Cálculo do rendimento e produtividade da fermentação acética**

O rendimento foi calculado de duas maneiras:

- a) produção observada de ácido acético em relação ao rendimento teórico. O rendimento teórico foi calculado a partir da reação de conversão do etanol a ácido acético, onde 1,0g de etanol rende 1,304g de ácido acético (PALMA; CARVALHO; GAVÓGLIO, 2001);
- b) concentração total (CT) ou GK (*Gesammte Konzentration*) será calculada pela eficiência da fermentação expressa pela soma da concentração de etanol (% v/v) e ácido acético (% m/v) no início e final da fermentação (EBNER, 1982). Essa relação foi aplicada para calcular a eficiência com a qual o etanol é convertido a ácido acético:  $\text{Rendimento GK} = (\text{GK final} / \text{GK inicial}) \times 100$ . A produtividade foi calculada pela quantidade produzida de ácido acético em relação ao volume e tempo (g/L.h).

#### **3.4.4 Análises cromatográficas**

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso (CG) e cromatógrafo líquido (HPLC), pertencentes ao Laboratório de Fisiologia

e genética de Microrganismos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras. As análises a seguir foram realizadas em triplicata tanto no vinho de fruta, ao final da fermentação alcoólica quanto no vinagre.

Avaliou-se, por cromatografia gasosa, a presença de metanol, quantificação de alcoóis superiores (1-propanol, Isobutanol, 1-Butanol, isoamílico, amílico, hexanol, 1-decanol, 1- heptanol), ésteres (etil acetato, Isoamil acetato, Dietil succinato, Etil isobutirato, Etil hexanoato), aldeídos e cetonas nas amostras das bebidas, de acordo com a metodologia de Duarte et al. (2010). A análise foi realizada utilizando um cromatógrafo em fase gasosa (CG) modelo Shimadzu 17A, equipado com um detector de ionização de chama (DIC) e utilizando uma coluna capilar de sílica DB Wax (30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 µm) (J&W Scientific, Folsom, Calif., U.S.A.). As condições de operação foram as seguintes: temperatura do forno foi mantida a 50 °C durante 5 min, aumentou para 190 °C por incrementos de 3 °C. min<sup>-1</sup> e depois mantida a 190 °C durante 10 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidos a 240 °C, e o gás de arraste (N<sub>2</sub>) foi mantida a uma taxa de fluxo de 1,2 mL/min<sup>-1</sup>. Injeções de 1 mL foram feitas no modo split (1:10). A identificação de compostos voláteis foi feita por comparação dos tempos de retenção das amostras com os dos compostos padrão injetados nas mesmas condições acima mencionadas. A quantificação dos compostos voláteis foi expressa como 4-nonanol (125 mg/L) padrão interno.

Álcoois (etanol e glicerol), carboidratos (sacarose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos (acético, lático, málico, succínico, cítrico e tartárico) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se metodologia modificada a partir de Schwan et al. (2001). Utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu, modelo LC-10Ai (Shimadzu Corp., Japão), equipado com detectores de índice de refração, modelo RID-10A, e de ultravioleta, modelo SPD-10Ai. A coluna utilizada será o modelo Shimpack

SCR-101H (Shimadzu). Carboidratos e alcoóis serão detectados pelo detector de índice de refração e a coluna à temperatura de 30 °C. A determinação dos ácidos orgânicos foi realizada pelo detector de ultravioleta, com comprimento de onda selecionado em 210 nm e a coluna foi operada à temperatura de 50 °C. A fase móvel será o ácido perclórico na concentração 100 mM a um fluxo de 0,8 mL/min para carboidratos e álcoois e 1,0 mL/min para ácidos orgânicos. A quantificação foi realizada a partir da comparação com curvas de calibração, determinadas, utilizando-se padrões certificados da marca Supelco.

### **3.4.5 Análises microbiológicas**

As análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de Microbiologia das Fermentações, no setor de Microbiologia.

#### **3.4.5.1 Análise microbiológica por métodos dependentes de cultivo**

Para o isolamento dos microrganismos presentes nos grãos de kefir (inóculo), foram utilizados 10 g de grãos de kefir que foram adicionados a um frasco contendo 90 mL de solução peptonada 0,1% e homogeneizado em *Stomacher* por 5 minutos, a velocidade 3. Para a determinação da contagem total microbiana foi utilizada uma alíquota de 100 µL de cada diluição em triplicata que, em seguida, foi espalhada com Alça de Drigalsky, utilizando-se a técnica de plaqueamento por superfície. Para o isolamento e contagem de bactérias e leveduras, foram utilizados os meios de cultivo YEPG – Yeast extract peptone glucose, (1% de peptona, 1,3% de ágar e 2% de glicose) com pH 3,5 acrescido de cloranfenicol 0,2%, MRS – Man Rogosa and Sharpe (Meio da marca Merck) com pH 6,0 e acrescido de ciclohexamida 0,1%, e GYC – Glucose Yeast CaCO<sub>3</sub>, acrescido de ciclohexamida 0,1%. Os isolados foram purificados por meio de

sucessivas repicagens e, posteriormente, transferidos para criotubos contendo meios de cultivo acrescidos de glicerol para uma concentração final de 20% e conservados em freezer.

Um total de 357 isolados foi identificado usando o sistema Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Microflex-Bruker Daltonics/BioTyper™).

A cepa *Escherichia coli* K12 foi utilizada como padrão para a calibração externa do MALDI-TOF MS seguindo metodologia descrita por Lima-Neto et al. (2014). As células foram cultivadas em meio ágar Luria-Bertani (LB) e incubadas a 35 °C por 18 h.

#### **3.4.5.2 Agrupamento dos isolados através de suas características morfológicas e bioquímicas**

Todas as colônias foram classificadas de acordo com as características macroscópicas e microscópicas. Os isolados bacterianos foram caracterizados morfológicamente e agrupados, por meio de testes de coloração de Gram, reação de catalase, teste de motilidade, esporulação e oxidase (HOLT et al., 1994).

Os isolados leveduriformes foram caracterizados por determinação da sua morfologia e esporo sexual, observados por lâminas a fresco preparadas com azul de metileno.

#### **3.4.5.3 Análise proteica das células bacterianas**

Uma colônia de bactéria crescida em até 18 h foi transferida para um eppendorf, contendo 6 mL da solução orgânica (água/acetoneitrila/ácido trifluoroacético [50:47.5:2.5]) e homogeneizada em vórtex por 1 min. Em seguida, 0,5 mL dessa suspensão foi transferida para a placa aço inox do

MALDI., e adicionado 1 mL da solução matriz de MALDI (75 mg/mL de ácido 2,5-di-hidroxibenzoico em etanol/água/acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético ). Essa mistura foi seca ao ar à temperatura ambiente e a análise foi realizada em um sistema Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), em triplicata para avaliar a qualidade e reprodutibilidade dos espectros. Por fim, os espectros no intervalo de massa  $m/z = 2000$  a 20000 foram obtidos e analisados no software Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics) (LIMA-NETO et al., 2014).

#### **3.4.5.4 Análise proteica das células leveduriformes**

Uma colônia de levedura crescida em até 18 h foi transferida para um eppendorf, contendo 6 mL da ácido fórmico/acetonitrila (25:75) e homogeneizada em vórtex por 1 min. Os procedimentos seguintes foram os mesmos mencionados anteriormente para a análise de células bacterianas. Após a aquisição dos resultados, os espectrogramas foram agrupados, estatisticamente, por meio do coeficiente de correlação de Pearson e do algoritmo UPGMA (PARKOUDA et al., 2010).

#### **3.4.5.5 Extração de DNA e PCR (polymerase chain reaction)**

Os microrganismos isolados identificados por MALDI-TOF como *Acetobacter* sp. foram enviados para sequenciamento, para a identificação da espécie. As células bacterianas crescidas por 18 horas, foram ressuspendidas em 1 mL de água deionizada estéril e centrifugada por 1 minuto a 10000 rpm, o sobrenadante foi removido. Ao pellet foram adicionados 100  $\mu$ L de matriz Instagene e incubado a 56 °C por 30 minutos. Após a incubação em banho-maria, o tubo foi vortezado durante 10 segundos, e incubado em banho de

água fervente (100 °C) por 8 minutos. A amostra fervida foi vortequizada novamente por 10 segundos e centrifugada por 3 minutos a uma velocidade 10000 rpm. Utilizaram-se 2,5 µL do sobrenadante resultante para 50 µL de reação de PCR, o restante do sobrenadante foi armazenado a -20 °C.

Para análise de procariotos, a região V6-V8 do gene 16S rRNA foi amplificada com os iniciadores 27F/1512r. O DNA foi visualizado por coloração com SYBR - Green (Molecular Probes), utilizando luz ultravioleta. Como padrão de tamanho e quantidade de DNA, foi utilizado o marcador *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

#### **3.4.6 Tratamento do vinagre**

Os vinagres resultantes do processo foram filtrados em terra de diatomáceas, engarrafados e pasteurizados a 65 °C/20 minutos (DIAS et al., 2007).

#### **3.4.7 Análises físicas e químicas no vinagre**

Foram realizadas as análises abaixo discriminadas, seguindo o “manual operacional de bebidas e vinagres”, conforme Instrução Normativa nº 24 (BRASIL, 2005).

- a) exame organoléptico;
- b) grau alcoólico real;
- c) acidez volátil;
- d) açúcares totais.

### 3.5 Análise sensorial

A avaliação sensorial dos vinagres foi aprovada pelo comitê de ética (ANEXO A) e realizada por 50 provadores não treinados da Universidade Federal de Lavras. Para a avaliação dos atributos aspecto, cor e odor, as amostras foram distribuídas em tubos de ensaio com tampa rosqueável, cada um contendo 10 mL. Para a avaliação do sabor, as amostras foram provadas puras. Foi utilizada Escala Hedônica de valores, cuja pontuação variou de 01 (não gostaram) a 09 (gostaram extremamente), como apresentado no quadro 1.

<p>Ficha de Avaliação sensorial</p> <p>Sexo ( ) Feminino ( ) Masculino</p> <p>Faixa etária: ( ) 18 a 30 anos; ( ) 31 a 45 anos; ( ) 45 a 60 anos; ( ) mais que 60 anos</p> <p>Frequência de consumo de vinagre: ( ) 1 vez ao mês; ( ) 2 vezes ao mês; ( ) 1 vez por semana; ( ) 2 vezes por semana; ( ) todos os dias</p> <p>Avalie a amostra e indique, utilizando a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou da aparência, sabor, aroma e impressão global.</p> <p>9 – Gostei extremamente        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</p> <p>Amostra ____</p> <p>Aparência ____ Viscoso ( ) Límpido ( ) Translúcido ( )</p> <p>Sabor ____ Azedo ( ) Adstringente ( ) Amargo ( )</p> <p>Aroma ____ Ácido acético ( ) Outros ( ) Qual? _____</p> <p>Impressão Global ____</p> <p>Comentários: _____</p>
---

Quadro 1 Ficha de avaliação sensorial com escala hedônica e CATA

Além da escala hedônica, foi feita também a análise CATA - *check-all-that-apply* (Quadro 1), onde para cada aspecto analisado (aspecto, cor e odor) foi

atribuída uma nota/valor. Os vinagres considerados aceitos em termos de suas propriedades sensoriais foram aqueles que alcançaram o índice de aceitabilidade mínimo de 70%, considerando-se 100% a pontuação máxima alcançada pelo produto, utilizando-se a mesma escala de valores (MORAES, 1993).

### 3.6 Análise das atividades metabólicas dos grãos de kefir por laser

#### BioSpeckle

Os grãos foram iluminados com HeNe laser, com comprimento de onda 632 nm, com 17 mV power, utilizando lente côncava cobrindo toda a amostra (GUEDES et al., 2014). Os padrões de interferência formados sobre eles foram capturados por uma câmera CCD 640 x 486 pixels, com uma velocidade de obturador de 1/60 s e taxa de aquisição entre as imagens de 0,08 s, criando uma coleção de 128 imagens. A análise das imagens, a partir da iluminação a laser foi realizada por monitorização da história temporal da configuração das imagens (THSP) (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999) e a sua saída numérica, os valores absolutos das diferenças (AVD), de acordo com a equação abaixo (Equação 2).

Equação 2 equação AVD

$$AVD = \sum_{ij} \frac{OCM \cdot |i - j|}{Normalization}$$

Onde o OCM é a matriz de ocorrência dos sucessivos valores na THSP, e as variáveis  $i$  e  $j$  são as dimensões da matriz OCM. A normalização fornece a relação entre os valores do AVD e o somatório de todas as ocorrências. Os grãos de kefir foram avaliados durante os processos fermentativos. Amostras dos grãos de kefir foram iluminados, com repetição de 5 grãos de kefir para cada dia de

fermentação. Cada conjunto de 128 imagens foi testado quanto à sua homogeneidade (BRAGA et al., 2012) e a área cortada foi processada pelo método AVD. Os dados foram obtidos coletando-se imagens, ao longo do tempo das amostras em atividade, e analisando-as por meio de técnicas estatísticas que apresentam resultados numéricos e gráficos. Os trabalhos de iluminação foram conduzidos no Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária da UFLA em laboratório equipado com sistema de iluminação, captura e análise de imagens.

### **3.7 Análises estatísticas**

ANAVA e teste de Scott-Knott foram realizados, utilizando-se o software SISVAR 5.1 (Lavras, Brasil). Parâmetros da cinética de fermentação alcoólica e acética foram calculados, empregando-se o software Origin Pro 8.0 (OriginLab, Northampton, MA, USA). A análise de componentes principais dos vinagres obtidos foi realizada com o software XLSTAT 7.5.2.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O suco de maçã utilizado para a produção do vinagre com inóculo de grãos de kefir foi analisado quanto ao pH e sólidos solúveis (°Brix). O pH do suco de maçã foi mensurado em 3,5 e o °Brix 13. O pH é um fator importante que pode afetar fortemente a qualidade de uma bebida (SHARMA et al., 2009).

Acompanhou-se, a cada 24 horas, o processo de fermentação do mosto de maçã inoculado com grãos de kefir com as seguintes análises: contagem padrão em placa (MRS, YEPG e GYC), sólidos solúveis (°Brix), açúcares redutores (glicose e frutose), pH, e etanol.

### **4.1 População microbiana durante a fermentação**

No meio YEPG, população dos microrganismos do kefir antes de ser inoculado foi de 7,51 log UFC/mL. No meio MRS, foi encontrada população de 7,83 log UFC/mL, Essa contagem em meio MRS foi semelhante à encontrada por Witthuhn et al. (2004) para lactobacilos em grãos de kefir de leite. A contagem em meio GYC apresentou população 6,78 log UFC/mL. Observou-se, de acordo com os dados apresentados neste trabalho, que a população de bactérias do ácido láctico, foi maior que leveduras e bactérias do ácido acético, respectivamente.

A população de microrganismos também foi analisada durante a fermentação alcoólica e as fermentações acéticas (10% de kefir – tratamento 1- e 20% de kefir – tratamento 2). Além da contagem em diferentes meios, foi realizada a caracterização morfológica, microscópica, testes bioquímicos (Tabela 9) e identificação por MALDI-TOF (Figuras 9A e 9B).

O morfotipo 1 (meio de cultivo MRS) caracterizou-se por suma colônia branca, pequena, circular, brilhante e convexa. O morfotipo 2 (meio MRS) foi

uma colônia um pouco maior que a descrita anteriormente, de cor branca, circular, brilhante. O morfotipo 3 (meio de cultivo GYC) foi semelhante ao morfotipo 2, e produziu um halo ao redor da colônia, o que caracterizou o consumo de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) pela produção do ácido acético. O morfotipo 4 (meio de cultivo YEPG) caracterizou-se como uma colônia branca, média, convexa, opaca e circular, tipicamente classificada como levedura. Além da caracterização macroscópica dos morfotipos, cada isolado foi analisado em relação às suas características microscópicas (Teste de Gram para bactérias, e lâmina à fresco com azul de metileno, para leveduras) e os isolados de bactérias foram caracterizados também por testes bioquímicos (teste de oxidase, catalase, motilidade e esporulação), que são mostrados na tabela 6.

Tabela 6 Caracterização bioquímica dos isolados

Morfotipos	Isolados	Tempos	Características microscópicas	Testes
1	1, 14, 15, 16, 121 a 124, 126, 261 a 264, 303, 468, 469.	T0 alcoólica, T1 alcoólica, T1 acética, T2 alcoólica, T4 alcoólica,	Gram +, bastonete médio	Catalase:- Oxidase:- Motilidade:- Esporulação:-
	4, 5, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 31 a 39, 42 a 48, 50, 53 a 56, 58 a 60, 65 a 77, 109 a 111, 114, 115, 118, 131, 136, 140 a 143, 147 a 156, 160 a 169, 176 a 178, 180 a 183, 223 a 228, 230, 235 a 238, 241 a 243, 266, 267, 271, 272, 281, 283, 284, 325, 334, 340, 366 a 377, 379, 390 a 397, 428, 430, 432 a 435, 457 a 466, 473 a 476, 479 a 490.	Todos os tempos		Catalase: -  Oxidase: -  Motilidade:-  Esporulação:-

“Tabela 6, conclusão”

Morfotipos	Isolados	Tempos	Características microscópicas	Testes
4	29, 40, 49, 61 a 63, 83, 87, 119, 120, 130, 194, 209, 216 a 219, 246, 251, 252, 331, 333, 336 a 339, 368 a 375, 377, 379, 406, 424 a 427.	T0 alcoólica, T1 alcoólica, T2 alcoólica, T3 alcoólica, T4 alcoólica, T1 acética, T2 acética, T3 acética.	Forma: ovóide. Reprodução: brotamento	NÃO
3	78 a 82, 84, 85, 89 a 93, 95 a 97, 98 a 108, 186 a 215, 295 a 304, 315 a 324, 398 a 412, 414 a 423.	Todos os tempos, principalmente na fermentação acética.	Gram: + e - Forma: bastonete médio	Catalase: + Oxidase: - Motilidade: + Esporulação:-

Durante a fermentação (tanto alcoólica, quanto acética), foram realizadas contagem nos mesmos meios descritos anteriormente (MRS, GYC e YEPG). Na figura 6, é apresentada a contagem, durante a fermentação alcoólica (A) e acética (B).

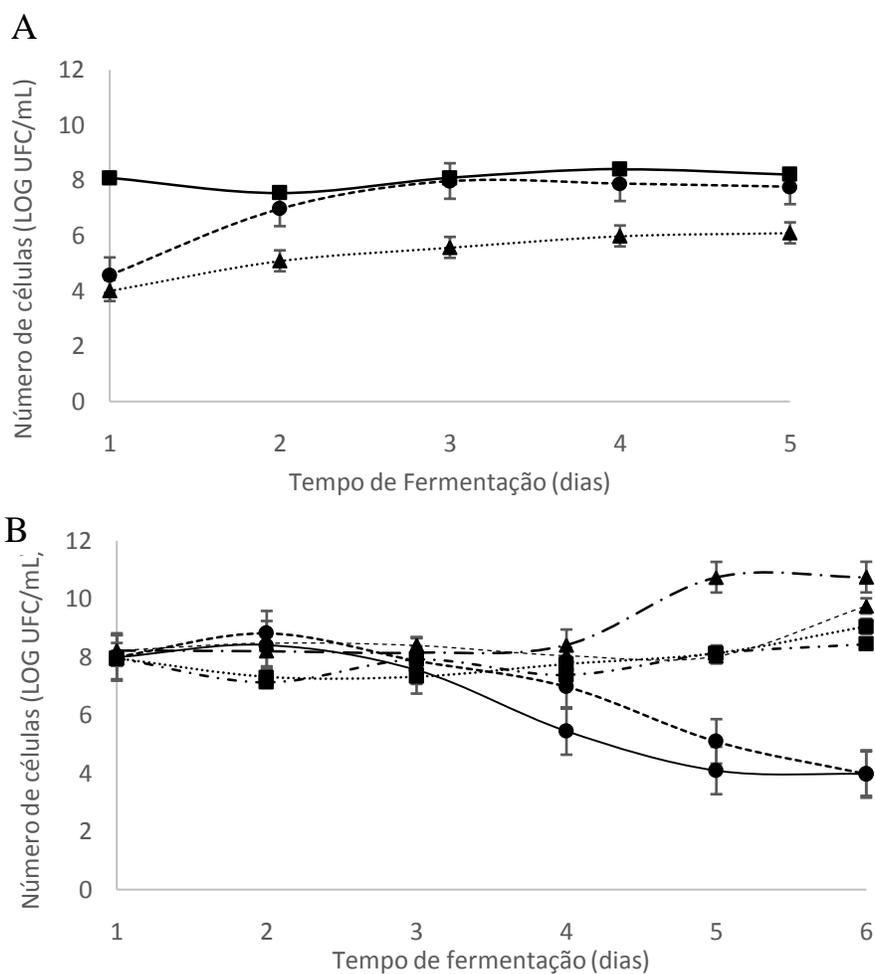


Figura 6 Número de células (LOG UFC/mL) durante a fermentação alcoólica (A) e acética (B): A) Isolados de MRS (—■—), YEPG (---●---), GYC (---▲---); B) MRS 10% (---▲---), GYC 10% (---■---), YEPG 10% (---●---), MRS 20% (---▲---), GYC 20% (---■---), YEPG 20% (---●---). As barras indicam desvio padrão de média

A contagem de BAL iniciou com população de 8,10 log UFC/mL (aproximadamente  $10^8$  células), ao segundo dia de fermentação, houve ligeiro decréscimo, onde a população alcançou 7,55 log UFC/mL ( $10^7$  células). A maior contagem populacional apresentada para BAL foi observada no quarto dia,

quando a população atingiu 8,45 log UFC/mL, chegando ao final do quinto dia com uma população de 8,22 log UFC/mL. De acordo com os dados apresentados, a população de BAL apresentou entre  $10^7$  e  $10^8$  células durante toda a fermentação alcoólica. A fermentação acética se dividiu em dois tratamentos, um conduzido com 10% de inóculo (tratamento (1)) e outra com 20% (tratamento (2)), apresentados na figura 8B. Ao início da fermentação acética, a população de BAL foi a mesma para os dois tratamentos, 8,22 log UFC/mL ( $10^8$  células), do segundo ao quinto dia, a população se manteve estável, com  $10^8$  células, e ao último dia de fermentação, o tratamento (1) apresentou população de BAL de 9,75 log UFC/mL, e o tratamento (2), 10,73 log UFC/mL. A população de leveduras, durante a fermentação alcoólica, iniciou-se com contagem 4,56 log UFC/mL, aumentando gradativamente até o terceiro dia, onde apresentou 7,97 log UFC/mL ( $10^7$  células), no quarto e quinto dia, a população diminuiu novamente (7,89 e 7,78 log UFC/mL, respectivamente). No tratamento (1) da fermentação acética, a população de leveduras aumentou em relação ao final da fermentação alcoólica, até o segundo dia, onde apresentou contagem 8,81 log UFC/mL, a partir do terceiro dia, a população começou a reduzir novamente até chegar ao final do sexto dia de fermentação com 3,98 log UFC/mL. No tratamento (2), não houve grandes diferenças em relação ao tratamento (1). No primeiro e segundo dia da fermentação, a população ainda apresentou crescimento, onde a contagem foi 8,00 e 8,42 log UFC/mL. A partir do terceiro dia, a população diminuiu gradativamente até atingir 4,09 log UFC/mL, ao final da fermentação. As bactérias do ácido acético (BAA), foram encontradas em ambas as fermentações. No início da fermentação alcoólica, a população foi baixa, atingindo 4,01 log UFC/mL, aumentando a partir do segundo dia (5,08 log UFC/mL), até o último dia de fermentação alcoólica, onde apresentou população de 6,09 log UFC/mL. Em ambos os tratamentos da fermentação acética (1 e 2), a população de BAA

aumentou até atingir  $10^9$  e  $10^8$  células, respectivamente. Em um processo fermentativo, bactérias do ácido láctico e leveduras são as primeiras a surgirem, utilizando carboidratos e ácido cítrico presentes no mosto fermentativo. As leveduras utilizam o substrato primeiro, seguidas de bactérias do ácido láctico, que além de utilizarem os açúcares, utilizam também o ácido cítrico. No presente estudo, a população de BAL foi maior durante toda a fermentação, sendo os microrganismos presentes em maior frequência nos grãos de kefir. BAA, degradaram carbonato de cálcio no meio GYC, formando um halo ao redor de sua colônia, essa característica foi utilizada na contagem em placas de GYC. As BAA geralmente aumentam seu crescimento na presença de etanol, que é produzido pelas leveduras. Essas bactérias utilizam esse etanol para produção do ácido acético. O crescimento dos microrganismos ocorre proporcional ao que é fornecido a cada microrganismo presente no mosto. As condições nutricionais, pH, acidez e temperatura são fatores que podem influenciar o processo fermentativo (LEBEAU; JOUENE; JUNTER, 1998).

Trabalhos anteriores mostraram que bactérias do ácido láctico são mais numerosas que bactérias do ácido acético e leveduras, embora as condições da fermentação possam afetar esse padrão (GARROTE et al., 2001; KOROLEVA, 1988). Em geral, a população microbiana presente no processo fermentativo, apresentou população variando de  $10^4$  a  $10^9$  células, durante toda a fermentação.

#### **4.2 Identificação dos isolados por MALDI-TOF e sequenciamento**

Um total de 358 microrganismos foram isolados, sendo que 31 foram leveduras, e 327 bactérias (divididas em lácticas e acéticas). Os isolados encontrados durante as fermentações alcoólica e acética foram agrupados por diferentes testes bioquímicos (Tabela 6) e as espécies foram identificadas pela técnica de MALDI-TOF MS (Figura 7).

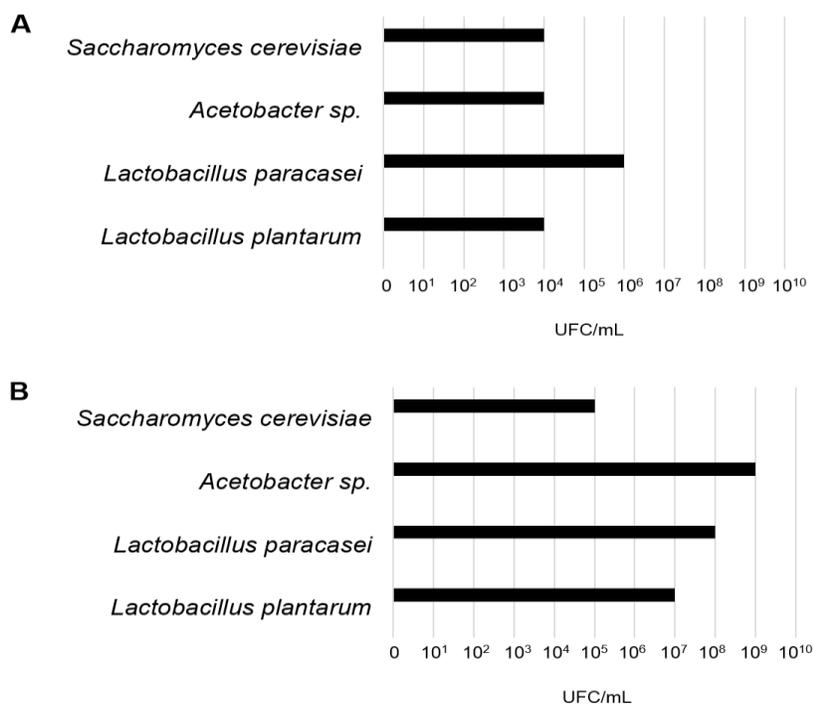


Figura 7 Identificação microbiana por MALDI-TOF do inóculo grãos de kefir presentes no processo fermentativo do vinagre. A) Início do processo fermentativo (0 h). B) Final do processo fermentativo (264 h)

De acordo com a figura 7A, o início da fermentação (0h) apresentou maior população de *Lactobacillus paracasei* ( $10^6$  UFC/mL). *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* e *Acetobacter sp.* foram encontrados em menor quantidade ao início da fermentação alcoólica, apresentando população de  $10^4$  UFC/mL. Esses microrganismos foram encontrados durante toda a fermentação alcoólica e acética (10% e 20% de kefir). Durante a fermentação, BAL e BAA foram aumentando sua população até o final das fermentações acéticas, como mostrado na figura 6, enquanto as leveduras aumentaram até o segundo dia das fermentações acéticas (Figura 6B), mas depois diminuíram até

retornar à população próxima a inicial ( $10^5$  UFC/mL). De acordo com a figura 7B, ao final das 264 horas de fermentação, a população de *Saccharomyces cerevisiae*, manteve-se igual à população inicial, de  $10^5$  UFC/mL. A população de *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* aumentaram, em relação ao tempo inicial, chegando a  $10^8$  UFC/mL e  $10^7$  UFC/mL, respectivamente. A população de *Acetobacter* sp. apresentou o maior aumento do início ao final da fermentação, em razão do ambiente propício ao seu crescimento, criado após a fermentação alcoólica, apresentando  $10^9$  UFC/mL ao final da fermentação acética.

Os microrganismos identificados por MALDI-TOF foram depositados na Coleção de Culturas da Microbiologia Agrícola da UFLA (CCMA). Estes foram codificados a partir do isolado CCMA 0489 ao isolado CCMA 0539, sequencialmente (ANEXO A)

Os microrganismos identificados por MALDI-TOF como *Acetobacter* sp., foram enviados para sequenciamento, e identificados como *Acetobacter pasteurianus*-CCMA 0540 (número de acesso AB680037.1) e *Acetobacter syzygii*-CCMA0541 (número de acesso JN411497.1) com 98% de similaridade a partir do BLAST (ANEXO A).

### **4.3 Características da fermentação alcoólica e acética**

Na figura 8, estão apresentados os valores de pH e açúcares solúveis (°Brix) durante a fermentação alcoólica.

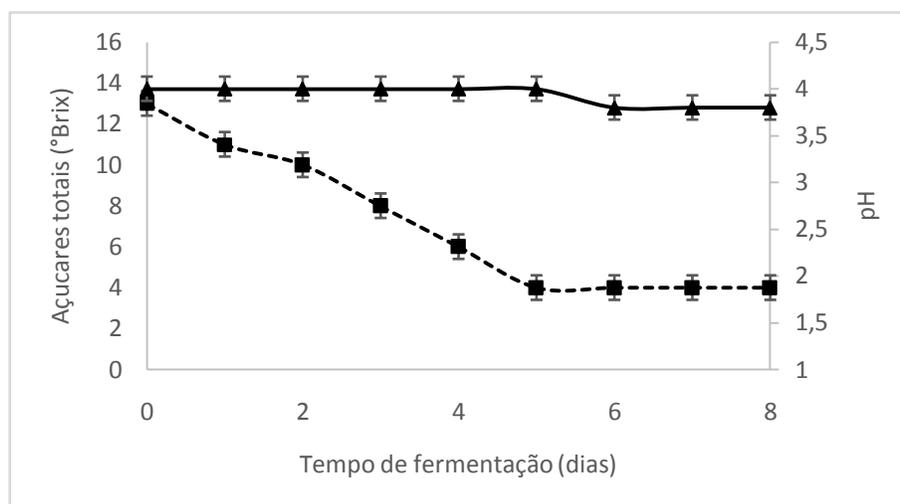


Figura 8 Valores de açúcares totais e pH durante a fermentação alcoólica, descrição: pH (—▲—) °Brix (-■-). As barras indicam desvio padrão de média

O pH, durante a fermentação alcoólica, não sofreu muita alteração, manteve-se baixo, com valores entre 4,0 (inicial) e 3,8 (final), assim como descrito por outros autores. O aumento da acidez e redução dos valores de pH, são decorrentes da produção de ácidos orgânicos, como lático, succínico e acético. A análise dos componentes voláteis, metanol, etanol, álcoois superiores, acidez total e pH são de suma importância para se observar se as características do produto estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira. Geralmente, fermentados de fruta apresentam pH variando entre 3,0 e 4,0. O pH igual a 3,4 é o ideal para que o produto aumente a resistência de quem o consome (HASHZUME et al., 2001).

Na figura 8, apresentam-se também: os valores de sólidos solúveis totais durante a fermentação alcoólica, o grau °Brix indica o valor de açúcares solúveis presentes no mosto. O °Brix tende a diminuir durante a fermentação, pois os microrganismos presentes utilizam esses açúcares do mosto para a produção de ácidos orgânicos e etanol. Ao início da fermentação, o °Brix do suco foi

mensurado em 13°Brix, e ao longo da fermentação foi diminuindo gradativamente até atingir 4°Brix ao quinto dia de fermentação, por precaução, foi medido ainda por mais 3 dias (completando 8 dias de fermentação) para a confirmação do valor.

Durante a fermentação acética, o pH se manteve em 3,8 e o °Brix 4, não houveram mudanças após o final da fermentação alcoólica.

#### **4.4 Análises cromatográficas**

Durante a fermentação alcoólica do mosto do maçã, foi mensurada a quantidade de frutose e glicose presente (Figura 9), por análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A glicose foi consumida mais rapidamente que a frutose e não foi encontrado teor de glicose ao final da fermentação. Concentrações de frutose ainda foram detectados ao final do processo fermentativo, 0,5 g/L. No início da fermentação, a concentração de glicose era 18,3 g/L e a frutose 77,2 g/L. Esse efeito, segundo Schlegel (1990), chama-se diauxia, no qual o microrganismo consome primeiramente um substrato em detrimento do outro.

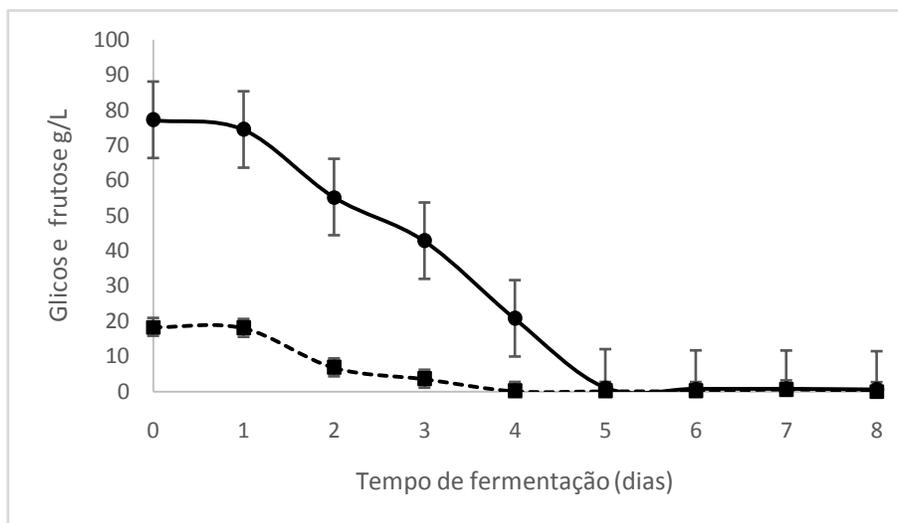


Figura 9 Concentração de glicose (---■---) e Frutose (—●—) durante a fermentação alcoólica. As barras indicam desvio padrão de média

Na figura 10, estão apresentados os valores de etanol e glicerol durante a fermentação alcoólica.

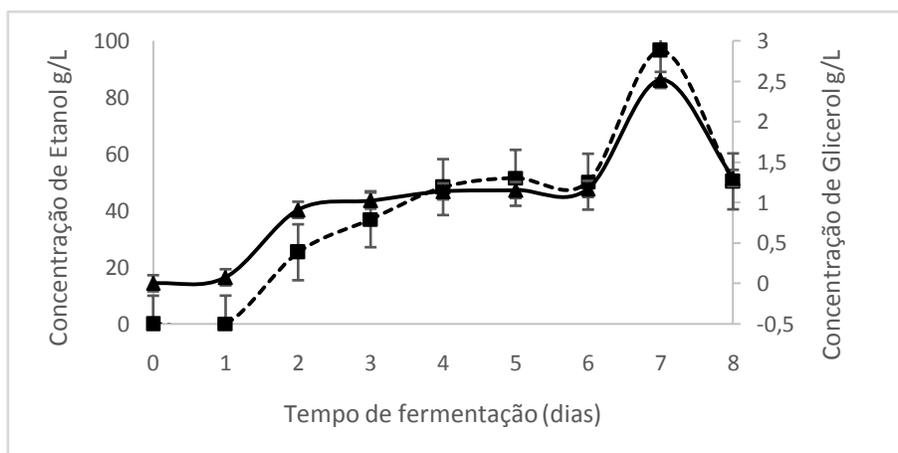


Figura 10 Concentração de etanol (—●—) e Cncentração de glicerol (---■---) durante a fermentação alcoólica. As barras indicam desvio padrão de média

Os valores de etanol no mosto de maçã inoculado com 10% de kefir, apresentaram entre 0,04 g/L, chegando a 96,62 g/L no sétimo dia, e após 10 dias do mosto descansado, houve pequena diminuição do etanol, chegando a 50,32 g/L. Após sete dias de fermentação, o mosto foi coado em coador de pano, e colocado em BOD a 28 °C por 10 dias e, nesse tempo, houve uma diminuição do etanol, o que pode ser explicado pela presença de bactérias do ácido acético, presentes nos grãos de kefir, pois, quando coado, o mosto continuou com algumas bactérias e leveduras, só foram retirados os grãos do kefir, então as bactérias do ácido acético encontraram ambiente favorável ao seu crescimento, a grande quantidade de etanol propiciou seu crescimento, e conseqüente oxidação do etanol a ácido acético.

*Saccharomyces cerevisiae*, previamente identificado em bebidas de kefir (MAGALHÃES et al., 2010a) e também, no presente trabalho, exibe forte metabolismo fermentativo e tolerância ao etanol, e é a principal responsável pela produção de álcool (PEREIRA et al., 2010). No entanto, algumas bactérias do gênero *Lactobacillus*, também têm a capacidade de produzir etanol, uma vez que elas têm atividade de álcool-desidrogenase, uma enzima capaz de converter o acetaldeído a etanol (MAGALHÃES et al., 2010c).

O aumento da concentração de glicerol foi observado, juntamente com o etanol. A concentração inicial do glicerol foi de 0,07 g/L, chegando a 2,51 g/L no sétimo dia, e após os 10 dias de “descanso” do mosto, a sua concentração diminuiu 1,30 g/L. As concentrações tanto do etanol quanto do glicerol podem contribuir no “corpo” do vinho, além da doçura, acidez, sabor e viscosidade (GAWEL; SLUYTER; WATERS, 2007). O glicerol é quantitativamente o mais importante subproduto da fermentação alcoólica depois do etanol e dióxido de carbono, esse composto não contribui diretamente para o aroma, em decorrência de sua natureza não volátil, mas contribui significativamente para a qualidade do

vinho, proporcionando doçura, suavidade e plenitude (REMIZE; SABLAYROLLES; DEQUIN, 2000; YALCINI; OZBAS, 2008).

Ao longo do processo de fermentação são produzidos ácidos orgânicos que são compostos de grande importância, pois têm influência sobre diversas propriedades organolépticas, como aroma, sabor, cor e também estão relacionados ao controle da estabilidade microbiológica das bebidas (MATO; LUQUE; HUIDOBRO, 2005). Na tabela 7, estão apresentadas as concentrações inicial e final de ácidos cítrico, málico, acético e láctico do fermentado alcoólico.

Tabela 7 Concentração de ácidos orgânicos durante a fermentação alcoólica

Ácidos Orgânicos g.L <sup>-1</sup>	Fermentação alcoólica		Fermentação acética (1)	Fermentação acética (2)
	Inicial	Final	Final	Final
Cítrico	0,90±0,05	0,45±0,01	0,26±0,01	0,29±0,01
Málico	6,49±0,11	1,71±0,02	ND	ND
Acético	0,04±0,01	3,22±0,04	40,01±0,01	39,98±0,01
Láctico	2,45±0,08	6,37±0,08	0,38±0,01	0,20±0,01

ND – não detectado.

O ácido cítrico está comumente presente em vinhos em concentrações de 0,1 e 0,7 g/L. Esse ácido pode ser metabolizado por numerosos gêneros de bactérias lácticas e resulta na produção de ácido acético e diacetil, os quais têm um importante efeito sobre o flavor do vinho (BARTOWSKY et al., 2004). No presente trabalho, o ácido cítrico apresentou concentração inicial de 0,90 g/L, chegando ao final da fermentação alcoólica com uma concentração de 0,41 g/L, pois esse foi consumido por BAL e BAA. Na fermentação acética (1), o ácido cítrico apresentou uma concentração final de 0,26 g/L e na fermentação acética

(2) 0,29 g/L. A presença de ácido málico, assim como outros ácidos é de grande importância em vinhos, e pode estar diretamente relacionada com a acidez (VOLSCHEK; VUUREN; VILJOEN-BLOOM, 2006). O ácido málico, principal ácido encontrado em maçãs, apresentou concentração inicial de 6,49 g/L, e final de 1,71 g/L, na fermentação acética (1) e (2), esse ácido não foi detectado. O ácido láctico, produzido por BAL, apresentou concentração inicial de 2,45 g/L, chegando a 6,37 ao final da fermentação alcoólica. A fermentação acética (1) e (2), apresentaram concentração final de ácido láctico próximas, 0,38 e 0,20 g/L, respectivamente. O ácido acético, apresentou concentração inicial de 0,04 g/L, chegando a 3,22 g/L ao final da fermentação alcoólica. Na fermentação acética, a concentração de ácido acético em (1) atingiu 40,01 g/L e a (2) 39,98 g/L. Esse ácido identifica um produto como vinagre desde o início, e está presente em elevadas concentrações ao final da fermentação acética. Seu teor pode variar dependendo do substrato usado ou uma possível diluição antes de sair para o mercado (NATERA et al., 2003). O vinagre para consumo deve ter entre 4% e 6% de ácido acético. A legislação brasileira estabelece em 4% o teor mínimo de ácido acético para ser considerado vinagre (BRASIL, 1999).

Durante a fermentação alcoólica são formados além do etanol e dióxido de carbono, um gama de metabólitos em menor quantidade, que conferem sabor a bebida. Dentre eles, podem-se citar álcoois superiores, ésteres, ácidos e acetatos, entre outros que são derivados a partir do metabolismo do açúcar e aminoácidos. Pequenas quantidades de compostos voláteis podem contribuir positivamente para a qualidade do vinho, enquanto que excessivas concentrações podem ter efeitos prejudiciais (ANTONELLI et al., 1999; NURGEL et al., 2002). Portanto, esses compostos são importantes para a formação do sabor e aroma de bebidas alcoólicas (PLUTOWSKA; WARDENCKI, 2008; SWIEGERS et al., 2005). Os principais fatores que afetam a formação desses

produtos são a espécie da levedura, o tipo de mosto e as condições de fermentação (MAURÍCIO et al., 1997).

Os compostos voláteis são importantes contribuintes para os sabores de bebidas, pois determinam diferentes características sensoriais desejáveis (ARRIZON; CALDERÓN; SANDOVAL, 2006). Estudos anteriores têm demonstrado que a formação de álcoois superiores e seus ésteres voláteis durante a fermentação do kefir é influenciada pela composição do meio (ATHANASIADIS et al., 2001). Os compostos voláteis identificados no fermentado alcoólico de maçã estão listados na tabela 9. Foram identificados 40 compostos nos fermentados, incluindo, aldeídos (1), álcoois superiores (10), terpeno (3), acetato (2), furano (4), ácidos graxos voláteis (7), cetona (2) e etil esters (11).

Tabela 8 Concentração de compostos voláteis ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) identificados no fermentado alcoólico por CG-FID

<b>COMPOSTOS</b>	<b>Concentração final mg/L</b>
<b>Aldeído</b>	
Acetaldeído	20,33±0,54
<b>Alcoois superiores</b>	
2-heptanol	9,38±0,56
2-metil-1-butanol	260,76±12,68
Metanol	23,66±1,56
2-feniletanol	68,28±1,45
3-metil-1-pentanol	18,38±1,22
1-propanol	18,50±0,63
1,3-propanediol	27,30±0,92
2,3-butanediol	9,16±0,27
2-propanol	58,04±0,26
Trans-3-hexen-1-ol	4,47±0,04

“Tabela 9, continuação”

<b>COMPOSTOS</b>	<b>Concentração final mg/L</b>
<b>Terpeno</b>	
$\alpha$ -terpeniol	2,53 $\pm$ 0,30
Verbenona	16,69 $\pm$ 0,33
$\beta$ -citronelol	22,61 $\pm$ 0,19
<b>Acetato</b>	
Fenil acetato	12,94 $\pm$ 0,45
Fenil etil acetato	8,30 $\pm$ 0,26
<b>Furano</b>	
Furfural	36,09 $\pm$ 0,27
Furfuril acetato	22,92 $\pm$ 0,20
Furfuril propionato	70,19 $\pm$ 0,63
Furfutil álcool	11,41 $\pm$ 0,31
<b>Ácidos graxos voláteis</b>	
Ácido decanóico	27,46 $\pm$ 0,56
Ácido nonanóico	29,33 $\pm$ 0,20
Ácido hexanóico	15,52 $\pm$ 0,22
Ácido propiônico	34,76 $\pm$ 0,01
Ácido octanóico	75,16 $\pm$ 0,20
Ácido 2-etil capríco	15,68 $\pm$ 0,23
Ácido benzoico	423,47 $\pm$ 0,39
<b>Cetona</b>	
Acetoína	16,45 $\pm$ 0,21
2-nonanona	17,15 $\pm$ 0,36

“Tabela 9, conclusão”

<b>COMPOSTOS</b>	<b>Concentração final mg/L</b>
<b>Etil éster</b>	
Dietil malonato	11,35±0,26
Dietil succinato	4,15±0,37
Butirato de etila	22,58±0,48
Acetato de etila	7,54±0,12
Octanoato de etila	17,74±0,06
Etil piruvato	3,76±0,15
Lactato de etila	241,54±0,42
Fenil acetato	12,94±0,04
Propil butirato	22,43±0,28
Mano etil succinato	9,84±0,13
Fenil etil acetato	8,30±0,04

O acetaldeído encontrado no fermentado alcoólico é o composto carbonílico mais abundante nos vinhos, resultante da descarboxilação do piruvato pela piruvato descarboxilase com liberação de dióxido de carbono. As concentrações do acetaldeído podem variar entre 10 mg/L e 300 mg/L, sendo o valor sensorial limiar de 100 mg/L (SWIEGERS et al., 2005). O acetaldeído em níveis baixos proporciona agradável aroma frutado (nozes e acre), mas elevadas concentrações contribuem, negativamente, no aroma com odor pungente (LIU; PILONE, 2000). No presente trabalho, acetaldeído foi identificado ao final da fermentação alcoólica a concentração de 20,33 mg/L, que, segundo Liu e Pilone (2000), encontra-se abaixo do limiar de percepção, que é de 100 mg/L.

Os álcoois superiores são aqueles com mais de dois átomos de carbono, e que, segundo Jefery e Wilkinson (2014), surgem por meio do metabolismo de açúcares e aminoácidos. Compostos voláteis predominantes nas fermentações (centenas de mg/L), quando presentes em níveis normais, as características do

fermentado de fruta são positivas, mas quando presentes em quantidades excessivas (em torno de 300 a 400 mg/L ou mais) podem produzir aromas desagradáveis. Os álcoois como, 1-hexanol e 3-metil-1-butanol têm uma influência positiva sobre o aroma de bebidas fermentadas, quando a concentração chega até 20 mg/L. Caso haja aumento da concentração, pode contribuir, negativamente, para o aroma do produto (DRAGONE et al., 2009; GÓMEZ-MIGUEZ et al., 2007). A razão entre o ácido 3-metil-1-butanol e 2-metil-1-butanol é um indicador adequado para julgar o processo de acidificação, uma vez que diminuem com o tempo de fermentação (NIETO et al., 1993). Ao final da fermentação alcoólica, o 3-metil-1-butanol apresentou concentração 18,38 mg/L. O 2-metil-1-butanol não foi encontrado neste trabalho, provavelmente, pelo fato de ser metabolizado por BAA a um ritmo mais lento do que o 3-metil-1-butanol, portanto, quando a taxa de acidificação é elevada, ocorre um declínio acentuado nessa relação (MORALES et al., 2001).

Ainda dentro do grupo dos álcoois superiores, 1-propanol, está associado com aromas de frutos maduros e álcool. No entanto, os valores obtidos neste trabalho (18,50 mg/L) foram bem abaixo do limiar de odor, que é 306 mg/L (PEINADO et al., 2006).

Os ácidos graxos voláteis, com cadeia de carbono variando entre C3 e C16 são produzidos pelas leveduras durante a fermentação alcoólica e juntos podem contribuir ou afetar, negativamente, o aroma do vinho, dependendo do tamanho da cadeia carbonada (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). Estes são subprodutos do metabolismo dos ácidos graxos via acetil-coenzima-A (acil-Co-A), sendo sintetizados pela condensação repetitiva do acil-Co-A, catalisado pelo complexo ácido graxo sintetase (LAMBRECHTS; PRETORIUS, 2000). As cetonas mais importantes são a acetoína (3-hidroxi-2-butanona) e diacetil (2,3-butanodiona). Cetonas como a propanona, butanona e pentanona também são identificadas em vinhos (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). A acetoína é um

composto que se acumula durante o processo de acidificação, por conseguinte, está intimamente relacionado com a qualidade (LLAGUNO; POLO, 1991). A acetoína está relacionada, normalmente, com o diacetil, um aromatizante produzido também pelo mesmo processo. Esses dois componentes formam os aromas de diversos produtos, principalmente queijos e manteigas, além de funcionarem como “carriers” de outros aromas, como o vinagre e o café (CARVALHO, 1999). Neste estudo, a acetoína foi identificada durante a fermentação alcoólica, chegando ao final com uma concentração de 16,45 g/L.

O conteúdo equilibrado de ésteres, tem um papel importante sobre as características organolépticas do vinagre, estes interferem no odor e sabor, em especial nos vinagres envelhecidos, dando a eles um valor típico de produtos de qualidade. Os ésteres se classificam em voláteis e não voláteis. Os primeiros interferem no aroma, são eles: acetato de metila, etila, amila e isoamila, os voláteis influenciam no gosto e os principais são: succinato, malato e tartarato de etila. O éster volátil mais importante é o acetato de etila, este se forma a partir de ácido acético e etanol (NAVASCUÉS, 1995). No presente estudo, foram encontrados alguns ésteres durante a fermentação alcoólica, dos quais são apresentadas as concentrações finais na tabela 8, são eles: dietil malonato (11,35 mg/L), dietil succinato (4,15 mg/L), butirato de etila (22,58 mg/L), acetato de etila (7,54 mg/L), octanoato de etila (17,74 mg/L), etil piruvato (3,76 mg/L), lactato de etila (241,54 mg/L), fenil acetato (12,94 mg/L), propil butirato (22,43 mg/L), mano etil succinato (9,84 mg/L) e fenil etil acetato (8,30 mg/L).

Durante a fermentação acética, tanto no tratamento (1), quanto no tratamento (2), foi encontrado acetaldeído, chegando ao final das fermentações com concentrações em torno de 12,16 mg/L. O acetaldeído foi produzido durante a fermentação alcoólica, e é um importante composto formado, pois este é convertido em ácido acético durante a fermentação acética. Foram encontrados

também ésteres como: acetato de etila (20,47 mg/L), dietil succinato (177,26 mg/L) e hexanoato de etila (134,89 mg/L), e ainda alguns ácidos voláteis e álcoois, apresentando pequenas concentrações. O acetato de etila é, quantitativamente, o éster mais importante do vinho e do vinagre, esse composto aumenta o aroma do vinagre e se encontra em maior quantidade nos melhores vinagres.

#### 4.5 Parâmetros cinéticos

Na tabela 10, apresentam-se os valores dos parâmetros cinéticos obtidos do fermentado alcoólico de maçã. Observou-se que o fermentado apresentou valor de rendimento em etanol ( $Y_{p/s}$ ) 0,47 g/g, rendimento em glicerol ( $Y_{g/s}$ ) 0,01 g/g<sup>-1</sup>, produtividade em etanol ( $Q_p$ ) 0,27 g/L/h e eficiência fermentativa ( $E_f$ ) 93,12%.

Tabela 9 Parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica

Variáveis			
$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{g/s}$ (g/g)	$Q_p$ (g/L/h)	$E_f$ (%)
0,47	0,01	0,27	93,12

Os valores de rendimento em etanol, no presente trabalho, foram semelhantes aos encontrados por Duarte et al. (2010), quando estudaram a fermentação alcoólica de framboesa, obtendo os valores em torno de 0,38 g/g a 0,49 g/g. No entanto, verificou-se que, para a produtividade, o valor encontrado foi mais baixo, o que pode ser explicado pelo tempo de fermentação.

#### 4.6 Produção do ácido acético

O etanol é um composto formado a partir da via glicolítica ou Embden-Meyerhof. Duas reações relacionadas a essa via conduzem à produção de etanol, por meio da fermentação alcoólica. Na primeira reação, o piruvato é descarboxilado, produzindo acetaldeído e liberando  $\text{CO}_2$ . Em uma segunda reação, o acetaldeído é, então, reduzido para produzir etanol e, ao mesmo tempo, uma molécula de NADH é oxidada a  $\text{NAD}^+$  para cada molécula de etanol produzida (RIBÉREAU-GAYON et al., 2006). O etanol determina a viscosidade (corpo) do vinho e atua como fixador de aroma, sendo o principal componente, seguido por dois, álcoois superiores e ésteres (MINGORANCE-CAZORLA et al., 2003). O etanol produzido na fermentação alcoólica, foi consumido gradativamente durante a fermentação acética por bactérias do ácido acético e bactérias ácido lácticas heterofermentativas, presentes nos grãos de kefir utilizados como inóculo. O ácido acético foi então produzido. De acordo com a figura 11, no primeiro dia da fermentação acética conduzida com 10% de kefir, o etanol foi mensurado em 38,45 g/L, chegando a 4,38 g/L no último dia da fermentação. O etanol é oxidado a ácido acético por BAA, e, de acordo com a figura 11, no início da fermentação acética (tratamento (1)) havia 4,36 g/L de ácido acético e, ao final da fermentação, foram mensurados 40,01 g/L.

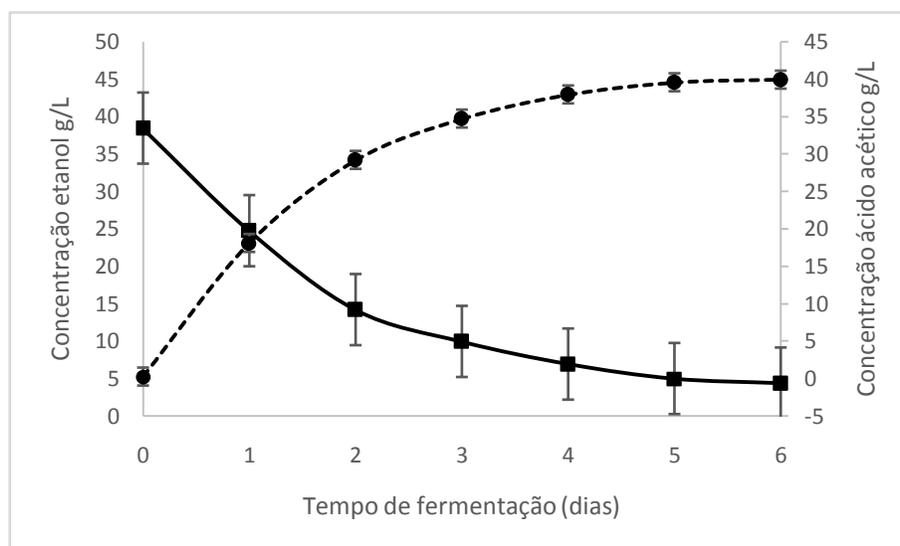


Figura 11 Concentração de etanol (—■—) e ácido acético (---●---) durante a fermentação acética conduzida com 10% de inóculo. As barras indicam desvio padrão de média

O ácido acético foi formado por algumas bactérias acéticas encontradas durante a fermentação (*Acetobacter pasteurianus* e *Acetobacter syzygii*) e, provavelmente, por algumas BAL heterofermentativas, previamente identificados em bebidas de kefir brasileiras e também no presente estudo *Lactobacillus paracasei* (MAGALHÃES et al., 2010a). Esses resultados são de grande importância, uma vez que o ácido lático e ácido acético fornecem sabor agradável e inibem o desenvolvimento de microrganismos patogênicos ou indesejáveis, em razão do aumento da acidez do substrato (MAGALHÃES et al., 2010b).

A fermentação acética (tratamento (2)), apresentada na figura 12, foi semelhante ao tratamento (1). Inicialmente, o etanol estava com uma concentração de 38,63 g/L, que foi, gradativamente, sendo consumido por BAA presentes no kefir. Ao final da fermentação, o etanol se encontrou em uma concentração de 3,62 g/L. Em contrapartida, o ácido acético iniciou a

fermentação acética com 9,35 g/L, uma concentração inicial mais alta que o tratamento (1). Ao final da fermentação, foram encontrados 39,98 g/L de ácido acético.

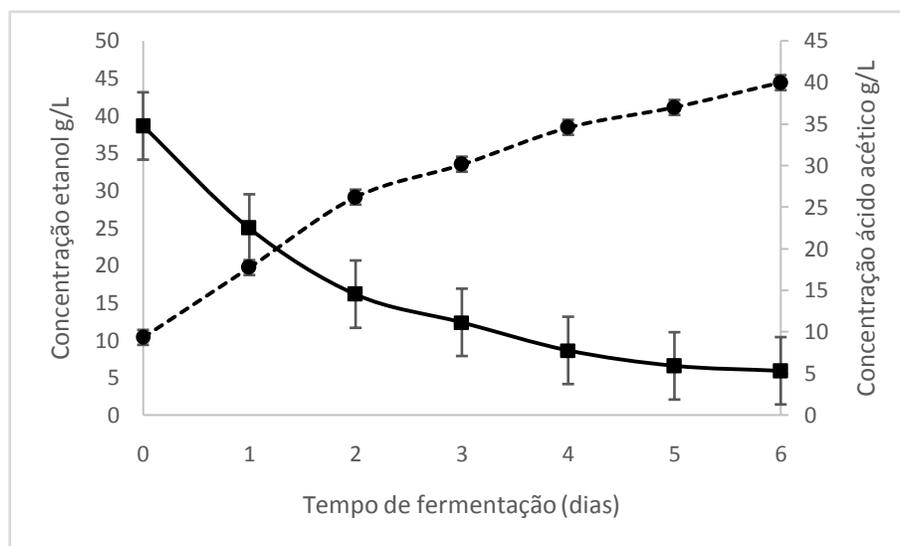


Figura 12 Concentração de etanol (—■—) e ácido acético (---●---) durante a fermentação acética conduzida com 20% de inóculo. As barras indicam desvio padrão de média

A fermentação acética, resultante da oxidação de etanol por bactérias acéticas, corresponde a um processo aeróbio de fermentação biológica de dois passos; o primeiro passo no qual o etanol é oxidado a acetaldeído e na segunda etapa o acetaldeído é oxidado a ácido acético, essa oxidação é catalisada por enzimas encontradas na membrana da célula, especificamente sobre a superfície externa da membrana citoplasmática em contato com o meio de cultura. Essas enzimas são álcool desidrogenas (ADH) e Aldeído Desidrogenase (ALDH), além de existirem outras importantes enzimas que atuam na oxidação do etanol (ORY; ROMERO; CANTERO, 1998; TESFAYE et al., 2002). O resultado é uma solução com uma alta concentração de ácido acético e uma

pequena quantidade de etanol residual não convertido, junto com um bom número de produtos secundários. Neste estudo, o vinagre kefir de maçã produzido resultou em um elevado rendimento de produção de ácido acético, alcançando 79% de rendimento.

Com base nas análises do vinagre e os limites requeridos pela Legislação Brasileira, o produto final de vinagre kefir de maçã tem um nível aceitável de ácido acético, de no mínimo 4,0%, e uma concentração de etanol inferior a 1,0% (v / v).

#### **4.7 Avaliação da atividade metabólica por Laser BioSpeckle**

Durante a fermentação, foi realizada análise diária dos grãos de kefir pelo BioSpeckle laser, para observar a atividade biológica. O kefir foi analisado antes da fermentação e está apresentado na figura 13, como o tempo 0. O valor obtido a partir do método AVD, para atividade biológica dos grãos de kefir antes de ser inoculado ao mosto, foi de 11,21. Nos primeiros dias de fermentação, houve diminuição na atividade biológica do kefir, o que se explica pelo fato do kefir ter sido retirado de um meio onde havia muitos nutrientes essenciais (leite), passando para um meio que não se apresentava tão rico nutricionalmente ao kefir (mosto de maçã). A diminuição na atividade biológica persistiu até o terceiro dia de fermentação (fase lag ou fase de adaptação do microrganismo ao meio de cultivo). No quarto dia, a atividade biológica do kefir no mosto de maçã, apresentou-se maior (11,67) e a atividade foi se tornando maior até o sétimo dia (16,18). Esse fato se explica, em razão da multiplicação intensa dos microrganismos presentes no kefir, após adaptação ao meio de cultivo (fase log de crescimento). No último dia da leitura em laser BioSpeckle, o kefir apresentou, novamente, baixa na sua atividade biológica, atingindo um valor de 14,46. Essa queda apresenta a fase de morte dos microrganismos presentes no

kefir, pois o meio onde o microrganismo se encontrava (mosto de maçã) já apresentava muitos metabólitos tóxicos aos mesmos, o que fez com que o crescimento microbiano diminuísse, e alguns microrganismos começassem a morrer. Além da atividade biológica real, o BioSpeckle laser pode também captar fatores externos ao kefir, o que explica a oscilação e instabilidade da atividade biológica durante a fermentação. Até o sétimo dia de fermentação havia uma grande quantidade de etanol presente no mosto, e no oitavo dia, essa concentração de etanol diminuiu (Figura 13), portanto, o etanol pode ter sido captado durante as leituras. Esse fato também explicaria a diminuição após o sétimo dia, pois como o etanol é volátil, esse fenômeno gera variação dos índices de refração durante a iluminação, influenciando nos resultados do BioSpeckle. Como a concentração do etanol diminuiu no oitavo dia, a volatilidade foi menor e o BioSpeckle laser captou uma menor atividade.

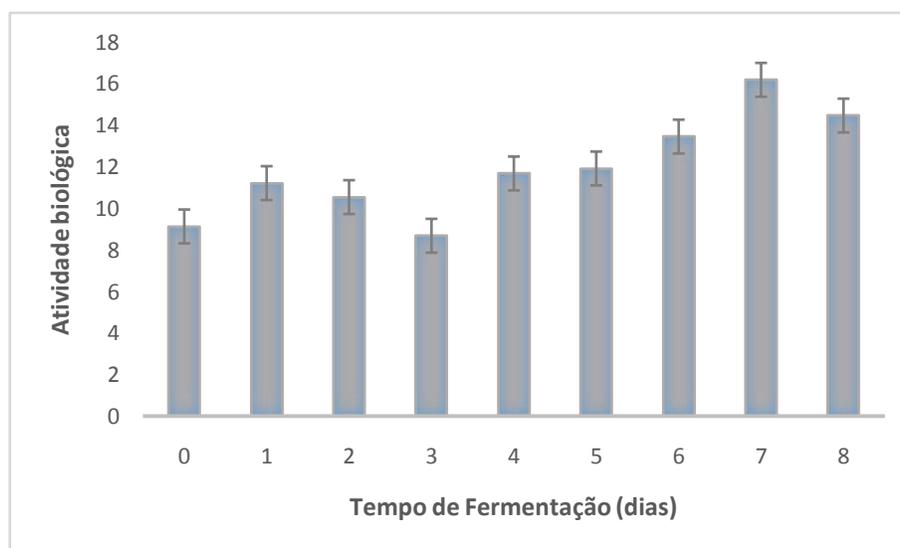


Figura 13 Atividade biológica dos grãos de kefir durante a fermentação. As barras indicam desvio padrão de média

Na fermentação acética tratamento (1), apresentado na figura 14, no primeiro dia de fermentação, há uma diminuição em relação ao ultimo dia da fermentação alcoólica, pois ocorreu uma diminuição no teor alcoólico do fermentado.

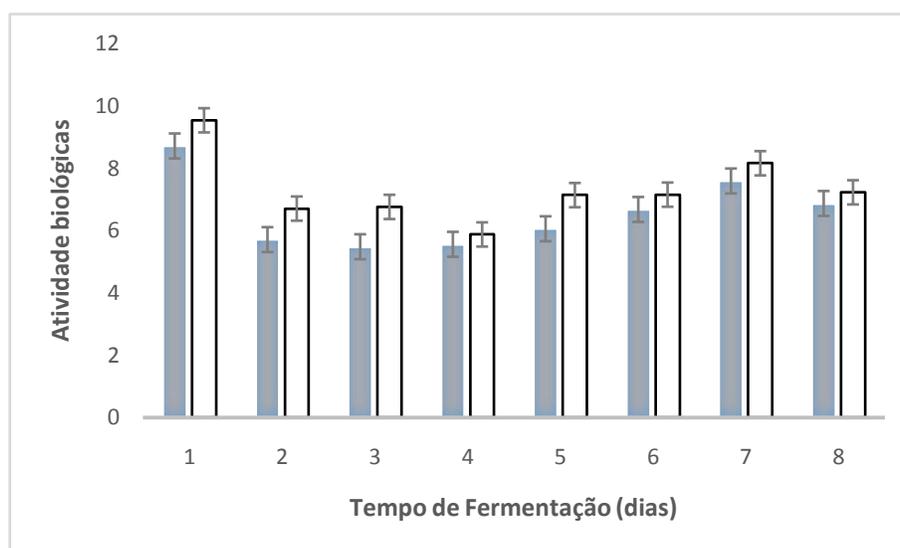


Figura 14 Atividade Biológica dos grãos de kefir durante a fermentação acética: tratamento (1) (■) e tratamento (2) (□). As barras indicam desvio padrão de média

O kefir utilizado foi retirado do leite antes de se iniciar a fermentação acética, portanto, sua atividade biológica se apresentou maior que os dias seguintes, pois o kefir estava em ambiente propício ao seu crescimento. No primeiro dia de iluminação, tanto o tratamento (1), quanto o tratamento (2), tiveram uma atividade biológica mais alta (8,70 e 9,52, respectivamente), seguindo com diminuição apresentada nas leituras, pois os microrganismos estavam se adaptando às novas condições impostas por um novo meio, com menor quantidade de nutrientes disponíveis, em relação ao leite. No quinto dia de fermentação, a atividade biológica do kefir, no tratamento (1), começou a

aumentar (6,05), e esse comportamento foi observado até o sétimo dia, quando apresentou uma atividade biológica de 7,58. Ao final da fermentação (oitavo dia), a atividade biológica diminuiu novamente, chegando a 6,86. No tratamento (2), o primeiro dia de fermentação, o kefir apresentou a maior atividade biológica e, no segundo dia, ocorreu diminuição até o quarto dia (5,86), no quinto dia, a atividade se recupera e chega a 7,13, um pouco maior que no tratamento (1). No sexto e sétimo dia, a atividade vai aumentando (7,14 e 8,15, respectivamente), até que, no oitavo dia, a atividade biológica diminuiu novamente, assim como aconteceu na fermentação alcoólica e no tratamento (1) da fermentação acética. O comportamento de todas as fermentações em relação à atividade biológica se assemelhou bastante a um gráfico de crescimento microbiano, com fase lag, log, estacionária e de morte, não apresentando uma fase log e estacionária muito delimitada. Esse fato confirmou que a metodologia da técnica do Biospeckle laser foi eficiente para monitorar o comportamento microbiológico (por meio de atividades metabólicas microbianas) em um processo fermentativo. A ferramenta BioSpeckle laser, é uma potencial aplicação como método de análise do kefir, o que pode dispensar algumas análises durante o processo, diminuindo o custo do produto final.

Esses resultados mostraram que o BioSpeckle laser se apresentou como uma ótima ferramenta para se medir a atividade biológica do kefir enquanto inóculo no processo fermentativo. Esse fato pode diminuir o custo durante o processo, uma vez que algumas análises podem ser dispensadas ao se utilizar o BioSpeckle laser.

#### **4.8 Análise sensorial**

Foram realizadas análises sensoriais para o vinagre feito com 10% de kefir, o vinagre feito com 20% de kefir e o vinagre de maçã comercial. Foram realizados o teste de aceitação e CATA, com consumidores não-treinados. Não houve diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) em aceitação entre as duas amostras de vinagre (10% e 20%). A aceitação média foi de 6,1 e 6,0 dos vinagres produzidos com 10% e 20% de kefir, respectivamente, o que significa que os consumidores "gostaram ligeiramente" dos vinagres elaborados. Os consumidores encontraram, principalmente, sabor azedo, aroma de ácido acético e aparência translúcida para os vinagres inoculados com kefir (Figura 15) e o vinagre comercial apresentou aparência límpida. Não foram observadas grandes diferenças entre os dois vinagres produzidos no presente trabalho. Os dois vinagres produzidos foram bem aceitos pelos avaliadores (80% dos consumidores disseram que comprariam os vinagres de maçã de kefir).

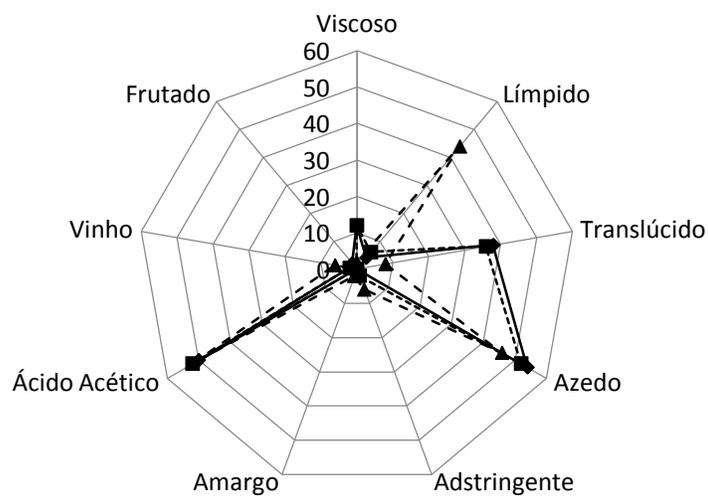


Figura 15 Perfil sensorial dos vinagres produzidos com grãos de kefir em detrimento do vinagre comercial de maçã. Tratamento (1) - 10% de kefir ( ---◆--- ), Tratamento (2) - 20% de kefir ( —■— ) e Vinagre de maçã Comercial ( --▲--). O centro do diagrama corresponde à menor intensidade de sabor, aumentando em direção às extremidades

## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho, algumas conclusões foram tiradas:

- a) o suco de maçã foi utilizado para a fermentação sem a necessidade de adição de açúcar;
- b) a cinética fermentativa apresentou-se semelhante a outros trabalhos, considerada uma boa cinética;
- c) o vinagre de kefir teve um bom rendimento durante a acetificação (79%), atingindo o padrão necessário para a legislação Brasileira aceitá-lo como vinagre (4,0% de ácido acético);
- d) durante toda a fermentação alcoólica e acética, o produto apresentou metabólitos importantes para suas características organolépticas;
- e) foram encontrados microrganismos anteriormente descritos em grãos de kefir e a microbiota se manteve padronizada durante o processo fermentativo. Não houve contaminação microbiana durante o processo fermentativo;
- f) foi apresentada uma nova metodologia para medir a atividade metabólica dos grãos de kefir pelo laser Biospeckle. Esse fato facilita o controle microbiológico durante um processo fermentativo;
- g) os grãos de kefir apresentaram eficiência na produção do vinagre de maçã;
- h) o vinagre de kefir teve uma boa aceitação pela análise sensorial realizada.

## **6 PESPECTIVAS FUTURAS**

Sugere-se um estudo completo do vinagre, para observar potencial probiótico dos microrganismos dos grãos de kefir presentes no vinagre produzido. Podendo o vinagre de kefir vir a ser caracterizado como um condimento com potencial probiótico.

Sugere-se que o processo fermentativo seja realizado em maior escala, vindo a ser futuramente um produto a ser inserido no mercado “Vinagre de Kefir”.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K. et al. Generation of antitumor active neutral medium-sized alpha-glycan in apple vinegar fermentation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 71, n. 9, p. 2124-2129, Sept. 2007.
- ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. **Journal of Dairy Science**, Thomson, v. 65, n. 3, p. 346-352, Jan. 1982.
- ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician Region (North-West of Spain). **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 60, p. 263-267, Feb. 1993.
- ANTONELLI, A. et al. Yeast influence on volatile composition of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 3, p. 1139-1144, Feb. 1999.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. de A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidas por fermentação**. São Paulo: E. Blucher, 1983. 227 p.
- ARIZAGA, R.; TRIVI, M. R.; RABAL, H. J. *speckle* time evolution characterization by co-ocurrence matrix analysis. **Optics & Laser Technology**, Oxford, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.
- ARRIZON, J.; CALDERÓN, C.; SANDOVAL, G. Effect of different fermentation conditions on the kinetic parameters and production of volatile compounds during the elaboration of a prickly pear distilled beverage. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 921-928, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE MAÇÃ. **Valor nutricional da maçã**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

ASSOCIATION OF ANALYTICAL COMMUNITIES. **Official methods of analysis of AOAC international**. 16<sup>th</sup> ed. Arling, 2001. 3000 p.

ATHANASIADIS, I. et al. Effect of carbohydrate substrate on fermentation by kefir yeast supported on delignified cellulosic materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 2, p. 658-663, 2001.

BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. **Cadeia produtiva da maçã no Brasil: limitações e potencialidades**. Disponível em: <<http://www.brde.com.br/>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

BARTOWSKY, E. J. et al. Spoilage of bottled red wine by acetic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, p. 307-314, Feb. 2003.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. The 'buttery' attribute of wine - diacetyl - desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 96, n. 3, p. 235-252, Nov. 2004.

BATISTA, C. A. M.; RABELO, G. F.; SANTOS, L. M. dos. **Análise da relação entre umidade e atividade biológica em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), através do método BioSpckle e do algoritmo momento de inércia**. 2003. 56 p. Monografia (Graduação em Ciência da Computação) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

BERGMANN, O.; PEREIRA, M.; VEIGA, S. Microbial profile of a kefir sample preparations: grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.

BOFFO, E. F. et al. Classification of Brazilian vinegars according to their <sup>1</sup>H NMR spectra by pattern recognition analysis. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 42, p. 1455-1460, May 2009.

BRAGA, R. A. et al. Biospeckle numerical values over spectral image maps of activity. **Optics Communications**, Amsterdam, v. 285, p. 553-561, Mar. 2012.

BRAGA, R. A. et al. Potencial do Bio-Speckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 553-561, maio/jun. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 24**, de 8 de setembro de 2005. Aprova o Manual Operacional de Bebidas e Vinagre. Brasília, 2005. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 36, de 14 de outubro de 1999. Aprova o regulamento técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade para fermentados acéticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, 15 out. 1999. Seção 1, p. 76.

CARVALHO, J. C. **Produção de Diacetil e Acetoína**: desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação dos fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetlactis*. 1999. 100 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

CEREZO, A. et al. Effect of wood on the phenolic profile and sensory properties of wine vinegars during ageing. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 23, n. 2, p. 175-184, Mar. 2010.

CEVIKBAS, A. et al. Antitumoural, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytother Research**, Hoboken, v. 8, p. 78-82, Feb. 1994.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 100, p. 43-53, Jan. 2002.

CHEN, T. H. et al. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 7, p. 3002-3013, July 2009.

CHERKAOUI, A.; HIBBS, J.; EMONET, S. Comparison of two matrixassisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine bacterial speciation. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, p. 1169-1175, Feb. 2010.

CRISCO COMPANY. **1 strawberry lane orrville**. Ohio, 2005.

Disponível em: <[http://www.crisco.com/basics/all\\_about/vinegar.asp](http://www.crisco.com/basics/all_about/vinegar.asp)>. Acesso em: 10 fev. 2015.

DÁVALOS, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVES, C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. **Food Chemistry**, Oxford, v. 93, n. 2, p. 325-330, Nov. 2004.

DIAS, D. R. et al. Elaboration of a fruit wine from cocoa (*Thebroma cacao* L.) pulp. **International Journal of Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 319-329, Mar. 2007.

DIMITRELLOU, D. et al. Whey-cheese production using freeze-dried kefir culture as a starter. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 103, n. 4, p. 1170-1183, Dec. 2007.

DRAGONE, G. et al. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, Oxford, v. 112, n. 4, p. 929-935, Feb. 2009.

DUARTE, W. F. et al. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabirola, 7 jaboticaba and umbu. **Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 43, n. 10, p. 1564-1572, Dec. 2010.

EBNER, H. Vinegar. In: REED, G. (Ed.). **Industrial microbiology**. Westport: AVI, 1982. p. 802-834.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Elaboração de vinagre**. Brasília, 2002. 31 p.

ESTRELA, C. et al. Substância ESP: análise da dissolução tecidual e tensão superficial: parte 1. **Revista Odontológica do Brasil Central**, Goiânia, v. 14, n. 38, p. 11-8, 2005.

FONTÁN, M. C. G. et al. Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made cows' milk, using a comercial starter culture. **International Dairy Journal**, Cambridge, v. 16, p. 762-767, Apr. 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Comodities por país**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

GAWEL, R.; SLUYTER, S. van; WATERS, E. J. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 13, n. 1, p. 38-45, 2007.

GHOSH, S. et al. Study on fermentation conditions of palm juice vinegar by response surface methodology and development of a kinetic model. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 461-472, Sept. 2013.

GÓMEZ-MÍGUEZ, M. J. et al. Volatile components of Zalema white wines. **Food Chemistry**, Oxford, v. 100, n. 4, p. 1464-1473, 2007.

GONZÁLEZ, A. et al. Application of molecular methods for the differentiation of acetic acid bacteria in a red wine fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 96, n. 4, p. 853-860, Feb. 2004.

GUEDES, J. D. S. et al. Assessment of biological activity of kefir grains by laser biospeckle technique. **African Journal of Microbiology Research**, Nairobi, v. 28, n. 8, p. 2639-2642, July 2014.

GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. **International Journal of Dairy Technology**, Huntingdon, v. 58, n. 1, p. 25-29, Feb. 2005.

HALLÉ, C. et al. **Les kefirs**: des associations bactéries lactiques-levures. 2. ed. Madrid: Loriga, 1994. 412 p.

HASHIZUME, T. et al. cDNA cloning and expression of a novel cytochrome p450 (cyp4f12) from human small intestine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 280, n. 4, p. 1135-1141, 2001.

HLEBOWICZ, J. et al. Effect of apple cider vinegar on delayed gastric emptying in patients with type 1 diabetes mellitus: a pilot study. **BMC Gastroenterology**, London, v. 7, p. 1-6, Dec. 2007.

HOLT, J. G. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

HORIUCHI, J.; KANNO, T.; KOBAYASHI, M. New vinegar production from onions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 88, n. 1, p. 107-109, Feb. 1999.

HSIEH, H. H. et al. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 157, n. 1, p. 73-81, June 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Economia**. Disponível em: . Acesso em: 10 mar. 2015.

IRIGOYEN, A. et al. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 613-620, May 2005.

JEFFERY, D. W.; WILKINSON, K. L. Wine. In: BAMFORT, C. W.; WARD, R. (Ed.). **The Oxford 14 handbook of food fermentations**. Oxford: Oxford University, 2014. p. 54-147.

JIANZHONG, Z. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 8, p. 770-775, May 2009.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. **Carbohydrate Research**, Cambridge, v. 7, p. 200-211, Dec. 1968.

KOROLEVA, N. S. Technology of kefir and Kumys. **IDF Bulletin**, Brussels, v. 227, p. 96-100, 1988.

LAMBRECHTS, M. G.; PRETORIUS, I. S. Yeast and its importance to wine aroma: a review. **South African Society for Enology & Viticulture**, Nairobi, v. 21, p. 97-129, 2000. Special issue.

LATORRE-GARCÍA, L.; POLAINA, J. Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 785-791, 2006.

LEBEAU, T.; JOUENE, T.; JUNTER, G. A. Diffusion of sugar and alcohols through composite membrane structures immobilizing viable yeast cell. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 18, n. 22, p. 434-438, 1998.

LEBLANC, A. de M. et al. Study of cytokines involved in the prevention of a murine experimental breast cancer by kefir. **Cytokine**, New York, v. 34, n. 1/2, p. 1-8, 2006.

LEE, M. Y. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in mouse asthma model. **Immunobiology**, Washington, v. 212, p. 647-654, Nov. 2007.

LIMA, N. et al. Modern polyphasic methods that include MALDI-TOF analyses for fungal identifications and authentications. In: EUROPEAN CULTURE COLLECTIONS' ORGANIZATION MEETING, 10., 2008, Ghent. **Proceedings...** Ghent: ECCO, 2008. p. 11.

LIMA-NETO, R. et al. Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

LIU, F. et al. Detection of organic acids and pH of fruit vinegars using near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. **Food and Bioprocess Technology**, Chicago, v. 4, n. 8, p. 1331-1340, 2008.

LIU, S. Q.; PILONE, G. J. An overview of formation and roles of acetaldehyde in winemaking 8 with emphasis on microbiological implications. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 49-61, Dec. 2000.

LLAGUNO, C.; POLO, M. C. **El vinagre de vino**. Madrid: Consejo Superior de Investigación Científicas, 1991. 238 p.

MACHADO, B. A. S. et al. Mapeamento tecnológico de patentes de Kefir. **ProspeCT&I**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 2, p. 86-97, 2012.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: structure microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 693-702, June 2011a.

MAGALHÃES, K. T. et al. Chemical composition and sensory analysis of cheese whey-based beverages using kefir grains as starter culture. **International Journal of Food Science & Technology**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 871-878, Apr. 2011b.

MAGALHÃES, K. T. et al. Comparative study of the biochemical changes and volatile compounds during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, Oxford, v. 126, n. 1, p. 249-253, May 2011c.

MAGALHÃES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 1-10, July 2010a.

MAGALHÃES, K. T. et al. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 22, p. 8843-8850, Nov. 2010b.

MALDONADO, O.; ROLZ, C.; CABRERA, S. S. Wine and vinegar production from tropical fruits. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 40, n. 2, p. 262-265, 1975.

MATO, I.; LUQUE, S. S.; HUIDOBRO, J. F. A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. **Food Research International**, Barking, v. 38, p. 1175-1188, 2005.

MAURICIO, J. C. et al. The effects of grape 16 must fermentation conditions on volatile alcohols and esters formed by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 75, n. 2, p. 155-160, 1997.

MECCA, F.; ANDREOTTI, R.; VERONELLI, L. **L'aceto**. Brescia: AEB, 1979. 433 p.

MICHELI, L. et al. Isolation and characterization of a rosy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v. 53, n. 1, p. 69-74, Jan. 1999.

MIGUEL, M. G. C. P. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, Washington, v. 43, p. 1523-1528, Mar. 2010.

MINGORANCE-CAZORLA, L. et al. Contribution of different natural yeasts 24 to the aroma of two alcoholic beverages. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 297-304, 2003.

MORAES, M. A. C. **Métodos para avaliação sensorial de alimentos**. 8. ed. Campinas: UNICAMP, 1993. 93 p.

MORALES, W. et al. Multivariate analyses of commercial and laboratory produced Sherry wine vinegars: influence of acetification and aging. **European Food Research Technology**, London, v. 212, n. 6, p. 676-682, June 2001.

MOREIRA, M. F. B. et al. Caracterização da transmissão da luz laser em semente de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 119-126, 2002.

MORETTO, E. et al. **Vinhos e vinagres: processamento e análises**. Florianópolis: UFSC, 1988. 168 p.

NATERA, R. et al. Chemometric studies of vinegars from different raw materials and processes of production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 11, p. 3345-3351, May 2003.

NAVASCUÉS, E. Influencia de la temperatura sobre la formación de volátiles secundários. In: JORNADAS DE VITICULTURA Y ENOLOGÍA DE TIERRA DE BARROS, 17., 1995, Almendralejo. **Anales...** Almendralejo, 1995. p. 619.

NIETO, M. A. et al. Recent progress in wine vinegar R & D and some indicators for the future. In: NAVASCUÉS, E. et al. (Ed.). **Food flavour, ingredients and composition**. New York: Elsevier Science, 1993. p. 469-537.

NURGEL, C. et al. Influence of 2 *Saccharomyces cerevisiae* strains on fermentation and flavour compounds of white wines made from cv. Emir grown in Central Anatolia, Turkey. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 29, n. 1, p. 28-33, July 2002.

ORY, I. D.; ROMERO, E. L.; CANTERO, D. Modeling the kinetics of growth of *Acetobacteracetii* in discontinuous culture: influence of the temperature of operation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 49, n. 2, p. 189-193, Feb. 1998.

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

PALMA, A. S. A.; CARVALHO, L. F. C. P.; GAVÓGLIO, L. C. Vinagres. In: \_\_\_\_\_. **Biotecnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: E. Blucher, 2001. v. 4, p. 183-208.

PARKOUDA, C. et al. Microorganisms associated with Maari, a baobab seed fermented product. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 292-301, 2010.

PEINADO, R. A. et al. Gas chromatographic quantification of major volatile compounds and polyols in wine by direct injection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 21, p. 6389-6393, Oct. 2006.

PEREIRA, L. et al. MALDI-TOF ICMS: capability, potentiality and limits in the fast identification of *Trichophyton Rubrum* from clinical cases occurrence in Portuguese health centres. In: EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES, 20., 2010, Vienna. **Proceedings...** Vienna: ECCMID, 2010. p. 1795.

PINTADO, M. E. et al. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food science and Technology**, Washington, v. 31, p. 15-26, Jan. 1996.

PLESSAS, S. et al. Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 105, p. 187-194, Nov. 2007.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Application of gas chromatography olfactometry 32 (GCeO) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages e a review. **Food Chemistry**, Oxford, v. 107, p. 449-463, Aug. 2008.

PUERARI, C.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, Barking, v. 48, n. 2, p. 634-640, 2012.

RABAL, H. J.; BRAGA, R. A. **Dynamic laser speckle and applications**. Boca Raton: CRC, 2008. v. 1, 282 p.

REMIZE, F.; SABLAYROLLES, J. M.; DEQUIN, S. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 371-378, 2000.

RIBEREAU-GAYON, P. et al. **Handbook of enology**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley, 2006. v. 1, 797 p.

RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono- $\delta$ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, Cambridge, v. 16, p. 33-39, Oct. 2006.

RIZZON, L. A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã Gala, Golden Delicious e Fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 750-756, dez. 2005.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, Cambridge, v. 32, p. 1124-1127, Jan. 2005.

RODRIGUES, K. L. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v. 25, p. 404-408, Nov. 2004.

SALOFF-COASTE, C. Kefir. **Danone Newslett**, Washington, v. 11, p. 1-11, Jan. 1996.

SANTOS, A. et al. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, Washington, v. 26, p. 434-437, Apr. 2003.

SANTOS, C. et al. Filamentous fungal characterisations by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 108, n. 2, p. 375-385, Feb. 2010.

SANTOS, C. C. A. do A. et al. Co-culture fermentation of peanut-soy milk for the development of a novel functional beverage. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 186, p. 32-41, Sept. 2014.

SCHLEGEL, H. G. **General microbiology**. 7<sup>th</sup> ed. Cambridge: Cambridge University, 1990. 214 p.

SCHWAN, R. F. et al. Microbiology and physiology of cachaça (aguardente) fermentations. **Antonie van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 79, n. 1, p. 89-96, Jan. 2001.

SENG, P.; DRANCOURT, M.; GOURIET, F. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 49, n. 4, p. 543-551, Aug. 2009.

SHARMA, H. K. et al. Effect of pretreatment conditions on physicochemical parameters of carrot juice. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 9, n. 44, p. 1-9, 2009.

SHISHEHBOR, F. et al. Apple cider vinegar attenuates lipid profile in normal and diabetic rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Lahore, v. 11, n. 23, p. 2634-2638, Dec. 2008.

SILVA, K. R. et al. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 152, n. 2, p. 316-325, Feb. 2009.

SIMOVA, E. et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Hampshire, v. 28, n. 1, p. 1-6, Jan. 2002.

SINTSOVA, N. V. Changes in intragastric proteolytic activity in patients with obesity and possibilities of its dietetic correction. **Ter Arkh Journal**, Washington, v. 63, n. 2, p. 47-51, Oct. 1991.

SPINOSA, W. A. **Utilização do amido da quirera de arroz na produção de vinagre**. 1996. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996.

SWIEGERS, J. H. et al. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, Adelaide, v. 11, n. 2, p. 139-173, July 2005.

TADA, S. et al. Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefirianofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 103, n. 6, p. 557-562, June 2007.

TESFAYE, W. et al. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 13, n. 1, p. 12-21, Jan. 2002.

THACKER, E. **O vinagre**. São Paulo: Pacific Post, 2000. 90 p.

URDANETA, E. et al. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, London, v. 27, p. 653-658, Jan. 2007.

VASS, A.; SZAKALY, S.; SCHIMIDT, P. Experimental study of the nutritional biological characters of fermented milks. **Acta Medical**, Berlin, v. 41, n. 2/3, p. 157-161, Nov. 1984.

VINDEROLA, C. G. et al. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 72, p. 195-202, Jan. 2004.

VOLSCHENKLA, H. van; VUUREN, H. J. J. M.; VILJOEN-BLOOM, M. Malic acid in wine: origin, function and metabolism during vinification. **South African Journal of Enology and Viticulture**, Stellenbosch, v. 27, n. 2, p. 123-136, 2006.

WANG, S. Y. et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 274-285, Dec. 2012.

WITTHUHN, R. C. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, Washington, v. 22, p. 337-344, Aug. 2004.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, Cambridge, v. 15, p. 383-389, Dec. 2004a.

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**, Cambridge, v. 57, n. 1, p. 33-37, Mar. 2004b.

WOSIACKI, G.; PHOLMAN, B. C.; NOGUEIRA P. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 347-352, 2004.

YALCIN, S. K.; OZBAS, Y. Z. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 325-332, 2008.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal**, London, v. 57, n. 3, p. 508-514, July 1954.

YUKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. **Swiss Society of Food Science and Technology**, Lausanne, v. 37, n. 4, p. 663-667, Feb. 2004.

ZDUNEK, A. et al. The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: a review. **Optics and Lasers in Engineering**, London, v. 52, p. 276-285, Jan. 2014.

ZILIOLI, E.; YOKOYA, F.; SPINOSA, W. A. **Composição química e propriedades funcionais no processamento de vinagres**. 2011. 98 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

## ANEXOS

## ANEXO A - Tabela com isolados depositados em cultura

Código CCMA	Espécie	Similaridade	Número de acesso do Gen Bank
CCMA0489, CCMA0509, CCMA0528, CCMA0529	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Identificação por MALDI-TOF (ANEXO B)	_____
CCMA0490, CCMA0492 CCMA0495, CCMA0499, CCMA0500, CCMA 0502, CCMA0504, CCMA0505, CCMA0506, CCMA0507, CCMA 0511, CCMA0512, CCMA0513, CCMA 0514, CCMA 0515, CCMA0516, CCMA0517, CCMA0518, CCMA0519, CCMA0520, CCMA0521, CCMA0522, CCMA0527, CCMA0530, CCMA0531, CCMA0532,	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Identificação por MALDI-TOF (ANEXO B)	_____

## “ANEXO A, continuação”

Código CCMA	Espécie	Similaridade	Número de acesso Gen Bank
CCMA0533, CCMA0534, CCMA0535, CCMA0536, CCMA0537, CCMA0538, CCMA0539	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Identificação por MALDI- TOF	_____
CCMA0491 CCMA0493 CCMA0494 CCMA0496 CCMA0497 CCMA0498 CCMA0501 CCMA0503 CCMA0508 CCMA0510 CCMA0523 CCMA0524 CCMA0525 CCMA0526	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Identificação por MALDI- TOF	_____
CCMA0540	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	98%	AB680037.1
CCMA0541	<i>Acetobacter syzygii</i>	98%	JN411497.1



## ANEXO C - Parecer do CEP aprovado para análise sensorial do vinagre de maçã kefir

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
LAVRAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Nova tecnologia de elaboração de vinagre de maçã (*Malus spp.*) empregando os grãos de kefir como inoculo do processo fermentativo e avaliação da atividade metabólica dos grãos de kefir por transmissão da luz laser (BioSpeckle)

**Pesquisador:** Roberta Oliveira Viana

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 41225214.5.0000.5148

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Lavras

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.054.963

**Data da Relatoria:** 24/04/2015

**Apresentação do Projeto:**

Apresentado e avaliado anteriormente.

**Objetivo da Pesquisa:**

Apresentado e avaliado anteriormente.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Apresentado e avaliado anteriormente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Apresentado e avaliado anteriormente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Apresentado e avaliado anteriormente.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não foram identificadas pendências éticas que comprometam a realização do presente trabalho.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

Endereço: Campus Universitário Cx Postal 3037

Bairro: PRP/COEP

CEP: 37.200-000

UF: MG

Município: LAVRAS

Telefone: (35)3829-5182

E-mail: coep@nintec.ufa.br

“ANEXO C, continuação”



Continuação do Parecer: 1.054.963

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

LAVRAS, 08 de Maio de 2015

---

**Assinado por:**  
**Joziana Muniz de Paiva Barçante**  
**(Coordenador)**