



**INSTITUTO
FEDERAL**
Rio de Janeiro

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

Campus Rio de Janeiro

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*

Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Cristiane Pereira Larosa

***Kefir* de leite de ovelha adoçado com diferentes açúcares: características físico-químicas, microbiológicas, atividade anticâncer e aceitação sensorial**

Rio de Janeiro

2020

Cristiane Pereira Larosa

***KEFIR* DE LEITE DE OVELHA ADOÇADO COM DIFERENTES AÇÚCARES:
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, ATIVIDADE
ANTICÂNCER E ACEITAÇÃO SENSORIAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – *Campus* Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz
Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Márcia Cristina da Silva

Rio de Janeiro

2020

Ficha catalográfica elaborada por
Sergio Pinheiro Rodrigues
CRB7 3684

L331k Larosa, Cristiane Pereira.

Kefir de leite de ovelha adoçado com diferentes açúcares: características físico-químicas, microbiológicas, atividade anticâncer e aceitação sensorial. / Cristiane Pereira Larosa. – Rio de Janeiro, RJ, 2020.
137 f.: il.; 21 cm.

Dissertação (Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz

1. Leite de ovelha. 2. Kefir. 3. Compostos bioativos. I. Cruz, Adriano Gomes da. II. Título.

IFRJ/CMAR/CoBib

CDU 636/637(81)

Cristiane Pereira Larosa

**KEFIR DE LEITE DE OVELHA ADOÇADO COM DIFERENTES AÇÚCARES:
CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS, MICROBIOLÓGICAS, ATIVIDADE
ANTICÂNCER E ACEITAÇÃO SENSORIAL**

Dissertação apresentada ao Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – *Campus* Rio de Janeiro, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em _____ de dezembro de 2020.

Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (Orientador)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ

Prof.^a Dr.^a. Márcia Cristina da Silva (Orientadora)
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro – IFRJ

Prof. Dr. Celso Fasura Balthazar
Universidade Federal Fluminense – UFF

Prof. Dr. Jonas Toledo Guimarães
Universidade Federal Fluminense – UFF

Dedico este trabalho ao meu esposo João, ao meu filho Ítalo e à minha mãe Eunice, por me fortalecerem com tanto amor. Em memória da minha irmã Mara Claudia, que sempre foi minha grande incentivadora na vida, ofereço essa homenagem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela dádiva da vida e pela proteção.

Ao meu esposo João, meu porto seguro. Sem você não conseguiria superar tantos momentos difíceis. Obrigada por seu amor, paciência, compreensão e conselhos. Seu apoio foi fundamental.

Ao meu filho Ítalo, meu incentivador incondicional, companheiro das madrugadas e minha inspiração.

À minha mãe Eunice e aos meus irmãos Carla, Viviane, Sergio e Claudia (*in memoriam*). Vocês são meu alicerce.

Aos meus sobrinhos Luan, Larissa, Gustavo, Giselle, Mateus e Duda, e cunhados Marcelo, Rosangela e José. Obrigada pela torcida.

À minha sogra Elisa e toda família Lanzillotti, pelo carinho e acolhimento.

Ao meu orientador Adriano Gomes, pela paciência, ensinamentos e por toda ajuda e participação neste estudo. Nada disto seria possível sem seu apoio.

Aos membros da banca professores Márcia Cristina, Celso Balthazar e Jonas Guimarães, pela disponibilidade e contribuição.

Aos coordenadores do curso de mestrado Adriano Gomes e Leonardo Costa, pela assistência, ao corpo docente, pelos ensinamentos e aos servidores Andréa e Vitor da SPG pelo suporte administrativo.

Aos professores Celso Sant'Anna, Erick Esmerino, Felipe Oliveira, Janaína Nascimento, Leila Pontes, Renata Raices, aos alunos de iniciação científica Ana Carolina Ramos, Luciano Fernandes e Mateus Alves; aos bolsistas do laboratório de Alimentos, pela ajuda com as análises.

Aos amigos Stefano, Dani Brito, Dalmo, Fabíola, Bispo, Shirley, Janine, Néia, Dani Avellar, Natália, Flávia, Carol, Viviane, Jack, Virgínia, Albê, Alessandra, Lilian, e ao grupo Amigas da ETFQ. Obrigada pela compreensão com minhas ausências.

Aos colegas de turma, em especial Bruna Chamusca, Flávia Frias, Gustavo Anciens e Roberto Pires, pela companhia, ajuda e gargalhadas.

Aos amigos de trabalho Antonio, Andre e Vinícius, por toda contribuição durante este percurso.

Ao Diretor Geral do IFRJ *campus* Rio de Janeiro Jefferson Amorim, pelo apoio e liberação para licença.

A todos que contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

Para ter algo que você nunca teve, é
preciso fazer algo que você nunca fez.

Chico Xavier

LAROSA, C. P. **Kefir de leite de ovelha adoçado com diferentes açúcares: características físico-químicas, microbiológicas, atividade anticâncer e aceitação sensorial**. 2020. 138 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de diferentes tipos de açúcares (sacarose, açúcar demerara, açúcar mascavo, frutose, açúcar de coco e mel) sobre a viabilidade microbiana, a atividade antagônica contra patógenos, as propriedades tecnológicas e funcionais, a aceitação sensorial e o perfil emocional do *kefir* de leite de ovelha. As amostras foram submetidas às análises físico-químicas (pH, ácido láctico, ácido acético, lactose, etanol, perfil de compostos voláteis, perfil de ácidos graxos com cálculo de índices de saúde), atividades funcionais de compostos bioativos (atividades antioxidante, inibidora da ECA, inibidora de α -amilase, inibidora de α -glucosidase), microbiológicas (atividade antagonista contra patógenos transmitidos por alimentos, contagens microbianas de *Lactococcus* ssp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* e Leveduras), análise de microestrutura por microscopia eletrônica de varredura, atividade anticâncer, análise sensorial e perfil emocional. O uso de açúcares não convencionais resultou em maior atividade antagônica contra patógenos transmitidos por alimentos, aumento na população de *Lactobacillus* (até 2,24 log UFC/mL) e na concentração de metabólitos, melhora no perfil de ácidos graxos com aumento de ácidos graxos poli-insaturados e aumento na funcionalidade dos produtos, que apresentaram maior atividade antioxidante (11,1 para 24,1%), maior inibição de α -amilase (18 para 37,4%) e ECA (27,5 para 37,6%), e maior atividade anticarcinogênica. O uso do açúcar demerara melhorou os índices de saúde, com menores índices aterogênicos e trombogênicos e ácidos graxos saturados hipercolesterolêmicos, enquanto o açúcar de coco teve maior efeito anticarcinogênico. 100 consumidores, sendo 55 mulheres e 45 homens, de idade de 18 a 64, avaliaram as diferentes formulações de *kefir* para determinar a aceitação sensorial (aparência, aroma, sabor, textura e aceitação global com escala hedônica de 9 pontos) e expressaram suas emoções (satisfeito, ativo, amoroso, calmo, confortável, enérgico, feliz, saudável, refrescante, enojado, preocupado e chateado com escala de intensidade de 5 pontos). O uso de diferentes açúcares não influenciou a intensidade das emoções "calmo, confortável, feliz ou enojado", e resultou em uma maior sensação de satisfação. O uso de açúcar demerara ou frutose não alterou a aceitação dos produtos ou a intensidade das emoções. O uso de açúcar mascavo diminuiu a aceitação (sabor, textura e aceitação global) e a intensidade de emoções "ativo, amoroso, enérgico, saudável e refrescante". O uso de açúcar de coco diminuiu a aceitação (aparência, aroma e sabor) e a intensidade de emoções "refrescante e chateado". O uso do mel melhorou a aceitação na aparência e no aroma, mas reduziu a intensidade das emoções "ativo, amoroso, enérgico e saudável". Com base nos dados sensoriais, recomenda-se o uso do açúcar demerara ou frutose como substituto da sacarose. Os resultados sugerem que a substituição da sacarose por diferentes tipos de açúcar pode melhorar as

propriedades funcionais e anticarcinogênicas do *kefir* e que o estudo das emoções pode ser utilizado como uma ferramenta adicional para a obtenção de dados relacionados à aceitação sensorial dos produtos.

Palavras-chave: Leite de ovelha. *Kefir*. Açúcar. Compostos bioativos. Aceitação sensorial.

LAROSA, C. P. **Sheep milk kefir sweetened with different sugars: physical-chemical, microbiological characteristics, anticancer activity and sensory acceptance.** 2020. 138 f. Dissertação. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2020.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of adding different types of sugar (sucrose, demerara sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar and honey) on microbial viability, an antagonistic activity against pathogens, technological and functional properties, sensory acceptance and emotional profile of sheep's milk *kefir*. The samples were subjected to physical-chemical analyses (pH, lactic acid, acetic acid, lactose, ethanol, volatile compounds profile, fatty acid profile with health index calculation), functional activities of bioactive compounds (antioxidant activities, ACE inhibitors α -amylase inhibitor, α -glucosidase inhibitor), microbiological (antagonistic activity against foodborne pathogens, microbial counts of *Lactococcus* ssp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* and Yeasts), analysis of microstructure by scanning electron microscopy, anticancer activity, sensory analysis and emotional profile. The use of unconventional sugars resulted in greater antagonistic activity against foodborne pathogens, an increase in the *Lactobacillus* population (up to 2.24 log UFC / mL) and in the concentration of metabolites, an improvement in the fatty acid profile with an increase in polyunsaturated fatty acids and increased functionality of the products, which showed greater antioxidant activity (11.1 to 24.1%), greater inhibition of α -amylase (18 to 37.4%) and ACE (27.5 to 37.6%), and greater anticarcinogenic activity. The use of demerara sugar improved health rates, with lower atherogenic and thrombogenic rates and hypercholesterolemic saturated fatty acids, while coconut sugar had a greater anticarcinogenic effect. 100 consumers, 55 women and 45 men, aged 18 to 64, evaluated the different *kefir* formulations to determine sensory acceptance (appearance, aroma, flavor, texture and overall impression with a 9-point hedonic scale) and expressed their emotions (satisfied, active, loving, calm, comfortable, energetic, happy, healthy, refreshing, disgusted, worried and upset with an intensity scale of 5 points). The use of different sugars did not influence the intensity of "calm, comfortable, happy or disgusted" emotions, and resulted in a greater feeling of satisfaction. The use of demerara sugar or fructose did not alter the acceptance of the products or the intensity of emotions. The use of brown sugar decreased the acceptance (flavor, texture and global acceptance) and the intensity of "active, loving, energetic, healthy and refreshing" emotions. The use of coconut sugar decreased the acceptance (appearance, aroma and flavor) and the intensity of "refreshing and upset" emotions. The use of honey improved the acceptance in appearance and aroma, but reduced the intensity of the "active, loving, energetic and healthy" emotions. Based on sensory data, it is recommended to use demerara sugar or fructose as a substitute for sucrose. The results suggest that substituting sucrose for different types of sugar can improve the functional and

anticarcinogenic properties of *kefir* and that the study of emotions can be used as an additional tool to obtain data related to the sensory acceptance of products.

Keywords: Sheep's milk. *Kefir*. Sugar. Bioactive compounds. Sensory acceptance.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição centesimal, teores de minerais e vitaminas de leite de vaca, de cabra e de ovelha	26
Quadro 2 - Perfil de ácidos graxos de leites de diferentes espécies	28
Quadro 3 - Características físicas, químicas e microbiológicas de leite pasteurizado comum	34
Quadro 4 - Padrões microbiológicos atuais para leite pasteurizado e leite fermentado	35
Quadro 5 - Requisitos físico-químicos, contagem de microrganismos específicos e critérios microbiológicos do <i>kefir</i>	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição dos rebanhos ovinos, Regiões do Brasil, 2017 21
- Figura 2 - Quantidade vendida de leite de ovelha nos estabelecimentos agropecuários (mil litros), 2017 22
- Figura 3 - Aparência física de grãos de *kefir* frescos 39
- Figura 4 - Taxas de prevalência de obesidade históricas, atuais e projetadas (IMC \geq 30 kg/m²) para os Estados Unidos, Inglaterra e País de Gales, Ilhas Maurício, Austrália e Brasil entre 1960 e 2025 59
- Figure 1 - Sensory acceptance (appearance, aroma, flavor, texture and overall liking) of the Kefir fermented milk formulations. Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=100 consumers). ^{ac}Similar lowercase letters do not represent statistical difference (p > 0.05) for the same sensory attribute. SUC, RAW, BSG, FRU, COC, HON= sucrose, raw sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar, honey 67
- Figure 2 - Representation of the samples and the attributes in bidimensional map of the principal component analysis (PCA) from emotion questionnaire. SUC, RAW, BSG, FRU, COC, HON= sucrose, raw sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar, honey 69
- Figure 1 - Viable count (log CFU/mL) in sheep Kefir formulations (n=6). Formulations: KI (sucrose), KII (demerara sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey). Different letters in the same group indicate significant differences between samples (p<0.05) 85
- Figure 2 - Scanning electron microscopy (SEM) of the sheep Kefir formulations. Green arrow – *Lactococcus*; Red arrow – *Leuconostoc*; Purple arrow - *Lactobacillus*. Formulations: KI (sucrose), KII (raw sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey) 87
- Figure 3 - Microbial metabolites (Lactic acid, acetic acid, lactose, ethanol) and bioactive compounds (DPPH, ACE, α -amilase e α -glucosidase inhibitory

activities, and pH of the sheep Kefir formulations (n=6). Formulations: KI (sucrose), KII (raw sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey) 93

Figure 4 - Effects of sheep milk Kefir on cancer cell viability. HT29 (A), CACO-2 (B), DU145 (C), PCa (D) and HepG2 (E). Cancer cell lineages were maintained for 48 h in medium alone (Ctr) or treated with distinct Kefir extracts, being KI (sucrose), KII (demerara sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey). (*) P<0.05; (**) P<0.005; (***) P<0.001 102

Figure 5 Supplementary - Sensory maps (A), confidence ellipses (B) and hierarchical cluster analysis (HCA) (C) of the Kefir formulations. KI (sucrose), KII (demerara sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey) 104

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Emotions evoked by consumers considering <i>Kefir</i> fermented milks with different sugars	68
Table 1 - Volatile compounds profile of the <i>Kefir</i> formulations	95
Table 2 - Fatty acid profile of the <i>Kefir</i> formulations	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
AGCL	Ácidos graxos de cadeia longa
AGCM	Ácidos graxos de cadeia média
AGL	Ácidos graxos livres
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAA	Bactérias de ácido acético
BAL	Bactérias do ácido lático
CC	Circunferência da cintura
CCS	Contagem das células somáticas
CLA	Isômeros de ácido linoleico conjugado
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
ECA	Enzima conversora da angiotensina
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura)
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IMC	Índice de massa corporal
IN	Instrução normativa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SOD	Superóxido dismutase
STEC	<i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
TAG	Triacilglicerol
UFC	Unidade formadora de colônia
WHO	World Health Organization (Organização mundial da saúde)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	CENÁRIO DO MERCADO DE OVINOS	21
2.2	LEITE DE OVELHA	23
2.2.1	Introdução	23
2.2.2	Propriedades físico-químicas e nutricionais	23
2.2.2.1	Proteínas	24
2.2.2.2	Gorduras	25
2.2.2.3	Micronutrientes	28
2.2.2.4	Lactose	29
2.2.3	Propriedades funcionais	30
2.2.4	Qualidade microbiológica	31
2.2.5	Perfil sensorial	35
2.3	<i>KEFIR</i>	36
2.4	PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO <i>KEFIR</i>	41
2.4.1	Propriedades antimutagênica e anticarcinogênica	42
2.4.2	Efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicemiante	44
2.4.3	Efeito anti-hipertensivo	46
2.4.4	Propriedade antimicrobiana	47
2.4.5	Efeito anti-inflamatório, modulação da microbiota e imunomodulação	51

2.4.6	Efeito na intolerância à lactose	54
2.4.7	Efeito antioxidante	55
2.4.8	Prevenção de osteoporose	57
2.4.9	Propriedade ansiolítica	58
2.4.10	Efeito na obesidade e propriedade nutracêutica	58
2.4.11	Efeitos na desordem gastrointestinal	60
2.5	<i>KEFIR</i> COM LEITE DE OVELHA	61
3.	JUSTIFICATIVA	62
4.	OBJETIVOS	63
4.1	OBJETIVO GERAL	63
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	63
5.	CAPÍTULO 1 - SHEEP MILK KEFIR SWEETENED WITH DIFFERENT SUGARS: SENSORY ACCEPTANCE AND CONSUMER EMOTION PROFILING	64
6.	CAPÍTULO 2 - CAN SUCROSE-SUBSTITUTES INCREASE THE ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENS AND IMPROVE THE TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF SHEEP MILK KEFIR?	71
7.	CONCLUSÃO	114
8.	REFERÊNCIAS	115
9.	ANEXOS	134

1. INTRODUÇÃO

O leite e seus derivados estão entre os produtos alimentícios mais consumidos pela população brasileira, sendo fontes de vitaminas, proteínas e minerais. Além de ser um alimento acessível a todas as classes, possui excelente reputação nutricional com alto valor biológico. O consumo moderado desses produtos impacta positivamente a saúde prevenindo doenças como diabetes, problemas cardíacos e alguns tipos de câncer (KLIEM, GIVENS, 2011). É alta tendência de crescimento do mercado de lácteos nos próximos anos, considerado importante fatia do setor global de alimentos (FAO, 2019).

O leite ovino apresenta flavor característico de sua composição e maiores quantidades de proteínas, gorduras e lactose, assim como micronutrientes (vitaminas e minerais), quando comparado ao leite bovino. Possui cor branca, odor suave e sabor adocicado (PELLEGRINI, 2012; BALTHAZAR *et al.*, 2017). É fonte ideal para fabricação de produtos lácteos por possuir altos teores de sólidos totais, o que dispensa uso de espessantes. Esses produtos também têm sido pesquisados em dietoterapia para pessoas com intolerância à lactose por apresentar pouca (iogurte) ou nenhuma lactose (queijos duros), o que favorece a absorção dos nutrientes (WENDORFF, HAENLEIN, 2017).

A sazonalidade do mercado de leite ovino e a pequena produtividade de leite por animal resultam em produtos com altos preços. São justificados pela produção irregular, influenciada pelo clima do país, dieta do animal e período de lactação, o que impacta a composição do leite e rendimento da ordenha (WENDORFF, HAENLEIN, 2017). Os derivados lácteos, como iogurtes, queijos e leites fermentados são considerados alimentos funcionais, sendo capazes de promover benefícios à saúde, além de preservar o alimento e melhorar seu valor nutritivo (ÖZER, KIRMACI, 2010).

De acordo com a Federação das Indústrias do Estado de São Paulo, que pesquisou sobre perfil de consumo de alimentos no Brasil, 21% dos entrevistados buscam por qualidade de vida, priorizando alimentos que tragam benefícios

adicionais à saúde e acreditam totalmente (33%) ou parcialmente (51%) que alimentos funcionais podem trazer melhoras à saúde (FIESP/IBOPE, 2010).

Kefir é produzido por fermentação mista láctica e alcoólica e tem consistência semelhante ao iogurte. Trata-se de um leite acidificado feito a partir do leite pasteurizado padronizado, em que a fermentação se realiza com grãos de *Kefir* (PLESSAS *et al.*, 2017). Esses grãos possuem atividade metabólica simbiótica, composta por bactérias ácido lácticas (BAL), bactérias ácido acéticas e leveduras, envoltos por matriz polissacarídica proteica, denominada *kefiran* (COSTA, ROSA, 2016; ISMAIEL *et al.*, 2011). A composição nutricional depende da origem dos grãos e dos substratos utilizados no preparo do *kefir* (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011).

Os componentes bioativos gerados na fermentação e os microrganismos probióticos são argumentos acerca da promoção à saúde atribuídas ao *kefir*. A definição de probióticos consiste em “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (HILL *et al.*, 2014). Esses atributos têm conquistado muitos consumidores atentos ao bem-estar, o que chama a atenção das indústrias de alimentos (CASSANEGO *et al.*, 2015; RIBEIRO, 2015).

O número de pesquisas sobre probióticos e alimentos funcionais vem aumentando em razão da necessidade de investigar os efeitos de alegação de promoção da saúde. Desta forma, esse estudo buscou desenvolver um *kefir* feito com leite de ovelha desnatado utilizando diferentes fontes de açúcar, assim como averiguar atividades funcionais dos compostos bioativos, atividade anticâncer e verificar sua aceitação sensorial. Sendo assim, busca trazer importantes contribuições para a utilização do *kefir* de leite de ovelha, incentivando seu consumo como alimento funcional e caracterizando-o como um alimento inovador no mercado.

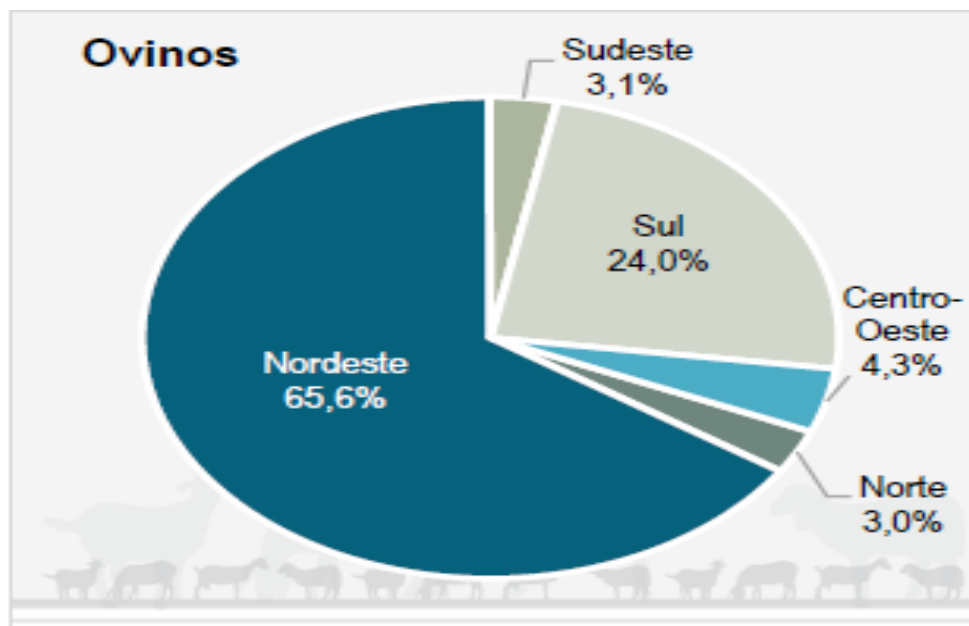
2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CENÁRIO DO MERCADO DE OVINOS

A divisão da produção mundial de leite de ovelha em 2019 foi composta por: Ásia 46,9%, Europa 29,5%, África 22,8% e Américas 0,9%. O maior produtor mundial de leite de ovelha é a Turquia, seguida da China e Grécia (FAO, 2019). O mercado de produção desse leite corresponde a 1,3% da produção mundial dentre as principais espécies leiteiras (ROHENKOHL *et al.*, 2011). Em 2012, a produção mundial correspondeu a 10 milhões de toneladas (CRUZ *et al.*, 2016)

No Brasil, o efetivo de ovinos registrado em 2017 foi 13,77 milhões de cabeças, dos quais 65,6% estão na Região Nordeste e 24,0% na Região Sul. Sendo que os estados da Bahia e Rio Grande do Sul: abrigam 40,0% do efetivo nacional (Figura 1).

Figura 1 – Distribuição dos rebanhos ovinos, Regiões do Brasil, 2017

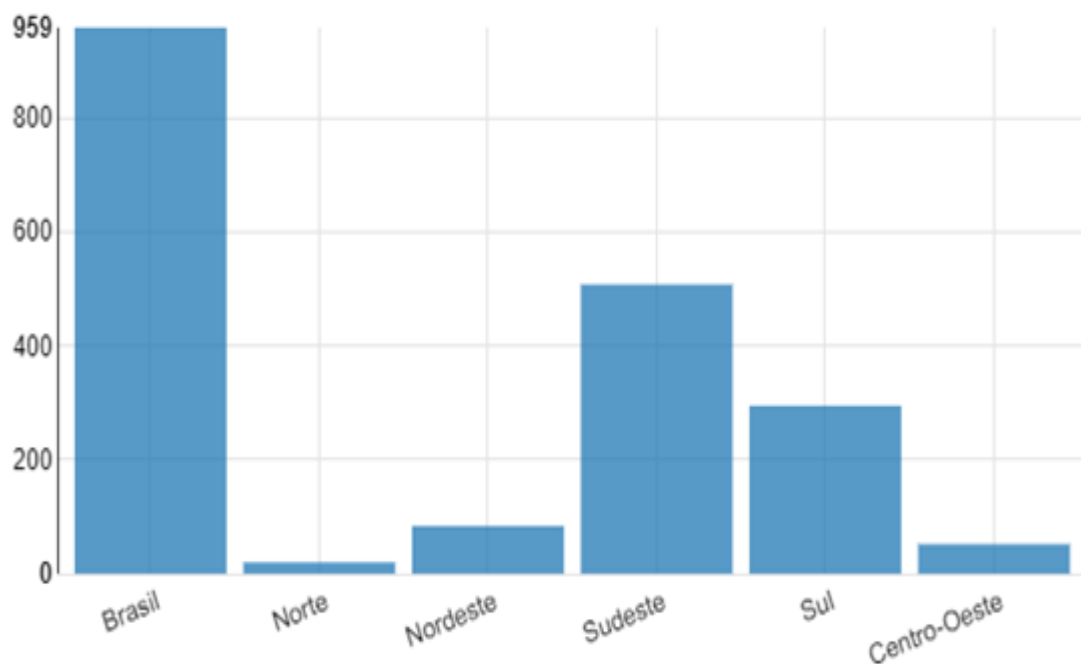


Fonte – IBGE, 2017.

A produção de leite ovino encontra-se basicamente em Minas Gerais com 455 mil litros e Santa Catarina com 258 mil litros (IBGE, 2017; EMBRAPA, 2018) (Figura

2). Os fatores que influenciam na qualidade do leite são: raça, idade, dieta, estação, temperatura, fatores genéticos e período de lactação. A produção do leite é sazonal, entre os meses de março a setembro, sendo de apenas 1Kg/dia por animal, com lactação de 150 dias aproximadamente. As raças mais utilizadas para produção de leite no país são Lacaune, Bergamácia e Milchshaf (CRUZ *et al.*, 2016).

Figura 2 - Quantidade vendida de leite de ovelha nos estabelecimentos agropecuários (mil litros), 2017



Fonte – IBGE, 2017.

O valor médio por litro de leite ovino comercializado em 2017 no país foi R\$ 2,74 e correspondeu a R\$ 2.813.000,00 injetados na economia (IBGE, 2017). Os valores de venda desses produtos derivados são bastante altos, porém possuem público apreciador que está disposto a pagar pelo valor agregado aos mesmos (CRUZ *et al.*, 2016).

2.2 LEITE DE OVELHA

2.2.1 Introdução

Quando a espécie humana deixou de ser nômade para fixar seu local de moradia, houve o desenvolvimento de práticas agrícolas e domesticação de animais. No Oriente Médio, caprinos e ovinos passaram a serem utilizados para fornecer roupas, carne e leite por serem fortes, facilmente adaptáveis e de natureza social (BALTHAZAR *et al.*, 2017).

Segundo BRASIL (2011), o leite é definido como “o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas”. Quando trata de outros animais, é identificado pelo nome da espécie. É uma emulsão secretada pela glândula mamária, cuja composição muda de acordo com as espécies. É composto por água, proteínas, gordura, lactose, vitaminas e minerais (BALTHAZAR, 2015a; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b) (Quadro 1).

O leite mais consumido é o de origem bovina, enquanto o leite ovino ocupa o quarto lugar no consumo mundial. O leite de ovelha fluido praticamente não é consumido, pois quase todo leite produzido é utilizado para fabricação de queijos finos e apenas uma parte pequena é empregada na fabricação de iogurtes (CRUZ *et al.*, 2016). O perfil nutricional e rendimento superior às outras espécies fazem do leite ovino uma excelente matriz para produtos diferenciados (BALTHAZAR *et al.*, 2019b; MILANI, WENDORF, 2011; PARK *et al.*, 2007, 2017).

2.2.2 Propriedades físico-químicas e nutricionais

A composição do leite é afetada por fatores como raça, idade, dieta, estação, temperatura, fatores genéticos e período de lactação. O leite de ovelha difere dos leites de vaca e cabra, pois possui maior concentração de nutrientes, principalmente proteínas, gorduras e micronutrientes. Isso o torna excelente matriz para produção de queijo e de outros derivados (BALTHAZAR *et al.*, 2015b, 2016a, 2018a, 2019a; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; CRUZ *et al.*, 2017a). O beneficiamento do queijo

apresenta bom rendimento, sendo necessário cerca de 5 litros de leite para cada quilo, com alta mineralização das micelas e sem adição de cloreto de cálcio (ROHENKOHL *et al.*, 2011; BALTHAZAR *et al.*, 2019a). Já na produção de iogurtes, não é necessário acrescentar sólidos espessantes para aumentar a consistência, tem força de gel alta, sinérese¹ mínima e dispensa o uso de espessantes devido ao seu alto conteúdo de sólidos (BALTHAZAR *et al.*, 2017; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; WENDORFF, 2011).

De modo geral, o leite de ovelha possui o dobro de gordura e 40% mais proteína que o leite de vaca ou de cabra. Por possuir coloração mais branca e maior valor nutricional é utilizado para produção de queijos diferenciados para atender pessoas com maior poder aquisitivo. Compreender a composição do leite de ovelha permite processar o mesmo para produzir produtos de alto valor agregado e expandir a indústria de ovinos leiteiros.

2.2.2.1 Proteínas

A porção proteica confere alto valor biológico e tecnológico e é constituída por três grupos de proteínas: insolúveis (coaguláveis), solúveis (do soro) e secundárias.

As proteínas insolúveis são as caseínas e compreendem cerca de 80% (4,2 a 5,2 g 100 g⁻¹) do total de proteínas. São compostas por quatro frações: α_{S1} -caseína (6,7%), α_{S2} -caseína (22,8%), β -caseína (61,6%) e κ -caseína (8,9%) (Quadro 1). Apresentam-se ligadas ao fosfato de cálcio, formando as micelas em suspensão com diâmetro aproximado de 190 nm. A proporção de caseína no leite é diferente entre os ruminantes, assim como grau de hidratação, tamanho e mineralização das micelas. No leite ovino, as micelas são menores, menos hidratadas e mais mineralizadas, ricas em cálcio e com alto polimorfismo quando comparadas às do leite de vaca (BALTHAZAR, 2015a; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b, 2017; PARK *et al.*, 2007, 2017).

¹ Sinérese consiste na expulsão de água a partir da estrutura do gel causada por um aumento de associações moleculares entre as cadeias de amido, em particular, a retrogradação da amilose (MORRIS, 1990).

A β -caseína mantém sua estabilidade em armazenamento frio, o que não prejudica a coagulação do coalho e a firmeza do gel, produzindo uma coalhada firme. As caseínas α_{S1} e α_{S2} são similares em 99% com as de cabra, porém são diferentes das caseínas do leite de vaca em suas sequências de aminoácidos, o que pode promover menor grau de alergia (BALTHAZAR *et al.*, 2017, 2018a; SELVAGGI *et al.*, 2014). Há cinco variantes polimórficas da caseína α_{S1} e duas da α_{S2} . A β -caseína apresenta polimorfismo não genético devido a graus variados de fosforilação. Já a κ -caseína tem polimorfismos não genéticos por graus variados de glicosilação e fosforilação (PARK *et al.*, 2007, 2017).

As proteínas solúveis são as frações proteicas do soro e compreendem o segundo grupo de proteínas (1,02 a 1,3 g 100 g⁻¹). São divididas em: β -lactoglobulina, α -lactalbumina, e albumina sérica. Continuam solúveis no soro após a precipitação da caseína a pH 4,6, são sensíveis ao aquecimento e cerca de 15% são desnaturadas na pasteurização a 65 °C por 30 minutos. Estão relacionadas à melhora e estabilidade da espuma, e força do gel, são utilizadas na fabricação da ricota (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2007).

As proteínas secundárias são as proteose-peptonas, albumina sérica, lactoferrina e imunoglobulinas. Encontram-se em baixas concentrações e não interferem tecnologicamente (CRUZ *et al.*, 2016).

2.2.2.2 Gorduras

A gordura é responsável por armazenar e permitir o transporte dos triacilgliceróis (TAG), pelo sabor dos alimentos e atua na textura e consistência. Apresenta composição 98% de triglicerídeos e 2% de fosfolipídios, vitaminas lipossolúveis, esteróis e traços de ácidos graxos livres (CRUZ *et al.*, 2016; SANTOS, 2018).

Quadro 1 - Composição centesimal, teores de minerais e vitaminas de leite de vaca, de cabra e de ovelha

Parâmetro	Leite de Vaca	Leite de Cabra	Leite de Ovelha
Composição Centesimal			
Umidade (g 100 g ⁻¹)	87,9 ± 0,5	87,6 ± 0,7	82,9 ± 0,7
Gordura (g 100 g ⁻¹)	3,3 ± 0,2	3,8 ± 0,1	5,9 ± 0,1
Cinzas (g 100 g ⁻¹)	0,7 ± 0,0	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Lactose (g 100 g ⁻¹)	4,7 ± 0,4	4,1 ± 0,4	4,8 ± 0,4
Proteína (g 100 g ⁻¹)	3,4 ± 0,1	3,7 ± 0,1	5,5 ± 1,1
Caseína (g 100 g ⁻¹)	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	4,7 ± 0,5
αS1-caseína (%)	39,7	5,6	6,7
αS2-caseína (%)	10,3	19,2	22,8
β-Caseína (%)	32,7	54,8	61,6
κ-Caseína (%)	11,6	20,4	8,9
Minerais			
Cálcio (mg 100 g ⁻¹)	112,0 ± 14,5	130 ± 4,0	197,5 ± 2,5
Ferro (mg 100 g ⁻¹)	0,1 ± 0,1	0,06 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Magnésio (mg 100 g ⁻¹)	11,0 ± 0,5	14,5 ± 1,5	19,5 ± 3,0
Fósforo (mg 100 g ⁻¹)	91,0 ± 5,5	109 ± 12,0	141,0 ± 1,7
Potássio (mg 100 g ⁻¹)	145,0 ± 11,5	185,5 ± 4,5	138,0 ± 2,0
Sódio (mg 100 g ⁻¹)	42,0 ± 6,5	39,5 ± 1,5	39,0 ± 7,0
Zinco (mg 100 g ⁻¹)	0,4 ± 0,0	0,43 ± 0,1	0,6 ± 0,1
Cobre (mg 100 g ⁻¹)	Vestígio	0,04 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Selênio (μg 100 g ⁻¹)	1,8 ± 1,3	1,665 ± 0,4	1,7 ± 1,0
Manganês (μg 100 g ⁻¹)	6,0 ± 0,0	8,0 ± 0,0	7,15 ± 1,8
Vitaminas			
Retinol (μg 100 g ⁻¹)	35,0 ± 8,0	0,04 ± 0,0	64,0 ± 19,5
Carotenoides (μg 100 g ⁻¹)	16,0 ± 8,0	Vestígio	Vestígio
Vitamina A (μgRE 100 g ⁻¹)	37,0 ± 8,0	54,32 ± 0,0	64,0 ± 5,5
Vitamina E (mg 100 g ⁻¹)	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,0	0,11 ± 0,01
Tiamina (mg 100 g ⁻¹)	0,04 ± 0,01	0,059 ± 0,0	0,07 ± 0,01
Riboflavina (mg 100 g ⁻¹)	0,2 ± 0,01	0,175 ± 0,0	0,3 ± 0,02
Niacina (mg 100 g ⁻¹)	0,13 ± 0,05	0,235 ± 0,0	0,41 ± 0,05
Ácido pantotênico (mg 100g ⁻¹)	0,43 ± 0,12	0,31 ± 0,0	0,43 ± 0,02

Vitamina B ₆ (mg 100 g ⁻¹)	0,04 ± 0,01	0,048 ± 0,0	0,07 ± 0,01
Folato (µg 100 g ⁻¹)	8,5 ± 1,5	1,0 ± 0,0	6,0 ± 0,06
Biotina (µg 100 g ⁻¹)	2,0 ± 0,5	1,75 ± 0,3	2,5 ± 0,0
Vitamina B ₁₂ (µg 100 g ⁻¹)	0,5 ± 0,3	0,065 ± 0,0	0,66 ± 0,05
Vitamina C (mg 100 g ⁻¹)	1,0 ± 0,5	1,295 ± 0,0	4,6 ± 0,4
Vitamina D (µg 100g ⁻¹)	0,2 ± 0,1	0,15 ± 0,1	0,2 ± 0,0

Fonte – BALTHAZAR *et al.*, 2017.

O leite ovino possui glóbulos de gordura com diâmetro médio de 3,5 µm, sendo menores que os de leite de vaca e mais bem dispersos, o que confere maior consistência, favorece sua digestão e congelamento sem que haja separação por até um ano abaixo de – 20 °C e sem perder a estabilidade. Esses pequenos glóbulos proporcionam sabor e aroma suaves (BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; MILANI, WENDORFF, 2011; WENDORFF, 2011; PARK *et al.*, 2007). A gordura não possui carotenoides, o que confere coloração branca. O perfil de triglicerídeos do leite de ovelha é parecido com o leite de vaca, porém a maior porcentagem no leite de ovelha são os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e média (AGCM) até dez átomos de carbono, que são facilmente quebrados para obtenção de energia e não incidem sobre o colesterol. Eles são hidrolisados por lipases a partir dos TAGs, se ligam às albuminas e são transferidos do intestino para o fígado pela via porta-hepática, onde são oxidados e podem ser utilizados como fonte energética (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016; RAYNAL-LJUTOVAC *et al.*, 2008; SANTOS, 2018; WENDORFF, 2011).

O leite de ovelha possui aproximadamente o dobro de gordura do leite de vaca, com cerca de 65-75% de ácidos graxos saturados e 30-34% de ácidos graxos insaturados (com predominância do ácido oleico) (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016) (Quadro 2). Esses ácidos graxos poli-insaturados, como os isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), ácido linoleico (*cis*-9, *cis*-12 C18:2) e ácido α -linolênico (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15 C18:3) são responsáveis por diminuir o colesterol LDL, prevenir doenças cardiovasculares, ter atividades antiobesidade, antioxidante, anticarcinogênica e efeito imunorregulador (BALTHAZAR *et al.*, 2016a, 2017; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; SANTOS, 2018).

Entre os lipídeos, as lipases possuem importância, pois produzem ácidos graxos livres (AGL) através da hidrólise dos triglicérides (BALTHAZAR, CRUZ, 2016b).

Quadro 2 - Perfil de ácidos graxos de leites de diferentes espécies

Ácido graxo	Porcentual em relação à gordura total			
	Vaca	Búfala	Cabra	Ovelha
Butírico (C4:0)	3	3	2	4
Capróico (C6:0)	2	1	3	3
Caprílico (C8:0)	1	1	3	3
Cáprico (C10:0)	3	1	9	6
Láurico (C12:0)	5	2	5	4
Mirístico (C14:0)	14	11	11	10
Palmítico (C16:0)	27	29	27	26
Esteárico (C18:0)	13	19	10	10
Palmitoleico (C16:1)	3	3	2	2
Oleico (C18:1)	28	28	26	30
Linoleico (C18:2)	1	2	2	2

Fonte - CRUZ *et al.*, 2016.

2.2.2.3 Micronutrientes

Micronutrientes são os minerais e as vitaminas, componentes importantes presentes em pequenas quantidades. O leite de ovelha é matriz rica em ambos os micronutrientes.

Os minerais estão presentes em concentrações de 1% no leite ovino. Possuem níveis iguais de ferro e níveis maiores de cálcio, magnésio, fósforo, zinco, cobre e manganês que o leite bovino. Desenvolvem papel no tamponamento e estabilidade e estabilidade térmica, onde o cálcio e o fósforo atuam na estrutura das micelas de caseínas. A elevada quantidade desses dois elementos pode ser explicada pela grande presença de proteínas (Quadro 1) e consequente necessidade de mineralização das micelas. A significativa biodisponibilidade do

cálcio ligado à caseína promove o crescimento e manutenção óssea facilitada (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016).

As concentrações de vitaminas são reguladas por processos fisiológicos e digestivos. O leite ovino possui teores vitamínicos mais altos que o leite de vaca e cabra, exceto para caroteno e folato, com concentrações mais baixas, e vitamina D e ácido pantotênico, com concentrações iguais. Níveis de vitaminas A, E, C, B₆, B₁₂, tiamina, riboflavina, niacina e biotina são maiores no leite ovino, quando comparado ao bovino. A vitamina A é encontrada como retinol e não como β -caroteno (pigmento amarelado precursor do retinol), o que confere cor branca ao leite (BALTHAZAR *et al.*, 2017; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; CRUZ *et al.*, 2016).

Comparativamente com o leite de vaca, os teores mais elevados desses micronutrientes fazem do leite de ovelha e seus derivados uma fonte nutricional muito importante

2.2.2.4 Lactose

Lactose é um glicídio presente em todos os leites, composta por uma molécula de glicose e uma de galactose ligadas por ligação glicosídica $\beta(1,4)$. Tem teores aproximados nos leites das espécies ovinas e bovinas e fornece cerca de 30% de calorias no consumo de leite integral (Quadro 1). Na síntese do leite, funciona como fator osmótico para atrair água para a glândula mamária. Ela age também na absorção de água, cálcio, magnésio e fósforo e na utilização da Vitamina D. Nos processos de obtenção de derivados lácteos, está envolvida na acidificação, pois sua fermentação dá origem ao ácido láctico (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2007).

A lactose é quebrada pela enzima intestinal lactase (β -galactosidase), que lisa a ligação glicosídica $\beta(1,4)$. Pessoas com intolerância à lactose têm deficiência ou ausência dessa enzima, o que acarreta a chegada de lactose ao intestino grosso. A flora local metaboliza a lactose, o que forma gases, altera a pressão osmótica e ocasiona sintomas de flatulência, dor abdominal e diarreia. Os produtos derivados do leite de ovelha têm pouca (iogurte) ou nenhuma lactose (queijos duros) e se

apresentam como opção de consumo para os intolerantes a esse glicídio (CRUZ *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2017; WENDORFF, HAENLEIN, 2017).

2.2.3 Propriedades funcionais

O leite de ovelha tem quase o dobro de proteínas do que leites de vaca e cabra, sendo fonte de aminoácidos importantes, além de apresentar alta digestibilidade e termoestabilidade. A hidrólise dessas proteínas pode liberar peptídeos bioativos com atividades biológicas específicas. Os efeitos promotores de saúde desses peptídeos incluem benefícios nos sistemas do corpo humano, trazendo atividades anti-hipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes e imunomoduladoras (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016).

Os ácidos linoleicos conjugados (CLA) correspondem a um grupo heterogêneo de isômeros (geométricos e posicionais) do ácido linoleico e possuem comprovada atividade lipolítica, de inibição do câncer, anti-inflamatórias e antioxidante. O leite de ovelha tem altos níveis de CLA e também é rico em ácido vacênico, seu precursor. Os ácidos graxos insaturados do leite de ovelha podem atuar na prevenção de doenças cardiovasculares (BALTHAZAR *et al.*, 2016a, 2017; KUHLE, 2016; REVILLA *et al.*, 2017; WANG, LEE, 2015; YUAN *et al.*, 2014).

Quanto aos minerais, o leite de ovelha possui teores de cálcio, magnésio, fósforo, zinco, cobre e manganês maiores que o leite de vaca e suas biodisponibilidades são aumentadas. Os níveis de cálcio e fósforo são particularmente muito altos, sendo importantes para a manutenção óssea. O cálcio também desempenha papel na regulação da adiposidade, controle e prevenção da hipertensão, atividade neural, contração muscular e coagulação do sangue. As vitaminas também possuem teores altos em sua maioria. Apenas caroteno e folato estão abaixo dos teores do leite de vaca. A baixa concentração de caroteno é devido à presença de retinol como forma da vitamina A nos ovinos (BALTHAZAR *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2016; PARK *et al.* 2017).

Já os açúcares causam efeito bifidogênico no intestino ao contribuir para a proliferação de bifidobactérias, que trazem benefícios à flora intestinal. O leite de ovelha também possui outros tipos de carboidratos, como glicopeptídeos, glicoproteínas e oligossacarídeos. Esses últimos têm efeitos benéficos à saúde

humana, como propriedades antigênicas e promoção de crescimento na flora intestinal (CRUZ *et al.*, 2016; PARK *et al.* 2017).

Os alimentos funcionais promovem a saúde e bem estar ao indivíduo através de mecanismos não previstos em nutrição convencional, como os probióticos e os prebióticos. Os derivados lácteos, como iogurtes, queijos e leites fermentados são considerados alimentos funcionais, sendo capazes de promover benefícios à saúde, além de preservar o alimento e melhorar seu valor nutritivo (GRANATO *et al.*, 2010; ÖZER, KIRMACI, 2010).

A definição de probióticos consiste em “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Bactérias do gênero *Lactobacillus*, e *Bifidobacterium* são as mais frequentes em produtos lácteos (FAO/OMS 2001; CHAMPAGNE; CRUZ; DAGA, 2018; HILL *et al.*, 2014).

Produtos fermentados como *kefir*, podem conter bactérias probióticas (efeito probiótico) e oligossacarídeos, que apresentam funcionalidade e promoção da saúde intestinal através da modulação da microbiota (efeito prebiótico), funcionando como um produto simbiótico. Um produto simbiótico atua na melhora da sobrevivência e implantação dos microrganismos probióticos no trato gastrointestinal do consumidor, estimulando seletivamente seu crescimento e/ou ativando seu metabolismo (PANDEY *et al.*, 2015).

2.2.4 Qualidade microbiológica

A composição do leite é afetada por diversos fatores, como genética, idade, estágio de lactação, manejo da ordenha, clima, nutrição e condições de sanidade. O alto valor nutritivo do leite e seu pH próximo à neutralidade o torna um meio perfeito para microrganismos se desenvolverem, sejam benéficos, patogênicos ou deteriorantes. O leite deve ser obtido em condições higiênicas rigorosas, receber resfriamento imediato e processamento térmico posterior (CRUZ *et al.*, 2019; WESCHENFELDER *et al.*, 2016).

Bactérias patogênicas podem colonizar as glândulas mamárias, causando danos ao tecido, o que reduz a produção de leite e altera sua composição. Além do

uso de boas práticas na ordenha, é preciso fazer a contagem das células somáticas (CCS) para verificar se há processo inflamatório, em especial a mastite (RAMOS, 2019). O aumento da CCS indica mastite, que reduz a síntese de lactose, a quantidade de sólidos totais, a porcentagem de gordura e sua composição (diminui AGCL e aumenta AGCC e AGL, dando sabor desagradável ao leite) e causa também o aumento de proteínas do soro e a diminuição da caseína, o que compromete a qualidade do leite (CRUZ *et al.*, 2016). A Instrução normativa nº 76/2018 determina o valor máximo de CCS em 400.00 CS.mL⁻¹ para leite bovino cru destinado à fabricação de leite tipo A. Como não há um parâmetro específico para CCS no leite de ovelha, utiliza-se o mesmo valor que o leite bovino (MERLIN JUNIOR *et al.*, 2015; BRASIL, 2018).

Os principais contaminantes do leite são as bactérias psicotróficas (multiplicam-se entre 0°C e 7°C), bactérias termodúricas (resistentes à pasteurização), bactérias formadoras de esporos (termo resistentes), alguns fungos filamentosos e leveduras, bactérias do grupo coliformes (associados à falta de higiene na produção) e outras Gram-negativas patogênicas (CRUZ *et al.*, 2019).

O leite normalmente possui em sua microbiota bactérias ácido-láticas (BAL) e membros da família *Enterobacteriaceae* (RAMOS, 2019). As BAL incluem espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus*, que são microrganismos que podem trazer benefícios à saúde e ter aplicação industrial em produtos fermentados. Porém, podem ocorrer contaminações, impactando a qualidade e causando surtos de intoxicação ou infecção de origem alimentar no leite e seus produtos derivados. Esses contaminantes são chamados de deterioradores e patogênicos (CRUZ *et al.*, 2019).

As bactérias psicotróficas fazem hidrólise das caseínas e da gordura do leite durante a refrigeração e como exemplo temos *Pseudomonas* spp., *Achromobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Chromobacterium* spp., *Flavobacterium* spp. Essas bactérias causam perda de rendimento por ação das proteases nas caseínas e odores desagradáveis por ação das lipases nos triglicerídeos. Já as termodúricas são bactérias que conseguem se multiplicar nos produtos pasteurizados e incluem *Micrococcus* spp., *Microbacterium* spp. As bactérias formadoras de esporos podem causar sabor amargo no leite e creme de leite pasteurizado (*Bacillus cereus*), deterioração do creme comercialmente estéril

(*Bacillus subtilis*), deterioração do leite evaporado (*Geobacillus stearothermophilus*) e estufamento tardio em queijo (*Clostridium tyrobutyricum*) (CRUZ *et al.*, 2019).

As leveduras podem deteriorar queijos, manteiga e leite condensado e alguns exemplos são *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candidum geotrichum* e outras. Já os fungos filamentosos causam degradação nos mesmos produtos que as leveduras e também em iogurte e podemos citar os gêneros *Geotrichum*, *Cladosporium*, *Torrubiella*, *Mucor* *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Os três últimos são gêneros toxigênicos, produtores de micotoxinas que são tóxicas ao ser humano (CRUZ *et al.*, 2019).

A família *Enterobacteriaceae* possui alguns gêneros patogênicos importantes, como *Enterobacter*, *Shigella* e *Salmonella*, assim como as espécies *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, fermentam a glicose e tem temperatura ótima de crescimento de 37 °C (PUBLIC HEALTH ENGLAND, 2015). Os coliformes são considerados indicadores sanitários e fermentam também a lactose com produção de gás carbônico, o que causa estufamento em queijos. Quase todos os membros do grupo coliforme são da família *Enterobacteriaceae* e os gêneros principais são *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Coliformes termotolerantes são coliformes que fermentam a lactose quando incubados a 45 °C e sua presença serve como indicador de contaminação de origem fecal, sendo provável que tenha patógenos no produto alimentar. No leite pasteurizado, a presença de coliformes pode indicar contaminação pós-pasteurização, de formação de biofilme ou falha no processo térmico (MARTIN *et al.*, 2016; RAMOS, 2019).

Já o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicou a Instrução Normativa nº 76 de 2018, que aprovou o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, com valores de referência para o leite a ser processado e comercializado. Alterações foram publicadas na Instrução Normativa nº 58 de 2019 (Quadro 3) (BRASIL, 2018 e 2019c).

A RDC 331/2019 e seu complemento, a IN 60/2019, ambas publicadas em 23 de dezembro de 2019, apresenta no grupo 9 de leite e derivados tem na categoria específica para leites pasteurizados como único parâmetro de critério microbiológico de higiene a contagem de enterobactérias (*Enterobacteriaceae*/mL), com limite de 10 unidades formadora de colônia por mL (UFC/mL). Já para a categoria de

Produtos lácteos fermentados, é necessário pesquisar *Salmonella*, *E. coli* e bolores e leveduras (Quadro 4) (BRASIL, 2019a,b).

Quadro 3 - Características físicas, químicas e microbiológicas de leite pasteurizado

Requisitos Físico-Químicos				
Item	Integral	Semidesnatado	Desnatado	
Gordura, (g/100g)	Mín. 3,0	0,6 a 2,9	Máx. 0,5	
Acidez, (g ácido Láctico/100mL)	0,14 a 0,18 para todas as variedades quanto ao teor de gordura			
Densidade Relativa 15/15 °C	1,028 a 1,034	1,028 a 1,036		
Testes Enzimáticos	Prova de fosfatase negativa Prova de peroxidase positiva			
Proteína Total Mínima (g/100g)	2,9			
Lactose Anidra Mínima (g/100g)	4,3			
Sólidos Não Gordurosos (g/100g)	Mínimo de 8,4			
Índice Crioscópico	-0,530 ^o H a -0,555 ^o H (equivalentes a -0,512°C e a -0,536°C)			
Critério Microbiológico				
Microrganismo	n	c	m	M
Enterobacteriaceae (UFC / mL)	5	0	10	-

Fonte – IN 76 de 2018 e IN 58/2019 (BRASIL, 2018 e 2019c).

Apesar da *E. coli* habitar o intestino humano e animal sem causar problemas, existem alguns tipos patogênicos. A *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC) está relacionada à doença alimentar, através da produção de citotoxinas Shiga 1 e 2. Alguns sorotipos podem crescer no leite até sob refrigeração (FARROKH *et al.*, 2013). STEC, *Klebsiella oxytoca* e *Enterobacter cloacae* foram encontradas em leite bovino cru recentemente (NTULI, NJAGE & BUYS, 2016). *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* entérica, além de contagens acima do tolerável de mesófilas totais e de coliformes, foram encontradas em leite de cabra na Paraíba (MONTE *et al.*, 2016).

Quadro 4 - Padrões microbiológicos atuais para leite pasteurizado e leite fermentado

Grupo de alimentos: Leite e derivados					
Categorias específicas	Microrganismo/ Toxina/Metabólito	n	c	m	M
Leites pasteurizados	<i>Enterobacteriaceae</i> /mL	5	0	10	-
Produtos lácteos fermentados	<i>Salmonella</i> /25mL	5	0	Aus	-
	<i>E. coli</i> /mL	5	2	3	10
	Bolores e Leveduras/mL	5	2	10 ²	10 ³
Alimentos prontos para o consumo	<i>Listeria monocytogenes</i> /25g ou mL	5	0	10 ²	-

Fonte - IN 60 de 2019 (BRASIL, 2019). Legenda: Aus – Ausência

2.2.5 Perfil sensorial

O leite de ovelha possui características sensoriais peculiares. É um líquido branco, de aroma e sabor doce e suave, com cremosidade em sua textura. Seu sabor distinto é devido ao buque exclusivo formado por ácidos graxos livres e ácidos graxos de cadeia média, que também se estende aos derivados. A dispersão da gordura em pequenos glóbulos dá cremosidade. A cor do leite vem dos carotenoides das plantas consumidas na dieta com rações e forragens e a cor branca homogênea do leite de ovelha se deve à ausência de β -caroteno, pois em vitamina A está presente nessa matriz láctea em forma de retinol. As quantidades de proteínas e altos teores de sólidos são responsáveis pelas propriedades únicas do leite e pela textura de iogurte, que apresenta gel com força alta e baixa sinérese (BALTHAZAR, 2015a; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; BALTHAZAR *et al.*, 2017; CARPINO *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2017; WENDORFF, 2011).

O leite de ovelha fresco tem valor médio de pH de 6,65, próximo ao leite de vaca. O aumento de acidez é indicativo de contaminação microbiológica devido à produção de ácido pelos microrganismos, causando dissolução do fosfato coloidal e enfraquecendo as ligações das caseínas (FAVA *et al.*, 2014). Isso pode alterar a coagulação e diminuir a capacidade de retenção de água, causando maior

deissoramento e alterando os grânulos de coágulo, interferindo na textura da coalhada (FAVA *et al.*, 2014; MUNIEWEG *et al.*, 2017)

A densidade é relação entre massa e volume. O leite de ovelha possui densidade média maior que os leites de vaca e cabra por causa do elevado conteúdo de sólidos totais e gordura. Isso assegura melhor cremosidade e consistência na produção de derivados lácteos, dispensando o uso de espessantes (BALTHAZAR *et al.*, 2017; BALTHAZAR, CRUZ, 2016b; PARK *et al.*, 2007; WENDORFF, 2011).

2.3 KEFIR

Na procura de benefícios à saúde, a população busca por alternativas alimentares que vão além da nutrição. Nesse contexto, os alimentos funcionais ganham cada dia mais destaque. Os probióticos cumprem esse papel, trazendo equilíbrio da flora intestinal, redução de diarreias, colesterol e câncer (RIBEIRO, 2015).

Leites fermentados compreendem produtos da fermentação por microrganismos específicos do leite pasteurizado ou esterilizado, tais como iogurtes, coalhada, leite fermentado, leite acidófilo, *kumys*, *buttermilk* e *kefir* (BRASIL 2007; CRUZ *et al.*, 2017b). *Kefir* é um leite fermentado probiótico, produzido a partir de qualquer tipo de leite (ovelha, vaca, cabra, búfala, camela) com grãos de *kefir* (tradicionais ou comerciais) por fermentação láctica e alcoólica com bactérias e leveduras contidas no grão. Tem consistência semelhante ao iogurte, porém com valores nutricionais e terapêutico maiores (ALMEIDA *et al.*; 2011; MOREIRA JUNIOR *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2017; SHARIFI *et al.*, 2017).

Segundo a Instrução Normativa nº 46/2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a definição de *kefir* compreende o produto resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado, que é realizada com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de *kefir*, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de *kefir* são constituídos também por

leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Estes microrganismos específicos devem ser viáveis e ativos no produto final durante seu prazo de validade com contagens mínimas de bactérias lácticas e leveduras específicas. Quanto às exigências microbiológicas, o *kefir* deve ser processado sob critérios de Boas Práticas de Fabricação (BRASIL, 2007) (Quadro 6).

Quadro 6 – Requisitos físico-químicos, contagem de microrganismos específicos e critérios microbiológicos do *kefir*

Requisitos Físico-Químicos						
Item				Kefir		
Acidez (g de ácido láctico/100g) Norma FIL 150:1991				0,5 a 1,5		
Etanol (% v/m)				Máximo de 1,5% no <i>kefir</i> fraco e até 3% no <i>kefir</i> forte		
Contagem de Microrganismos						
Contagem de bactérias lácticas totais (UFC/g) Norma FIL 117A: 1988				Min. 10 ⁷		
Contagem de leveduras específicas (UFC/g) Norma FIL 94 B: 1990				Min. 10 ⁴		
Microrganismo	Critério de Aceitação ⁽²⁾				Situação	Norma
	n	c	m	M		
Coliformes/g (30 °C)	5	2	10	100	4	FIL73A:1985
Coliformes/g (45 °C)	5	2	<3	10	4	APHA 1992c.24 ⁽¹⁾
Bolores e leveduras/g	5	2	50	200	2	FIL94B:1990

Fonte – IN 46 de 2007 (BRASIL, 2007). ⁽¹⁾Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 3rd. Ed., Edited by Carl Vanderzant and Don F. Splittstoesser (APHA). ⁽²⁾n = nº de amostras avaliadas em um lote; c = nº de amostras que podem apresentar contagens entre “m” e “M”; m = limite de contagem mínima; M = limite de contagem máxima.

A origem do *kefir* vem do Cáucaso, onde os grãos eram passados de geração em geração como herança e fonte de riqueza. A palavra derivada de *keif* (eslavo) significa “bem estar” ou “viver bem” em função do bem estar gerado nas pessoas (ROSA *et al.*, 2017).

Kefir pode ser produzido a partir de qualquer leite através da fermentação do mesmo por cultura “starter” de grãos de *kefir*. O processo de fermentação mista

lática e alcoólica acontece à temperatura ambiente a 25 °C por 24 horas. Os grãos são separados da bebida através de filtração e podem ser reinoculados em nova porção de leite. O líquido é o *kefir*, que pode ser consumido assim ou continuar sua fermentação secundária (ou maturação) por mais 24 horas a temperatura de cerca de 10 °C e seu pH fica entre 4,2 e 4,6 (RODRIGUES, 2018; ROSA *et al.*, 2017; WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

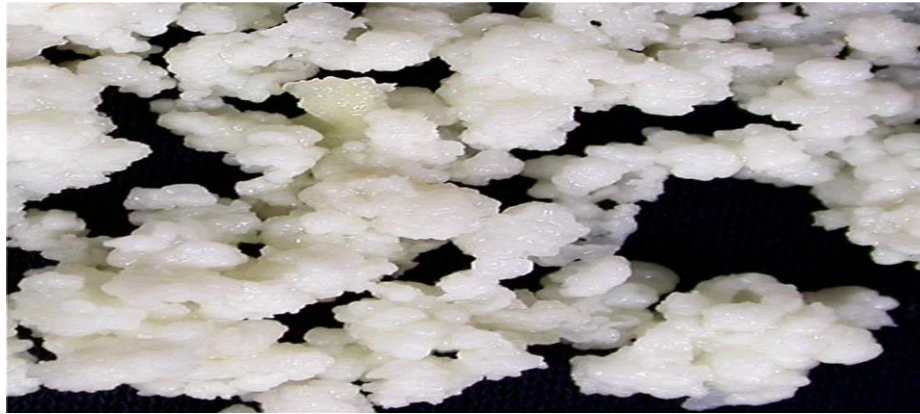
A fermentação lática ocorre à temperatura ambiente, onde as BAL produzem ácido lático como metabólito principal, o que reduz o pH até o ponto isoelétrico de 4,65 da caseína, fazendo com que ocorra sua coagulação. A fermentação alcoólica pelas leveduras ocorre sob refrigeração, onde há produção de CO₂ e álcool etílico, resultando no sabor e aroma característico do produto. Essa complexa fermentação gera também outros metabólitos, como ácido acético, polissacarídeos, aminoácidos, peptídeos, vitaminas, acetona e acetaldeído, sendo este último um importante componente do aroma (CONTIM *et al.*, 2018; KUHL, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2011; MIRANDA *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2018; WESCHENFELDER *et al.*, 2009, 2011).

Os grãos de *kefir* têm origem numa cultura mista natural usada por séculos na região do Cáucaso. Possuem formas irregulares que lembram a couve-flor, com diâmetro de 0,3 a 3,5 cm (CONTIM *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2013b; MIRANDA, 2014; ROSA *et al.*, 2017; WESCHENFELDER *et al.*, 2011), onde vivem em simbiose vários microrganismos, entre leveduras, BAL como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e bactérias de ácido acético (BAA) envolvidas em uma matriz polissacarídica denominada *Kefiran*. Essa simbiose promove certa estabilidade na comunidade de microrganismos nos grãos e na bebida (ALMEIDA *et al.*; 2011; KESENKAS *et al.*, 2017; LEITE *et al.*, 2013a,b; MOREIRA JUNIOR *et al.*, 2018; RODRIGUES, 2018) (Figura 3).

O melhor método de preservação dos grãos de *kefir* para a fabricação doméstica é o congelamento a - 20 °C (GARROTE *et al.*, 1997). A composição do grão contém proteínas (3%), lipídeos (0,2%), água (90%), carboidratos (6%) e minerais (0,7%) e apresenta coloração esbranquiçada ou amarelada. Pesquisar os grãos de *kefir* tem alto fator de dificuldade, pois ao serem isolados os microrganismos que o compõem em culturas puras, diminuem ou perdem atividade

bioquímica (GARROTE *et al.*, 2001; MOREIRA JUNIOR *et al.*, 2018; RODRIGUES, 2018). Já a bebida *kefir* deve conter 2-7% de proteínas, menos de 10% de gordura, 0-6% de ácido láctico e a proporção de álcool não foi instituída, de acordo com *CODEX ALIMENTARIUS* (2003).

Figura 3 - Aparência física de grãos de *kefir* frescos



Fonte – KESENKAS *et al.*, 2017.

A bebida fermentada *kefir* é produzida de forma comercial em muitos países, como Alemanha, Áustria, França, Rússia, Noruega, Suíça, Israel, Japão, Polônia e Estados Unidos. No Brasil, é bastante difundido seu uso caseiro para consumo pessoal. Os grãos são doados entre as pessoas, requer simples manuseio e baixo custo (LEITE *et al.*, 2013a,b; MIRANDA *et al.*, 2014; ROSA *et al.*, 2017). Recentemente no Japão foi patenteada uma formulação para prevenção e controle da obesidade com *kefir* adicionado de enzimas, como a α -amilase ou a lipase (ROSA *et al.*, 2017).

É uma bebida refrescante, revigorante, de gosto ácido, ligeiramente espumosa e efervescente, consistência cremosa e espessa de fácil digestão e alto valor biológico, que contém vitaminas do complexo B, C, A e K, minerais, aminoácidos essenciais, fósforo, cálcio e magnésio (CONTIM *et al.*, 2018; ROSA *et al.*, 2017; WESCHENFELDER *et al.*, 2009).

A falta de padronização da bebida resulta em características nutricionais e sensoriais distintas. A composição química e microbiológica pode ser influenciada por diversos fatores, como proporção e composição de grãos, tipo de leite, temperatura de fermentação, região de origem dos grãos, tempo e outros (LEITE *et al.*, 2013a,b; MIRANDA *et al.*, 2014; SANTOS JUNIOR, 2018). Isso faz com que o

estudo do *kefir* seja complexo, já que quando separam os microrganismos em culturas puras, a atividade bioquímica no leite é diminuída ou nula. Possui muitos históricos de efeitos positivos à saúde, o que aumenta o interesse na bebida em vários países (LEITE *et al.*, 2013a; RODRIGUES, 2018).

A fermentação pode ser definida como processo bioquímico de transformação, pelos microrganismos, de nutrientes do alimento em diferentes metabólitos de interesse comercial. Na fermentação do leite, lactose e citrato serão metabolizados, resultando em ácido láctico, compostos aromáticos e gás. As BAL são divididas de acordo com a via metabólica em: homofermentativa (ácido láctico como produto principal ou único), heterofermentativa (ácido láctico, álcool, ácido acético e CO₂) e via das bifidobactérias (lactato e acetato). Dentre as funções da BAL, destacam-se a produção de ácido láctico, a formação de compostos voláteis e inibição de bactérias deteriorantes ou patogênicas (CRUZ *et al.*, 2019). Já as leveduras produzem na fermentação substâncias que atuam nas características sensoriais, além de vitaminas, aminoácidos, álcool e CO₂ (LEITE *et al.* 2012; RODRIGUES, 2018).

Os principais gêneros de BAL presentes no *kefir* são *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*. Há também bactérias do gênero, *Acetobacter* e leveduras. Os *Lactobacillus* dominam população microbiana nos grãos de *kefir* (65-80%), juntamente com *Lactococcus* e *Leuconostoc* (5-25%) e leveduras (10-15%) (CRUZ *et al.*, 2019). Constituem populações bacterianas isoladas de bebidas e grãos de *kefir*: *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranoferens*, *Lactobacillus kefirgranum*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* sp. Entre as leveduras temos: *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*, *Candida kefir*, *Saccharomyces unisporus*, *Pichia fermentans*, *Kazachastania aerobia*, *Lachancea meyersii*, *Yarrowia lipolytica* and *Kazachstania unispora*. Também são encontradas *Acetobacter rasens*, *Acetobacter acet*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Micrococcus* spp., *Pediococcus* spp. (CRUZ *et al.*, 2019; LEITE *et al.* 2012; RODRIGUES, 2018). Estes microrganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu

prazo de validade com contagens mínimas de bactérias lácticas de 10^7 UFC/g e de leveduras específicas 10^4 UFC/g (BRASIL, 2007).

Em termos de valor nutricional, *kefir* contém grandes quantidades de aminoácidos (lisina, valina, serina, lisina, alanina, fenilalanina, triptofano, metionina, treonina e isoleucina), é boa fonte de vitaminas (A, C, K, caroteno, ácido fólico, B₁, B₂, B₅, B₁₂) e minerais (cálcio, fósforo, magnésio, cobre, ferro, zinco, manganês e cobalto). Alguns compostos aumentam durante a fermentação, tais como biotina, piridoxina, ácido fólico e vitamina B₁₂. A presença de amins biogênicas (cadaverina, tiramina e putrescina) pode afetar as características sensoriais de forma negativa. A matriz polissacarídica do *kefir*, denominada *kefiran*, é um glucogalactano ramificado solúvel em água, viscoso e resistente à hidrólise enzimática intestinal. A composição, quantidade e tipo de constituintes são determinados pelo tipo de matéria prima, microrganismos dos grãos de *kefir* e método de preparação utilizado (AHMED *et al.*, 2013; ARSLAN, 2014; NOĞAY, 2019, ROSA *et al.*, 2017; SHARIFI *et al.*, 2017).

2.4 PROPRIEDADES FUNCIONAIS DO KEFIR

Peptídeos bioativos, bacteriocinas, exopolissacarídeos e antibióticos podem ser gerados durante a fermentação do leite para a elaboração de produtos lácteos. Dessa forma, esses compostos com funcionalidades distintas podem ser encontrados em produtos finais, como queijos, iogurtes e leites fermentados. A formação de diferentes compostos na fermentação do *kefir* reforça a possibilidade de trazer benefícios à saúde, atuando como alimento funcional, podendo interferir na aderência de espécies patogênicas no intestino, por exemplo, através da produção desses metabólitos específicos (KUHL, 2016; RODRIGUES 2018; ROSA *et al.*, 2017).

O consumo regular de *kefir* traz benefícios como redução de sintomas da intolerância à lactose, propriedades antimicrobianas, propriedades anti-inflamatórias, atividade antioxidante, efeito anti-hipertensivo, redução de colesterol, modulação da microbiota intestinal e imunomodulação, aceleram processo de cicatrização e

propriedades antitumorais (ALMEIDA *et al.*, 2011; ARAÚJO *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2014; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2016; MOREIRA JUNIOR *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2012; ROSA *et al.*, 2017).

2.4.1 Propriedades antimutagênica e anticarcinogênica

A importância de uma boa alimentação para o controle de vários tipos de câncer é grande e consumir alimentos com propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas pode auxiliar na prevenção e tratamento dos mesmos (LIU *et al.* 2002). Uma dieta desequilibrada pode ser incluída como fator responsável do câncer, entre 20-30% dos casos mundiais (ALSHA'AR *et al.*, 2017).

As células tumorais são altamente proliferativas, possuem capacidade de evitar a resposta imune e essa a desregulação do sistema imunológico e inflamatório causa o câncer (SHARIFI *et al.*, 2017). A imunoestimulação dos leites fermentados mantém o sistema imune atento às alterações iniciais do câncer, modula a relação entre o sistema imunológico e o endócrino, aumenta de apoptose em tumores e regula os linfócitos T. A investigação de linfócitos T é importante porque são eles que reconhecem os antígenos tumorais, que são os principais alvos da imunidade antitumoral protetora (DE MORENO *et al.*, 2007).

Kefir possui concentrações mais elevadas de isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA), ácidos butírico, palmítico, palmitoleico e oleico, o que diminuiu em maior grau a mutagenicidade em comparação ao leite e iogurte. A melhora do sistema imune e o incremento de compostos bioativos oferecidos pelo *kefir* causam um efeito sistêmico, que atua na prevenção e combate ao câncer em vários órgãos (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011 e 2006).

LIU *et al.* (2002) realizaram uma pesquisa da ação antitumoral de *kefir* de leite e *kefir* de soja em camundongo ICR portadores de tumor sarcoma 180, que resultou em inibição de crescimento tumoral de 64,8% e 70,9%, respectivamente. Além disso, constataram também que ambos induziram a apoptose de células tumorais e

aumentaram níveis totais de imunoglobulina A (IgA) no intestino delgado, o que aumenta a resistência da mucosa a infecções gastrointestinais.

Em outro estudo, LIU *et al.* (2005a) pesquisaram as propriedades antimutagênicas e antioxidantes do *kefir* de leite e do *kefir* de soja e demonstraram pelo ensaio de mutagenicidade de *Salmonella typhimurium* TA98, que ambos têm atividade antimutagênica, mas que foi significativamente maior no *kefir* de leite.

Já em 2007, DE MORENO *et al.* avaliaram o efeito antitumoral do *kefir* e da fração livre de células de *kefir* em câncer de mama de camundongos BALB/c através de consumo cíclico de 2 ou 7 dias. A administração cíclica de 2 dias da fração livre aumentou significativamente a apoptose² e diminuiu a proteína Bcl-2, que possui atividade antiapoptótica, nas células da glândula mamária. Os animais dos grupos alimentados ciclicamente por 2 dias com ambos os produtos mostraram aumentos significativos no número de células IgA e atraso no crescimento do tumor. Quanto aos linfócitos T, apenas a administração cíclica de 2 dias da fração livre foi capaz de aumentar as células T CD4+, destacando a importância componentes não-microbianos do *kefir* nos efeitos antitumorais.

Numa pesquisa, KHOURY *et al.* (2014) investigaram *in vitro* o efeito do *kefir* em células adenocarcinoma colorretal Caco-2 e HT-29 (citotoxicidade, proliferação, ciclo celular, morte celular, expressão de genes, cicatrização) e em células de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB231 (motilidade). *Kefir* apresentou efeito antiproliferativo, diminuiu a viabilidade, induziu apoptose, parou o ciclo celular na fase G1, aumentou a expressão de proteínas pró-apoptóticas, diminuiu a expressão de fatores de transformação do crescimento alfa e beta (TGF- α e TGF- β).

Em mais um estudo, ALSHA'AR *et al.* (2017), investigaram o efeito anticâncer do *kefir*, *kefir* alcalino (AK), exopolissacarídeo (EPS) e exopolissacarídeo alcalino (AEPS) em diferentes concentrações em células de sarcoma humano. O AK mostrou ser o mais eficaz, seguido de EPS, AEPS e *kefir*, respectivamente.

² A apoptose é definida como morte celular programada. É um processo celular complexo e ativo no qual células individuais são desencadeadas para sofrer autodestruição de uma maneira que não prejudique as células vizinhas nem provoque uma reação inflamatória (DE MORENO *et al.*, 2007).

2.4.2 Efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicemiante

As doenças cardiovasculares têm na hipercolesterolemia um dos principais fatores de risco e é de interesse crescente o desenvolvimento de suplementos alimentares para reduzir o colesterol sérico (HUANG *et al.*, 2013a). O metabolismo do colesterol sofre efeito positivo nos estudos *in vitro* e em animais, tendo como provável mecanismo de ação a assimilação do colesterol por algumas bactérias. Os níveis de colesterol são reduzidos também por ação dos isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA) que possuem efeitos hipocolesterolêmicos e anti-aterogênicos, protegendo as artérias contra a formação de placas de ateroma (GUZEL-SEYDIM, 2011).

O diabetes Mellitus possui origem multifatorial, envolvendo mecanismos relacionados à microbiota intestinal para seu desenvolvimento. O diabetes tipo 1 é resultado da destruição autoimune de células β do pâncreas. Já no diabetes tipo 2, respostas inflamatórias no lúmen intestinal atuam no receptor de insulina, reduzindo sua sensibilidade (GOMES *et al.*, 2014).

Em estudos feitos por MAEDA *et al.* (2004a, b) investigaram o efeito de *kefir* em diferentes concentrações na pressão arterial e teores de lipídios em ratos hipertensos espontaneamente hipertensos SHRSP/Hos alimentados por 30 dias com dieta gordurosa. Encontraram em todos os grupos pressão sanguínea significativamente menor do que o grupo controle, assim como menores concentrações lipídicas no soro e no fígado.

No mesmo estudo, MAEDA *et al.* (2004a) pesquisaram sobre o efeito do *kefir* em diferentes concentrações na glicemia em camundongos geneticamente diabéticos KKAy alimentados por 30 dias. Observaram aumento contínuo da glicemia no grupo controle e redução significativa nos grupos alimentados com *kefir*.

Um estudo desenvolvido por LIU *et al.* (2006a) investigou a propriedade hipocolesterolêmica do *kefir* de leite e do *kefir* de soja em hamsters sírios dourados através da dosagem dos níveis de lipídios plasmáticos e hepáticos, comparando uma dieta sem colesterol com uma enriquecida em colesterol. O ganho de peso foi

significativamente maior no grupo da dieta enriquecida com colesterol. As dietas de *kefir* de leite e *kefir* de soja tendem a diminuir os níveis séricos de triacilglicerol e colesterol total, colesterol não HDL, índice aterogênico e também a reduzir o acúmulo de colesterol no fígado, além de aumentar a excreção de ácidos biliares totais nas fezes, em comparação às dietas com leites.

Em 2009, WANG *et al.* realizaram uma pesquisa sobre efeito do pó liofilizado de *Lactobacillus plantarum* MA2 isolado de *kefir* tibetano chinês sobre níveis lipídicos e microflora em ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta rica em colesterol durante 5 semanas. O grupo alimentado com *L. plantarum* teve redução significativa dos níveis séricos de colesterol total, lipoproteína de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos, assim como colesterol total do fígado e os triglicerídeos. O colesterol e os triglicerídeos fecais aumentaram significativamente e a população de bactérias do ácido láctico e bifidobactérias também.

Já UCHIDA *et al.* (2010) investigaram o efeito anti-aterogênico de *kefir* em coelhos brancos da Nova Zelândia com uma dieta hiper colesterolêmica. Os níveis de lesões ateroscleróticas da aorta abdominal, de colesterol no fígado e de peroxidação lipídica foram significativamente menores no grupo que recebeu *kefir*.

LEE *et al.* (2011) pesquisaram os efeitos do consumo de *kefir* nos níveis de glicose e lipídeos no sangue de camundongos db/db diabéticos e verificaram um decréscimo significativo da glicose, assim como dos teores de triglicerídeos e ácidos graxos livres. Já as concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) não foram significativamente diferentes do grupo controle.

A investigação de HADISAPUTRO *et al.* (2012) foi sobre o efeito de *kefir* consumido por 30 dias na glicemia e resposta imune em ratos Wistar diabéticos por indução de estreptozotocina. Foram medidos os níveis séricos de glicemia e das citocinas IL-1, IL-6, IL-10 e TNF α . Constataram diminuição significativa na glicemia e nas citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6, além do aumento significativo na citocina anti-inflamatória IL-10 nos animais que consumiram *kefir*.

HUANG *et al.* (2013a) identificaram e caracterizaram cepas de *Lactobacillus plantarum* obtidas em grãos de *kefir* e avaliaram seu uso probiótico como redutores

de colesterol em ratos Sprague-Dawley. Houve redução significativa dos níveis de colesterol total, triglicerídeos e LDL no soro, assim como as taxas de colesterol e triglicerídeos no fígado.

Em outro estudo de HUANG *et al.* (2013b), uma cepa de *Lactobacillus plantarum* isolado a partir de grãos de *kefir* tibetano foi avaliada na redução de colesterol *in vitro* e *in vivo* em ratos Sprague-Dawley. Concluíram que o efeito foi positivo e indicaram um possível mecanismo de ação através da inibição da transcrição da proteína NPC1L1(Niemann-Pick C1-like 1) no intestino delgado. Essa proteína é crítica para a absorção intestinal do colesterol e tem alta taxa de expressão na superfície dos enterócitos.

Ainda em 2013, ZHENG *et al.* avaliaram as propriedades funcionais das cepas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus kefir* isoladas de grãos de *kefir* tibetano e constataram efeito positivo hipocolesterolêmico em ratos Sprague-Dawley. Além disso, comprovaram a presença das três cepas no intestino delgado, cólon e fezes de ratos durante o teste de alimentação, mesmo após o intervalo de duas semanas na administração das cepas.

2.4.3 Efeito anti-hipertensivo

O efeito anti-hipertensivo do consumo de leite fermentado de *kefir* pode estar relacionado à: diminuição na geração de espécies reativas de oxigênio, melhora na sensibilidade barorreflexa e inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) (PIMENTA *et al.*, 2018). A inibição da enzima conversora da angiotensina (ECA) por peptídeos produzidos a partir da caseína no *kefir* faz com que o vasoconstritor angiotensina II deixe de ser produzido e, conseqüentemente, deixa de induzir a liberação de aldosterona. Com isso, a concentração de sódio no sangue deixa de se elevar, impedindo aumento da pressão. Ao mesmo tempo, esses peptídeos inibem a degradação do vasodilatador bradiquinina, reduzindo a hipertensão. (HERNÁNDEZ-LEDESMA *et al.*, 2011; MAEDA *et al.*, 2004a, b).

Os estudos feitos por MAEDA *et al.* (2004a, b) investigaram o efeito de *kefir* em diferentes concentrações na pressão arterial e teores de lipídios em ratos hipertensos espontaneamente hipertensos SHRSP/Hos alimentados por 30 dias com dieta gordurosa. Encontraram em todos os grupos pressão sanguínea significativamente menor do que o grupo controle e atividades significativamente menores da ECA no soro e na aorta torácica.

KANBAK *et al.* (2014) desenvolveram um estudo do efeito de dieta salina com baixas doses de aspirina e *kefir* na pressão arterial e apoptose renal em ratos Sprague-Dawley e verificou que ambos apresentaram bom efeito na função renal, porém *kefir* teve como efeito adicional a atividade antiapoptótica.

2.4.4 Propriedade antimicrobiana

A propriedade antimicrobiana está relacionada a diversos fatores, como formação de bacteriocinas³, peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, acetaldeído, CO₂ e etanol produzidos durante a fermentação, além da competição por nutrientes e da capacidade de diminuir a permeação intestinal por antígenos alimentares (AHMED *et al.*, 2013; COTTER *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2006b; ROSA *et al.*, 2017; UMEDA *et al.*, 2005). *Kefiran* é relatado como tendo atividade antibacteriana, antimicótica e antitumoral. Sua produção é relacionada à presença de *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefiri* nos grãos (RODRIGUES *et al.*, 2005; ROSA *et al.*; 2017).

SANTOS *et al.* (2003) investigaram 58 cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas de *kefir* de seis regiões diferentes (França, Itália, Portugal, Rússia, Turquia e Espanha) quanto à capacidade de adesão às células de enterócitos Caco-2 e inibir a fixação de *Salmonella typhimurium*, resistência a pH ácido e ácido biliar e atividades antimicrobianas contra bactérias enteropatogênicas. Os isolados de *Lactobacillus* apresentaram atividade antimicrobiana contra: *Escherichia coli* CECT 4076 (75%), *Yersinia enterocolitica* CECT 4315T (75%), *Shigella flexneri* CECT 4804 (64%),

³ As bacteriocinas são definidas como peptídeos produzidos por bactérias que apresentam ação bactericida ou bacteriostática contra outras bactérias (COTTER *et al.*, 2005).

Listeria monocytogenes CECT 4032 (50%), *Salmonella enteritidis* CECT 4155 (40%). Para *Salmonella typhimurium* CECT 415, muitas das cepas (81%) não mostraram inibição. As melhores propriedades probióticas foram observadas em *L. acidophilus* CYC 10051 e *L. kefiranoferiens* CYC 10058.

Já RODRIGUES *et al.* (2005) estudaram a ação antimicrobiana e cicatrizante do *kefir* e do *kefirano*. Para cicatrização, ratos Wistar com lesões cutâneas dorsais induzidas e inoculadas com *Staphylococcus aureus*, foram tratados com aplicação tópica de gel de *kefir* a 70% por 7 dias e comparado com o grupo controle positivo, que usou emulsão de neomicina-clostebol, e o diâmetro da ferida foi medido após o tratamento. As feridas tratadas com gel de *kefir* eram significativamente menores que as feridas tratadas o medicamento convencional e o exame histopatológico mostraram uma granulação bem desenvolvida do epitélio e áreas de neovascularização, sugerindo cura parcial. Já para a ação antimicrobiana, utilizou o método de difusão de disco em ágar contra várias espécies de bactérias e *Candida albicans*, além de comparação com antimicrobianos tradicionais. Tanto o *kefir* quanto o *kefirano* mostraram atividade contra todas as sete bactérias e a levedura testadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Streptococcus salivarius* ATCC 39562, *Streptococcus pyogenes* ATCC 17568, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Candida albicans* ATCC 10232, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Listeria monocytogenes* ATCC 4957 e *E. coli* ATCC 8739).

Em 2007, ULUSOY *et al.* realizaram uma pesquisa *in vitro* para investigar o efeito de *kefir* produzido a partir de cultura iniciadora comercial, fermentado por 24 e 48 horas, contra cinco bactérias patogênicas, comparando com os antibióticos ampicilina e gentamicina pelo método de difusão de disco. Após a fermentação e nos dias 1, 4 e 7, a atividade foi testada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739). *Kefir* apresentou efeito antibacteriano contra todas as cepas estudadas, em ambas as condições de fermentação e após 7 dias de armazenamento, comparáveis com a ação dos antibióticos em questão. Com exceção da *Salmonella enteritidis*, o efeito antibacteriano diminuiu ou não mudou durante o armazenamento.

Ainda em 2007, KAKISU *et al.* investigaram o efeito de *kefir* contra cepa toxigênica de *Bacillus cereus* e concluíram que *kefir* a 5% impediu a germinação dos esporos e o crescimento das formas vegetativas.

MEDRANO *et al.* (2008, 2009) provaram que *kefir* foi capaz de modular a virulência de *Bacillus cereus* B10502 em enterócitos (células Caco-2) com aumento da atividade desidrogenase mitocondrial, diminuição do destacamento celular, da necrose, da apoptose e da atividade hemolítica.

O estudo de COGULU *et al.* (2010) avaliou o consumo de *kefir* uma ou duas vezes por dia durante 3 semanas na inibição das bactérias cariogênicas *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus spp.* nas salivas de 104 voluntários de 20 a 27 anos. As contagens de ambas as bactérias foram significativamente reduzidas no grupo que consumiu *kefir* duas vezes ao dia em comparação aos grupos que consumiram leite ou *kefir* uma vez ao dia.

Já ISMAIEL *et al.* (2011) fizeram uma investigação de ultraestrutura do grão de *kefir* oriundo do Egito e testaram a atividade antibacteriana e antifúngica dos grãos, do *kefir*, do *kefir* neutralizado e do *kefir* contra 8 bactérias e 3 fungos através da técnica de difusão em disco (*Escherichia coli* ATCC 11229, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Salmonella typhi* ATCC 14028, *Candida albicans* ATCC 10231, *Bacillus cereus* GST4, *Bacillus subtilis* BW2, *Streptococcus faecalis* KR6, *Aspergillus flavus* AH3 e *Fusarium graminearum* CZ1). *Kefir* apresentou a mais alta atividade contra todas as bactérias testadas. Quanto aos fungos, não houve efeito contra *C. albicans*, porém *F. graminearum* foi fortemente inibido por *kefir*, *kefir* neutralizado e *kefir* a 0,70 mg/mL. A esporulação de *Aspergillus flavus* e, conseqüentemente, a produção de aflatoxina B1 foi totalmente inibida com soluções filtradas de *kefir* com concentrações de 7 a 10% (v/v).

HUSEINI *et al.*, (2012) realizaram estudos das ações antibacterianas e anti-inflamatórias na pele de ratos Wistar. As lesões por queimaduras experimentais e inoculadas com *Pseudomonas aeruginosa* foram tratadas duas vezes ao dia, por duas semanas, com: gel de *kefir* (24h, 48h, 96h), gel de grãos de *kefir* 96h, sulfadiazina de prata a 1%, gel de base. Verificaram que as porcentagens do

tamanho das feridas e inflamação foram menores e a epitelização e formação de cicatrizes foram maiores nos grupos tratados com géis de *kefir*.

Em 2013, um estudo realizado por FRANCO *et al.* investigou a capacidade de proteção do *kefir* em camundongos C57BL/6 contra a infecção pelo parasita *Giardia intestinalis* e verificou que sete dias após a contaminação houve redução da infecção e promoção da ativação de diferentes mecanismos de imunidade humoral e celular, que sofrem interferências pela infecção parasitária.

GHASEMPOUR *et al.* (2014) realizaram avaliação comparativa entre uso de *kefir* e enxaguatório bucal com fluoreto de sódio 0,05% no controle de *Streptococcus mutans* salivares em 22 voluntários saudáveis entre 22 e 32 anos, por 2 semanas. Concluíram que o efeito inibitório encontrado entre os grupos de estudo foi igual, mesmo com diferença significativa entre as contagens das bactérias antes e após as intervenções. Não houve diferença significativa entre os valores de pH da saliva. *Kefir* pode ser considerado uma alternativa para pessoas que não podem usar bochecho com flúor.

A pesquisa de GUZEL-SEYDIM *et al.* (2016) investigou o efeito de *kefir* natural, *kefir* comercial, iogurte probiótico e iogurte comercial na inibição de *Fusobacterium nucleatum*, através de método de difusão em disco. A ordem decrescente dos diâmetros observados foi: *kefir* natural (9,5 mm), iogurte probiótico (8,25 mm), *kefir* comercial (6,5 mm) e iogurte comercial (6,33 mm). *Kefir* inibiu a atividade do *F. nucleatum*, bactéria relacionada com câncer de cólon.

Em 2018, DIAS *et al.* isolaram 60 *Lactobacillus* derivados de grãos de *kefir*, testaram suas atividades antimicrobianas e verificaram alteração do pH na ação inibitória contra cinco bactérias (*Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43895, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium ATCC 13311 e Enteritidis ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644). O teste de antagonismo mostrou que 85 % dos isolados teve atividade contra todos os patógenos.

2.4.5 Efeito anti-inflamatório, modulação da microbiota e imunomodulação

A microbiota intestinal possui muitos antígenos que participam na modulação de doenças imunológicas e mantêm íntegra essa barreira, facilita as interações antígeno-hospedeiro e garante uma resposta eficaz. Doenças crônicas como diabetes, obesidade e câncer causam o estresse inflamatório, que aumenta a permeabilidade intestinal e a resposta imune da mucosa. Essas alterações funcionais contribuem para a destruição autoimune das células β no pâncreas, causando diabetes tipo 1, aumenta a expressão de citocinas inflamatórias, levando à resistência à insulina e diabetes tipo 2. Probióticos modulam a microbiota, reduzem a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e a permeabilidade intestinal, podendo ser eficaz na prevenção e tratamento do diabetes (CHEN *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2014; OSTADRAHIMI *et al.*, 2015; PRADO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005). A baixa na absorção de lipopolissacarídeo (LPS) restaura a função dos receptores de insulina e diminui o processo inflamatório crônico, controlando o diabetes (OSTADRAHIMI *et al.*, 2015).

A imunidade inata é a primeira linha de defesa do sistema imune, sendo mediada por substâncias como peptídeos antimicrobianos, citocinas e quimiocinas, onde os macrófagos desempenham papel fundamental no direcionamento da resposta. Os probióticos podem contribuir beneficentemente através das células microbianas vivas ou de seus metabólitos (efeito biogênico⁴). Saber os mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune é essencial para esclarecer como o consumo de *kefir* pode aumentar a saúde (VINDEROLA *et al.*, 2006a).

MARQUINA *et al.* (2002) estudaram o efeito da administração do *kefir* na microbiota do trato gastrointestinal de camundongos suíços. Observaram que *kefir* foi capaz de aumentar 10 vezes os níveis de estreptococos e diminuir especificamente os níveis de *Enterobacteriaceae* e *Clostridium* redutores de sulfeto.

Já UMEDA *et al.* (2005) pesquisaram o efeito do consumo de *kefir* liofilizado na permeabilidade intestinal e sensibilização oral da ovalbumina (OVA) em

⁴ Biogênicos são definidos como componentes alimentares derivados da atividade microbiana que proporcionam benefícios à saúde sem envolver a microflora intestinal (VINDEROLA *et al.*, 2006a).

camundongos BALB/c por 7 semanas. Amostras para determinação da concentração de OVA no plasma foram colhidas nos tempos 0, 30, 60, 120, e 180 minutos após a alimentação. No tempo de 30 minutos, houve diminuição significativa de níveis de OVA no grupo que recebeu *kefir* em conjunto com OVA, quando comparado ao grupo que recebeu OVA sozinha. Com relação aos níveis de IgG, o grupo que recebeu alimentação com *kefir* apresentou níveis significativamente menores que o grupo controle a partir da terceira semana. Já a contagem das células mononucleares esplênicas OVA-estimuladas foi significativamente mais baixa no grupo alimentado com *kefir*. Concluíram que *kefir* colaborou para a redução da sensibilização oral e permeação intestinal.

No mesmo ano, VINDEROLA *et al.* (2005) investigaram o efeito imunomodulador, a importância da dose e a viabilidade celular do consumo de *kefir* na resposta imune da mucosa intestinal em camundongos BALB/c alimentados à vontade com *kefir* comercial ou *kefir* pasteurizado em diversas diluições por 2, 5 ou 7 dias consecutivos. Tanto o *kefir* (diluição 1/10) quanto o *kefir* pasteurizado (diluição 1/100) modularam o sistema imunológico da mucosa de uma maneira dependente da dose nas determinações de IgA, IgG e citocinas. Apesar de *kefir* ser administrado 10 vezes mais diluído que o *kefir* pasteurizado, a amplitude da imunomodulação foi semelhante, dando destaque à importância da viabilidade celular nesse processo.

Em outras pesquisas, VINDEROLA *et al.* (2006a,b) estudaram o efeito de *kefir* e produtos derivados sobre a capacidade imunomoduladora em camundongos BALB/c alimentados por 2, 5 ou 7 dias consecutivos. Verificaram que há relação direta entre nutrição e sistema imune, com indução produção de citocinas por células da imunidade inata (macrófagos peritoneais e células aderentes derivadas das placas de Peyer) e alta resposta na mucosa intestinal (aumento na produção de IgA no intestino delgado e grosso).

LIU *et al.* (2006b) estudaram o efeito do *kefir* e *kefir* de soja na produção de IgE e IgG1 induzida pela ovalbumina (OVA) e na flora bacteriana intestinal em camundongos BALB/c por 28 dias. Ambos os *kefir* aumentaram significativamente *Lactobacillus* e o *Bifidobacterium* e reduziram o *Clostridium perfringens* nas fezes e diminuíram significativamente os níveis séricos de IgE e IgG1 específicos para OVA,

demonstrando o benefício para a prevenção de doenças alérgicas através da alteração da microflora.

Em 2011, MEDRANO *et al.* pesquisaram a administração do exopolissacarídeo *kefiran* sobre o equilíbrio e a função das células imunes da mucosa intestinal e tecidos linfóides associados em camundongos BALB/c. Constataram que aumentou o número de imunoglobulina A (IgA) na lâmina própria, a porcentagem de células B em linfonodos mesentéricos e placas de Peyer, aumento de macrófagos na lâmina própria e na cavidade peritoneal. Ao final, a população de macrófagos diminuiu nas placas de Peyer concomitante com o aumento de células dendríticas totais e a diminuição de células ativadas, evidenciando a capacidade do *kefiran* de modificar o equilíbrio das células imunes na mucosa intestinal.

Um estudo desenvolvido por CHEN Y. *et al.* (2012) avaliou o efeito de *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolado de *kefir in vitro* e *in vivo* na melhora da colite experimental, células epiteliais do cólon humano Caco2-C2BBE1 usando camundongos C57BL/6 com colite induzida por sulfato de sódio de dextrano (DSS). Constataram que *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 demonstrou efeito anticolite, pois *in vitro* foi capaz de aumentar resistência elétrica transepitelial e o nível da quimiocina CCL-20 (envolvida na restituição de células epiteliais do cólon) e *in vivo* conseguiu aumentar a citocina anti-inflamatória e reguladora IL-10, diminuiu a secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) e atenuou o sangramento e encurtamento do comprimento do cólon.

A investigação de ADİLOĞLU *et al.* (2013) avaliou o efeito do consumo diário de 200 mL de *kefir* por seis semanas no perfil de citocinas de 18 voluntários saudáveis com idade entre 20 a 40anos. Amostras foram coletadas antes do uso, na 3ª e 6ª semanas e três semanas após a interrupção do uso de *kefir*. Os níveis de IL-8 diminuíram significativamente e se mantiveram baixos na 9ª semana. Já os de IL-5 aumentaram significativamente e tiveram uma pequena diminuição por efeito rebote na 9ª semana. Quanto ao TNF- α , seus níveis aumentaram, mas apenas na 6ª semana foi significativo e voltou aos níveis originais após interrupção. Concluíram que *kefir* foi capaz de controlar a resposta inflamatória.

CHEN Y. *et al.* (2013a) estudaram os efeitos de *L. kefiranofaciens* M1 isolado de *kefir* em camundongos livres de germes em administrações contínuas ou dose única, assim como o efeito da inoculação contínua, em colite induzida por sal de sódio de sulfato de dextrano (DSS). Verificaram que *L. kefiranofaciens* M1 melhorou a imunorregulação e a funcionalidade do intestino e que a inoculação contínua da cepa melhorou os sintomas da colite.

No mesmo ano, CHEN Y. *et al.* (2013b) continuaram com as investigações de *L. kefiranofaciens* M1 isolado de *kefir* como medida preventiva na infecção por *Escherichia coli* enterohemorrágica EHEC O157:H7 em camundongo BALB/c e em cultura de células *in vitro*. Encontraram efeitos positivos na melhora de sintomas da colite hemolítica, diminuição drástica do número de casos de sangue oculto nas fezes, restituição peso do ceco e rim, restauração na atrofia das microvilosidades, prevenção de danos ao tecido do ceco e cólon, aumento da imunidade e na funcionalidade da barreira da mucosa intestinal.

No estudo de OSTADRAHIMI *et al.* (2015) investigaram o efeito do consumo diário de 600 mL *kefir* e de leite fermentado comum sobre o controle da glicose e perfil lipídico, em 60 pacientes com diabetes tipo 2 por 8 semanas, através de ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo. O consumo de *kefir* diminuiu significativamente a glicemia de jejum e os níveis de hemoglobina glicada. O perfil de lipídeos também diminuiu, porém sem significância estatística.

CARASI *et al.* (2015) avaliou num estudo com camundongos suíços as propriedades imunomoduladoras de cepas de *Lactobacillus kefiri* isoladas de grãos, que foram capazes de regular negativamente a expressão de mediadores pró-inflamatórios e aumentar as moléculas anti-inflamatórias no sistema imunológico do intestino.

2.4.6 Efeito na intolerância à lactose

A lactose é o principal carboidrato do leite. A enzima β -galactosidase atua na quebra da lactose presente no leite em glicose e galactose, através da lise da

ligação glicosídica $\beta(1,4)$. Muitas pessoas apresentam insuficiência ou ausência dessa enzima, o que causa a chegada ao intestino da lactose intacta e consequente utilização da mesma como fonte de carbono pelas bactérias da flora local. Há formação de gases e alteração da pressão osmótica, o que pode causar desconforto e mal estar abdominal, flatulência e diarreia. Durante a fermentação láctica no *kefir*, a lactose é utilizada pelas bactérias, o que diminui a sua concentração no produto. A menor quantidade de lactose aliada à maior atividade da lactase no *kefir* faz com que seu consumo contribua na redução dos sintomas da má digestão em pessoas intolerantes (AHMED *et al.*, 2013; DE VRESE, MARTEAU, 2007; HERTZLER, CLANCY, 2003; ROSA *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por HERTZLER; CLANCY (2003) investigou o efeito do leite, iogurte natural, iogurte aromatizado, *kefir* natural e *kefir* aromatizado na digestão e tolerância de 20g de lactose por 8 horas, com ingestão após jejum noturno, em 15 adultos com má digestão. Na determinação de hidrogênio na respiração em jejum, não houve diferenças significativas entre os cinco tratamentos, porém o leite aumentou significativamente a área sob a curva do hidrogênio no ar expirado em comparação com o iogurte natural, o *kefir* natural e o iogurte com sabor. Para a gravidade e frequência de flatos, não houve diferenças entre os iogurtes e *kefir*, mas houve redução da severidade percebida da flatulência em 54% a 71% em relação ao leite. Quanto à dor abdominal e diarreia, não houve diferença significativa entre os cinco tratamentos.

2.4.7 Efeito antioxidante

Aumento de radicais livres também está associado às doenças crônicas, pois aumenta o risco de desenvolvê-las. *Kefir* não só é uma fonte de compostos antioxidantes, como também estimula as enzimas do sistema antioxidante do organismo (FAHMY, ISMAIL, 2015; LIU *et al.*, 2005b; OZCAN *et al.*, 2009; ROSA *et al.*, 2017). *Kefir* apresenta valores variados para ensaios de antioxidantes DPPH, ABTS e FRAP, dependendo da cultura inicial e do tipo de leite usado (YILMAZ-ERSAN *et al.*, 2018).

GÜVEN *et al.* (2003) fizeram um estudo comparativo de *kefir* e vitamina E nos danos oxidativos do tetracloreto de carbono (CCl₄) em camundongos Swiss Albino por 7 semanas e verificaram que ambos têm capacidade protetora, porém *kefir* oferece maior proteção que a vitamina E.

Já LIU *et al.* (2005a) pesquisaram *in vitro* as propriedades antioxidantes do *kefir* de leite e do *kefir* de soja e demonstraram que ambos exibiram efeito de eliminação significativamente maior dos radicais DPPH, aumento de inibição na peroxidação do lipídica e um poder redutor ampliado. Observaram também que a fermentação não alterou a capacidade quelante de íons ferrosos e a atividade da superóxido dismutase dos materiais originais.

Em outro estudo, LIU *et al.* (2005b) pesquisaram as atividades antioxidantes do *kefir* de leite de vaca e *kefir* de leite de cabra e constataram atividades aprimoradas de ambos em relação à eliminação dos radicais DPPH e superóxido, aumento substancial da inibição na peroxidação lipídica e ampliação no poder redutor, quando comparados aos leites não fermentados. Viram também que não houve diferença significativa quanto à capacidade quelante de íons ferrosos e à atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), além da redução da atividade da enzima glutathione peroxidase (GSH-Px).

A pesquisa de OZCAN *et al.* (2009) foi sobre o efeito do consumo de *kefir* no estresse oxidativo causado por chumbo em ratos durante 6 semanas. Encontraram nos grupos alimentados com *kefir* (com ou sem chumbo) níveis aumentados de glutathione (GSH) e vitamina E, em relação ao grupo estressado com chumbo. Já os níveis de malondialdeído (MDA) foram menores. Isso indica que os antioxidantes GSH e vitamina E reduziram o MDA, biomarcador produto secundário da peroxidação lipídica.

GRISHINA *et al.* (2011) estudaram *in vitro* o efeito antígeno-tóxico de *kefir* e sobrenadante de *ayran* em danos do DNA induzidos pela água fecal em células de adenocarcinoma de cólon humano HT-29 e Caco-2. Tanto o *kefir* quanto o sobrenadante de *ayran* diminuíram significativamente os danos de DNA induzidos pela água fecal, evidenciando capacidade antioxidante significativamente maior do que o leite.

Já PUNARO *et al.* (2014) estudou sobre o estresse oxidativo em ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina e encontrou redução na progressão da hiperglicemia e estresse oxidativo associado à função renal, indicando que *kefir* pode retardar as alterações metabólicas do diabetes.

Em 2015, FAHMY, ISMAIL investigaram em ratos Wistar gama (γ) irradiados o efeito protetor do *kefir* em úlceras gástricas induzidas por etanol e constataram que as mesmas foram evitadas devido aos efeitos antioxidantes, radio protetores e anti-apoptóticos.

Outro estudo feito por YENER *et al.* (2015) pesquisou o efeito do *kefir* na lesão de isquemia-reperfusão em tecidos de rins e pulmões de ratos Sprague-Dawley e verificaram efeito protetor nas funções tecidual e sérica através do aumento as atividades das enzimas antioxidantes, entre outras coisas.

CHEN Z. *et al.* (2015) isolaram, caracterizaram e verificaram o efeito antioxidante de *kefir* de origem tibetana. Os resultados mostraram que *kefir* teve boa estabilidade térmica, além de altas atividades antioxidantes (ensaios ABTS, DPPH e FRAP) e proteção ao dano oxidativo da proteína.

2.4.8 Prevenção de osteoporose

A queda dos níveis de estrogênio na menopausa pode causar a osteoporose, que baixa massa óssea e deteriora a estrutura do tecido ósseo, aumentando o risco de fraturas, afetando o equilíbrio entre a reabsorção óssea e a formação óssea. O aumento na ingestão de cálcio é recomendado como prevenção da doença.

CHEN *et al.* (2014a) investigaram os efeitos de *kefir* na osteoporose em ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas e descobriram melhora na massa óssea e na microarquitetura. *Kefir* preveniu a perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio, o que significa que aumentou a absorção de cálcio.

2.4.9 Propriedade ansiolítica

O uso constante de nicotina por fumantes leva ao problema de dependência física conhecida como síndrome de abstinência, pois é uma droga psicoestimulante, desperta os sentimentos de prazer, euforia e estimula os circuitos de recompensa no cérebro (serotonina e dopamina). Como *kefir* é rico em triptofano, aminoácido essencial precursor da serotonina, foi averiguado por NOORI *et al.* (2014) seu uso no tratamento da depressão induzida pela cessação da nicotina em ratos Wistar. Os resultados apontaram que *kefir* teve efeito sobre a depressão induzida pela cessação da nicotina, ansiedade e comprometimento cognitivo.

2.4.10 Efeito na obesidade e propriedade nutracêutica

A obesidade⁵ é um problema mundial de saúde pública porque traz sérias complicações devido ao excesso de triglicerídeos no tecido adiposo. É uma condição presente em todos os continentes, definida como um índice de massa corporal (IMC) acima de 30, associada à resistência à insulina, diabetes, doenças coronárias, doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), hipertensão, certas formas de câncer e distúrbios respiratórios do sono. DHGNA é ligada à lesão hepática, podendo causar inflamação com fibrose progressiva, esteato-hepatite e até carcinoma hepatocelular (CHEN *et al.*, 2014b; FATHI *et al.*, 2015; KOPELMAN, 2000) (Figura 4). O desequilíbrio energético entre consumo superior ao gasto de energia leva ao ganho de peso. Abordar estratégias nutricionais que podem afetar a homeostase energética e resultar em perda de peso é de grande importância.

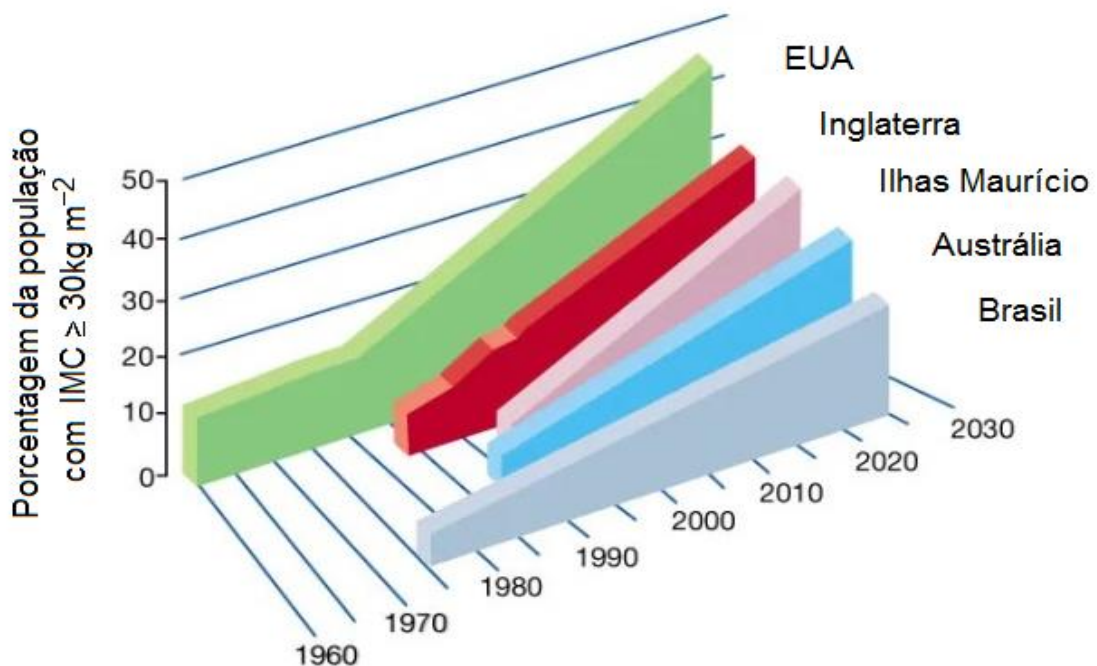
URDANETA *et al.* (2007) estudaram a propriedade nutracêutica do *kefir* em ratos Wistar alimentados por 22 dias através de dosagens das enzimas e proteínas presentes no intestino dos animais. Concluíram que *kefir* afetou a atividade enzimática intestinal e a absorção de nutrientes, pois houve diminuição significativa nos teores de glicose, inibição da captação de D-galactose, aumento do ácido úrico, aumento de aminopeptidase N e diminuição de dipeptidil peptidase IV. Não houve

⁵ A obesidade pode ser definida como uma doença na qual o excesso de gordura corporal se acumulou, de forma que a saúde pode ser afetada adversamente (KOPELMAN, 2000).

diferenças significativas para taxas de crescimento, peso corporal e peso dos órgãos (fígado, intestino, estômago, pâncreas), assim como sacarase, maltase, proteínas totais, colesterol, HDL, triacilglicerol, potássio, cloro e magnésio. A adição de *kefir* a uma dieta normal pode beneficiar a digestão de proteínas e baixar o índice glicêmico.

CHEN *et al.* (2014b) investigaram o consumo do *kefir* no metabolismo lipídico hepático na síndrome do fígado gordo em camundongos Ob/Ob e concluiu que houve redução na gordura do tecido hepático através da inibição da via da lipogênese, indicando que *kefir* pode ser usado na modulação ou tratamento da DHGNA.

Figura 4 - Taxas de prevalência de obesidade históricas, atuais e projetadas (IMC ≥ 30 kg/m²) para os Estados Unidos, Inglaterra e País de Gales, Ilhas Maurício, Austrália e Brasil entre 1960 e 2025



Fonte - KOPELMAN, 2000.

Uma pesquisa realizada por FATHI *et al.* (2015) fez um estudo controlado randomizado do efeito do *kefir* comercial e do leite na perda de peso em 75 mulheres na pré-menopausa com sobrepeso ou obesidade, submetidas a uma dieta rica em laticínios e sem restrição de energia por de 8 semanas. Constataram que as

mulheres que receberam *kefir* e leite apresentaram reduções significativamente maiores de peso, IMC e circunferência da cintura (CC) em comparação ao grupo controle, porém não houve diferenças significativas entre os grupos de *kefir* e leite.

2.4.11 Efeitos na desordem gastrointestinal

A maioria dos casos de constipação crônica em adultos é de causa indefinida e pode ser classificada em constipação de trânsito normal, constipação de trânsito lento e distúrbios da evacuação (obstrutivos) (LEMBO; CAMILLERI, 2003).

Um estudo feito por MAEDA *et al.* (2004a) investigou o efeito de *kefir* em diferentes concentrações na constipação em ratos Sprague-Dawley SD induzidos por dieta pobre em fibras por 30 dias. Encontraram aumentos significativas nos níveis de umidade fecal e peso úmido das fezes, melhorando a defecação e diminuindo a constipação, em comparação com o grupo de controle.

Já BEKAR *et al.* (2011) fez um estudo duplo-cego randomizado sobre o efeito do *kefir* conjugado com a terapia tripla a na erradicação da bactéria *Helicobacter pylori* em 82 pacientes com dispepsia e infecção por *H. pylori*. Utilizaram por 14 dias, duas vezes ao dia, um inibidor da bomba de prótons e dois antibióticos em conjunto com 250 mL de *kefir* ou leite. *Kefir* diminuiu os efeitos adversos relacionados à terapia tripla e aumentou as taxas de erradicação da *H. pylori*: 78,2% para o grupo *kefir* e 50,0% para o grupo placebo.

Na pesquisa de TURAN *et al.* (2014) avaliaram o consumo de *kefir* comercial em 20 pacientes com constipação crônica por 2 semanas sobre os sintomas de trânsito no cólon e índice de satisfação intestinal. Concluíram que os pacientes tiveram melhora significativa na consistência das fezes, no aumento do índice de satisfação intestinal em 85% dos pacientes, maior frequência de defecação e trânsito colônico mais curto.

2.5 KEFIR COM LEITE DE OVELHA

Por sua composição com alto teor de proteínas, vitaminas, gordura e sólidos totais, o leite de ovelha apresenta ótimas condições para processamento em produtos lácteos com alto rendimento. O setor de queijos de ovinos é quem mais utiliza dessas qualidades para produzir queijos de alto valor agregado para consumidores exigentes (BALTHAZAR *et al.*, 2017). O iogurte de leite de ovelha pode ser considerado um alimento com baixo risco aterogênico e trombogênico por possuir lipídeos saudáveis (BALTHAZAR *et al.*, 2016a e 2017).

Kefir feito a partir de leite de ovelha apresenta níveis de antioxidantes mais altos do que aquele feito de leite de vaca, e os grãos de *kefir* têm maior potencial para produzir peptídeos com capacidade antioxidante verificados pela eliminação dos radicais 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS) (YILMAZ-ERSAN *et al.*, 2018). *Kefir* tem composição microbiológica e química que harmoniza o efeito probiótico inerente às bactérias, leveduras e compostos formados. Esses compostos bioativos afetam positivamente a saúde e fortalecem a visão que *kefir* que faz jus ao investimento nas pesquisas laboratoriais e clínicas sobre suas propriedades nutraceuticas.

No Brasil, *kefir* é feito em produção familiar com fermentação natural com grãos doados, sem controle de temperatura e tempo de fermentação (ROSA *et al.*, 2017). Potencializar os benefícios da matriz ovina através do processamento em *kefir* é oferecer ao consumidor a possibilidade de melhoria e manutenção da saúde através das propriedades inerentes a esse produto único, que possui grande potencial como alimento funcional.

3. JUSTIFICATIVA

A possibilidade das propriedades benéficas do *kefir* serem potencializadas na matriz ovina, uma vez que esta já apresenta a baixa alergenicidade e melhor digestibilidade em comparação ao leite bovino, desperta interesse investigativo. Mostra-se uma excelente alternativa para utilização industrial de leite de ovelha e fornecimento de um alimento altamente nutritivo. No entanto, os benefícios funcionais da matriz alimentar ovina permanecem inexplorados pela indústria de laticínios.

Os produtos lácteos são consumidos em todas as classes sociais, fazendo com que a inserção do *kefir* de leite de ovelha seja um nicho de mercado para atender aos consumidores preocupados com a saúde, pois é seguro e pode ser facilmente incorporado à dieta. Apesar da industrialização do leite de ovelha ser ínfima, essa matriz desperta interesse devido ao seu alto rendimento, excelente qualidade, sabor e aroma peculiares no processamento de derivados.

Percebe-se que comércio de lácteos de origem ovina é muito promissor, na medida em que há uma lacuna na indústria de ovinos leiteiros de produtos de alto valor agregado, o que contribui para sua possibilidade de expansão. Para tal, são necessários estudos que elucidem os mecanismos de ação dos efeitos benéficos à saúde, atenuando a progressão de doenças crônicas ou promovendo positivamente a saúde humana. É importante frisar que há apenas poucos estudos sobre *kefir* e um número ainda menor estudos sobre *kefir* de leite ovelha, e que nenhum estudo avaliou o impacto da substituição da sacarose por diferentes tipos de açúcares. Este cenário corrobora para um tema de pesquisa atual e necessário com importância da aplicação científica, social e de inovação, aprofundando os conhecimentos sobre o tema. Seus resultados poderão gerar aplicações de relevância econômica e tecnológica.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição de diferentes tipos de açúcares (sacarose, açúcar demerara, açúcar mascavo, frutose, açúcar de coco e mel) nas propriedades tecnológicas, funcionais, microbiológicas e sensoriais de *kefir* a base de leite de ovelha desnatado.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar contagens microbianas (*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. e leveduras) e teste de atividade antagonista de patógenos nas amostras de *kefir*;
- Fazer análise de microestrutura por microscopia eletrônica de varredura;
- Quantificar o substrato lactose e os metabólitos ácido láctico, ácido acético e etanol;
- Determinar pH, perfil de compostos voláteis, perfil de ácidos graxos e índices de saúde;
- Investigar os compostos bioativos de atividade antioxidante DPPH, atividade de inibição da enzima conversora de angiotensina ECA, inibição de α -amilase e inibição de α -glicosidase;
- Averiguar atividade anticarcinogênica em diferentes linhagens celulares;
- Determinar aceitação sensorial e perfil emocional dos consumidores.

5. CAPÍTULO 1 - SHEEP MILK KEFIR SWEETENED WITH DIFFERENT SUGARS: SENSORY ACCEPTANCE AND CONSUMER EMOTION PROFILING

O artigo científico intitulado “*Sheep milk kefir sweetened with different sugars: Sensory acceptance and consumer emotion profiling*” foi submetido ao *Journal of Dairy Science* no mês de abril de 2020, aceito em agosto de 2020 e publicado em janeiro de 2021.



Sheep milk kefir sweetened with different sugars: Sensory acceptance and consumer emotion profiling

Cristiane P. Larosa,¹ Celso F. Balthazar,² Jonas T. Guimarães,² Ramon S. Rocha,^{1,2} Ramon Silva,^{1,2} Tatiana C. Pimentel,³ Daniel Granato,⁴ Maria Carmela K. H. Duarte,² Marcia C. Silva,¹ Mônica Q. Freitas,¹ Adriano G. Cruz,^{1*} and Erick A. Esmerino²

¹Departamento de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), 20270-021, Rio de Janeiro, Brazil

²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense (UFF), 24230-340 Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

³Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Paraná (IFPR), Paranavai, Paraná, 87703-536, Brazil

⁴Food Processing and Quality, Production Systems Unit, Natural Resources Institute Finland (Luke), FI-02150 Espoo, Finland

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the sensory acceptance and emotional profile of sheep milk kefir sweetened with different sugars (demerara sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar, and honey, 100 g/L). Consumers (n = 100) assessed sensory acceptance (appearance, aroma, taste, texture, and overall impression), and expressed their emotions (satisfied, active, loving, calm, comfortable, energetic, happy, healthy, refreshing, disgusted, worried, and upset). The emotions “satisfied,” “active,” “comfortable,” “energetic,” “healthy,” and “refreshing” were found between moderate and very high levels, indicating that they are important emotions for the characterization and sensory acceptance of kefir samples. The use of different sugars had no influence on the intensity of the emotions “calm,” “comfortable,” “happy,” or “disgusted,” and resulted in a greater sense of satisfaction. The use of demerara sugar or fructose did not alter the acceptance of the products or the intensity of emotions. The use of brown sugar decreased acceptance (taste, texture, and overall impression) and the intensity of the emotions “active,” “loving,” “energetic,” “healthy,” and “refreshing.” The use of coconut sugar decreased acceptance (appearance, aroma, and taste) and the intensity of the emotions “refreshing” and “upset.” The use of honey improved acceptance in appearance and aroma but reduced the intensity of the emotions “active,” “loving,” “energetic,” and “healthy.” Based on sensory data, it is recommended to use demerara sugar or fructose as a substitute for sucrose. In conclusion, the study of emo-

tions can be used as an additional tool for obtaining data related to the sensory acceptance of products.

Key words: sheep milk, kefir, sugar, sensory acceptance, emotion profiling

INTRODUCTION

Kefir is a fermented milk product prepared from the fermentation of milk (cow, goat, camel, sheep, or buffalo) by heterolactic microorganisms present in kefir grains or commercial starter cultures (Mittra and Ghosh, 2020). Kefir consumption is associated with several health benefits (Bourrie et al., 2018; Wang et al., 2019). In recent years, there has been a greater demand for products in which sucrose is replaced by sugars with greater nutritional value and possible beneficial health effects (Asghar et al., 2019). The most studied nonconventional sugars are demerara sugar (obtained from semirefined sugar cane; Curi et al., 2017), brown sugar (obtained from unrefined sugar cane; Curi et al., 2017), sugar from coconut sap (Asghar et al., 2019), honey (produced by bees; Nascimento and Mondal, 2017), and fructose (present in fruits; Nascimento and Mondal, 2017).

Worldwide, cow milk is the most consumed milk, and presented a production of 683.2 million tons in 2018. Thus, 81% of the world milk production is derived from cattle, followed by milks from other species, such as buffalo (15.1%), goat (2.2%), sheep (1.3%), and camel (0.4%; FAO, 2020). Sheep milk consumption is at 10.6 million t/yr, and the population of sheep is at 1.2 billion (Cannas et al., 2019; FAO, 2020). The market for sheep milk dairy products has increased due to the quality of the products, high yield, and nutritional value, as sheep milk presents higher concentrations of fats, proteins, vitamins, and minerals compared with the milks of other domestic species (Balthazar et al., 2017). Sheep milk is commonly used to produce fine cheeses, yogurts,

Received April 11, 2020.

Accepted August 24, 2020.

*Corresponding author: food@globlo.com

and beverages (Balthazar et al., 2019), and its use as raw material for kefir processing could be an interesting alternative.

Regardless of the health benefits that a product may provide, its sensory acceptance is a determining factor for its inclusion in the daily diet (O'Brien et al., 2017). However, there is no consensus that high sensory acceptance is sufficient to predict a product's commercialization potential or its life cycle and success in the market (Jiang et al., 2014). The positive emotions evoked by food products can increase the pleasure of consumption, promote their purchase, and dominate the decision to repurchase and include them in the regular diet (Canetti et al., 2002). In addition, specific emotions can be a critical factor in differentiating food products that have similar characteristics, prices, and packaging (Jiang et al., 2014). Studies involving the relationship between emotions evoked during consumption and sensory acceptance or discrimination of food products are still scarce (Jiang et al., 2014). Nonetheless, none of these studies have explored the analysis of kefir sweetened with different sugars. Following the technological need of new sheep milk-based foods, the aim of this study was to determine sensory acceptance and to explore consumers' emotions about sheep milk-based kefir sweetened with different sugars (demerara sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar, and honey).

MATERIALS AND METHODS

Kefir Manufacture

Frozen pasteurized sheep milk (-18°C) was combined with skim milk powder (35 g/L) and 100 g/L of sugars. The mixture was heat-treated in a water bath at 90°C for 3 min and cooled to 25°C . Then, 10 mL/L of the activated (1 g/100 mL, 24 h, 25°C) starter culture (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* spp., and *Saccharomyces bayanus*, Lyofast MT 030 LV, Sacco, Campinas, Brazil) were added, and the mixture was fermented at 25°C for 24 h (Montanuci et al., 2012). Thereafter, the kefir samples were homogenized and stored in polystyrene bottles for 1 d. The kefir formulations were prepared in 3 batches (10 L each), one after the other. Six kefir formulations were prepared with different sweeteners: sucrose (SUC), demerara sugar (DEM), brown sugar (BSG), fructose (FRU), coconut sugar (COC), and honey (HON).

Sensory Acceptance

Consumers were recruited through personal contact and invitations via social media, and individuals who

were healthy, consumed fermented dairy products, had already consumed sheep milk or sheep milk dairy products, and had available time for the sensory analyses were selected. One hundred regular consumers of fermented dairy products (45% men, 55% women; aged 18–64 years; mean age: 26 years) participated in the sensory acceptance test. All of the participants consumed yogurts, fermented milks, or fermented whey beverages at least 3 times a week.

Sensory analyses were performed in individual sensory cabins located at the Food Department of the Federal Institute of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). Kefir samples (30 mL) were randomly coded and served in a random and monadic manner. Consumers received the 6 formulations one at a time, and they assessed product acceptance (appearance, aroma, taste, texture, and overall impression) using a 9-point hedonic scale (García-Gómez et al., 2019; Fidelis et al., 2020). Then, the consumers received the 6 formulations again, one at a time, and they were asked to express their physical feelings or psychological emotions using 12 terms, of which 9 were positive (satisfied, active, loving, calm, comfortable, energetic, happy, healthy, and refreshing) and 3 negative (disgusted, worried, and upset), using a 5-point scale (1 = nothing, 2 = slightly, 3 = moderately, 4 = very, and 5 = extremely, O'Brien et al., 2017). A glass of water and biscuits were provided for cleansing the palate during evaluation of the different kefir formulations.

Statistical Analyses

Data were submitted to one-way ANOVA, and Tukey's test was used to compare the means ($P < 0.05$). Principal component analysis was performed using a matrix of 6 rows (treatments) and 12 columns (number of emotions) with confidence ellipses using the bootstrapping technique with 500 resampling, meaning 500 virtual panels were built. Analysis was performed in XLSTAT 2020 software (Addinsoft, Paris, France).

RESULTS AND DISCUSSION

Sensory Acceptance

Sensory acceptance data are shown in Figure 1. The mean acceptance scores of kefir samples were between 5.03 and 8.45 for appearance, aroma, taste, texture, and overall impression, indicating that consumers were indifferent to some formulations and very fond of others. The use of DEM or FRU resulted in similar sensory acceptance ($P > 0.05$) compared with SUC. Thus, from the sensory standpoint, it is possible to replace sucrose with demerara or fructose.

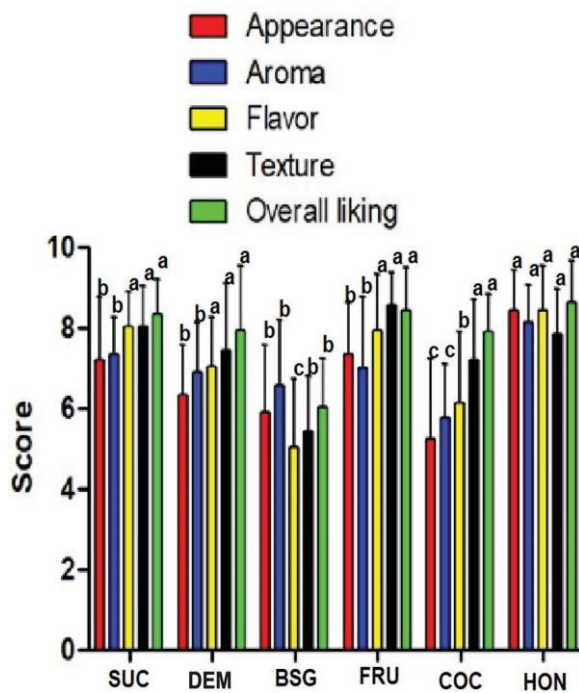


Figure 1. Sensory acceptance (appearance, aroma, flavor, texture, and overall liking) of experimental kefir fermented milk formulations. Values are expressed as mean \pm SD ($n = 100$ consumers). ^{a-c}The same lowercase letters indicate lack of statistical difference ($P > 0.05$) for the same sensory attribute. SUC = sucrose, DEM = raw demerara sugar, BSG = brown sugar, FRU = fructose, COC = coconut sugar, HON = honey.

Use of BSG decreased acceptance of the products (taste and texture), with a consequent decrease in the overall impression ($P < 0.05$) compared with SUC. Decreased acceptance of taste may be related to the greater acidity of the products with BSG compared with SUC (pH 4.33 vs. 4.62). In fact, the pronounced acidic taste in kefir is the main negative attribute cited by consumers. Therefore, products with less acidity are generally more accepted by consumers (O'Brien et al., 2017). Products with a lower pH and greater acidity generally have higher viscosity, because the greater acidity leads to contraction of the casein micelle, which, in turn, results in a firmer and more cohesive structure (Montanuci et al., 2012). Thus, the greater acidity and firmness of products with added BSG contributed negatively to consumer acceptance of the products. Use of COC decreased acceptance of appearance, aroma, and taste ($P < 0.05$) but had no influence ($P > 0.05$) on the overall impression. Coconut sugar is a natural ingredient obtained from coconut tree sap, marketed in the form of large crystals with a brownish color (Curi et al., 2017). Its brownish color may be the factor responsible for decreased acceptance of appearance for our COC kefir. The decrease in taste may be related

to the greater acidity of the products with added COC compared with SUC (pH 4.35 vs. 4.62). The higher concentration of *Lactobacillus* (8.69 vs. 7.73 log cfu/g) may have resulted in the formation of aromatic compounds

that contributed negatively to the aroma. However, lower acceptance of the appearance, aroma, and taste did not decrease the overall impression of the products.

Finally, use of honey increased ($P < 0.05$) the mean scores of appearance and aroma but had no influence ($P > 0.05$) on the overall impression of our HON kefir. The use of honey in kefir can make the product more yellowish (Coskun and Karabulut Dirican, 2019). In addition, adding honey to kefir formulations may enhance the formation of acetaldehyde and aromatic compounds during fermentation, in which case the end product may contain floral and fruity aromas (Fiorda et al., 2016). Thus, the more yellowish color and the possible improvement in the aroma compounds may have contributed positively to the acceptance of HON kefir.

Emotional Profiles

The emotions evoked by the kefir samples sweetened with different sugars are shown in Table 1. Results showed that kefir samples evoked the analyzed emotions differently in terms of intensities. The attributes "loving," "calm," "happy," "disgust," "worried," and "upset" were observed in levels between "absent" and "slight" (values between 1 and 2), indicating that they were not associated with the kefir samples. It is important to mention that the low values attributed to negative emotions (disgust, worried, and upset) suggest that consumers did not dislike kefir samples (O'Brien et al., 2017). The attributes "satisfied," "active," "comfortable," "energetic," "healthy," and "refreshing" were between "moderate" and "very high" levels (values between 3 and 4), indicating that they are important attributes. In fact, kefir samples are characterized as beverages with an acidic taste, a mild aroma of fresh yeast, natural effervescence, and a slightly alcoholic sensation (Montanuci et al., 2012). In addition, they are recognized as being healthy (O'Brien et al., 2017).

The use of different sugars had no influence ($P > 0.05$) on the intensity of the attributes "calm," "comfortable," "happy," or "disgusted," with an increase in the intensity of "concerned" and "satisfied" ($P < 0.05$, except for "satisfied" for DEM) observed. Sucrose is the main sweetener agent used in the food industry, as it does not present bitter or residual taste (Costa et al., 2019). Consumers are increasingly concerned with health, and, thus, the interest in consuming healthy foods is a current issue. In this context, there is demand to replace sucrose with healthier sugars (Curi et al.,

Table 1. Emotions evoked by consumers considering kefir fermented milks with different sugars¹

Sweetener ²	Satisfied	Active	Loving	Calm	Comfortable	Energy	Happy	Healthy	Refreshing	Disgust	Worried	Upset
SUC	3.14 ^c ± 0.04	3.91 ^b ± 0.03	2.38 ^a ± 0.06	1.71 ^a ± 0.01	3.90 ^a ± 0.05	4.76 ^a ± 0.10	1.76 ^a ± 0.06	4.86 ^b ± 0.11	4.93 ^b ± 0.21	1.60 ^b ± 0.03	1.84 ^b ± 0.03	1.86 ^a ± 0.05
DEM	3.02 ^c ± 0.06	4.88 ^a ± 0.11	2.52 ^a ± 0.04	1.66 ^a ± 0.04	3.83 ^b ± 0.10	4.71 ^b ± 0.19	1.69 ^a ± 0.05	4.91 ^a ± 0.19	4.95 ^b ± 0.15	1.36 ^b ± 0.06	1.91 ^a ± 0.04	1.97 ^m ± 0.05
BSG	3.90 ^{ab} ± 0.04	2.67 ^c ± 0.05	1.40 ^b ± 0.06	1.66 ^a ± 0.06	3.81 ^b ± 0.11	3.67 ^b ± 0.17	1.47 ^m ± 0.04	3.04 ^c ± 0.15	3.08 ^c ± 0.14	1.57 ^{ab} ± 0.06	1.98 ^a ± 0.09	1.93 ^a ± 0.09
FRU	4.36 ^a ± 0.06	4.86 ^a ± 0.07	2.47 ^m ± 0.02	1.78 ^a ± 0.09	3.90 ^a ± 0.08	4.66 ^a ± 0.15	1.97 ^m ± 0.07	4.97 ^a ± 0.22	3.88 ^{ab} ± 0.14	1.36 ^b ± 0.07	1.83 ^b ± 0.08	1.93 ^a ± 0.10
COC	4.95 ^a ± 0.08	3.84 ^{ab} ± 0.09	2.45 ^a ± 0.03	1.67 ^m ± 0.07	3.79 ^b ± 0.07	4.69 ^a ± 0.19	1.74 ^a ± 0.08	3.83 ^{ab} ± 0.18	3.67 ^b ± 0.10	1.43 ^b ± 0.02	2.02 ^a ± 0.07	1.03 ^b ± 0.01
HON	3.64 ^b ± 0.01	3.48 ^b ± 0.10	1.24 ^b ± 0.03	1.52 ^a ± 0.04	3.55 ^b ± 0.08	3.66 ^b ± 0.09	1.48 ^a ± 0.06	3.78 ^b ± 0.09	3.81 ^{ab} ± 0.08	1.67 ^{ab} ± 0.03	2.09 ^a ± 0.08	1.05 ^b ± 0.04

^{a-c}The same lowercase letters in the same column represent lack of statistical difference ($P > 0.05$).

¹Results are expressed as mean ± SD (n = 100 consumers).

²SUC = sucrose, DEM = raw demerara sugar, BSG = brown sugar, FRU = fructose, COC = coconut sugar, HON = honey.

2017). The substitution of sucrose for different sugars may have altered the profile of sweet taste, which may have caused slight concern among consumers (increase in values from 1.84 to 1.91–2.09) but significantly contributed to the increase in satisfaction (increase in values from 3.14 to 3.64–4.95).

The use of either DEM or FRU resulted in similar (P

> 0.05) emotions compared with SUC. These results corroborate the sensory acceptance test. In turn, the use of BSG decreased ($P < 0.05$) the intensity of the attributes “active,” “loving,” “energetic,” “healthy,” and “refreshing.” Kefir sweetened with BSG garnered lower mean acceptance scores for taste, texture, and overall impression (Figure 1). Possibly, the greater acidity and viscosity of this product resulted in lower intensities for the attributes “energy” and “refreshment.” Similarly, the use of COC decreased ($P < 0.05$) the intensity of “refreshing” and “upset.” The results corroborate those observed for sensory acceptance (Figure 1), in which kefir sweetened with COC garnered lower ($P < 0.05$) mean acceptance scores for appearance, aroma, and taste. The greater acidity of this sample may have decreased the feeling of freshness. The use of honey in kefir decreased ($P < 0.05$) the intensity of the attributes “active,” “loving,” “energetic,” “healthy,” and “upset.” The positive effects of HON kefir observed on the acceptance of its appearance and aroma could not be observed in the assessment of emotions evoked during consumption. On the contrary, HON showed lower intensity of several emotional attributes. Emotions that weakly correlate with the sensory acceptance of a product are of special interest, as they transmit undisclosed information about the product formulation. Thus, although HON kefir presented a higher acceptance (appearance and aroma), it evoked less intense emotion (active, loving, energetic, healthy, and upset) compared with our SUC kefir.

Figure 2 shows the principal component analysis bi-dimensional map, with confidence ellipses, in which are reported 79.16% of the data variability, with 61.83 and 17.33% at the first and second dimensions, respectively. Overall, 2 groups clearly exist: the first group (BSG, COC, and HON) associated with the emotions “satisfied,” “worried,” and “disgust,” and the second (SUC, DEM, and FRU) associated with the emotions “refreshing,” “upset,” “healthy,” “active,” “energy,” “comfortable,” “loving,” “happy,” and “calm.” Confidence ellipses indicate that the SUC and DEM samples strongly overlapped; the SUC and FRU, and SUC and BSG samples slightly

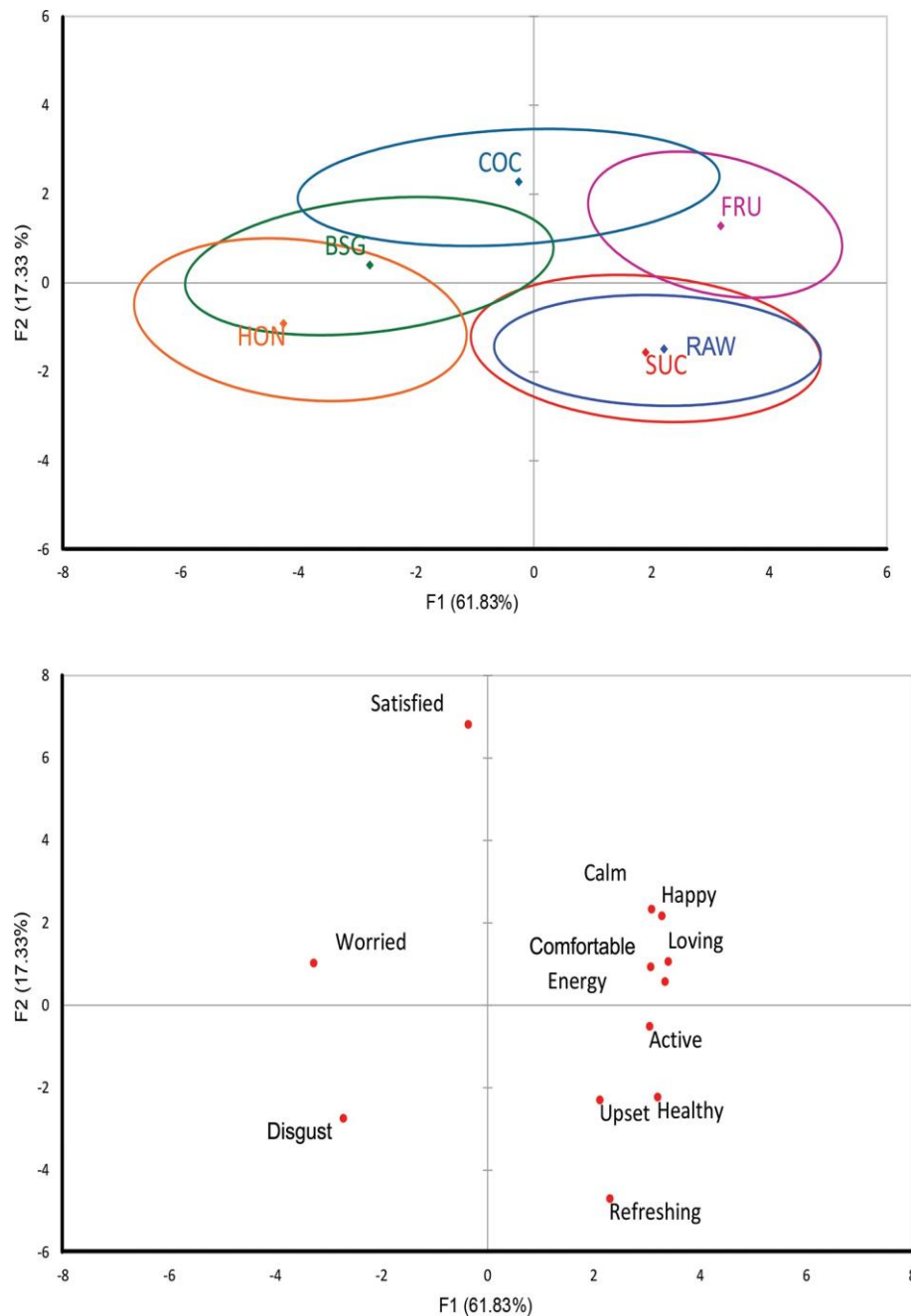


Figure 2. Representation of the kefir sample formulations and the emotional attributes in bidimensional maps of the principal component analysis from emotional questionnaire. SUC = sucrose, DEM = raw demerara sugar, BSG = brown sugar, FRU = fructose, COC = coco nut sugar, HON = honey, F1 and F2 = first and second dimensions, respectively.

CONCLUSIONS

The results of the present study are relevant for the sheep milk dairy industry, as they indicate that emotional perceptions and sensory acceptance of kefir sweetened with different agents are directly correlated. Kefir samples with higher sensory acceptance scores were associated with higher intensities of “satisfied,”

“active,” “comfortable,” “energetic,” “healthy,” and “refreshing” feelings. Based on sensory characteristics, we recommend using demerara sugar or fructose as a substitute for sucrose. The evaluation of emotions evoked by products can be an important tool to obtain additional information that can be used for product optimization and market strategies by the sheep milk industry.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil (CAPES), Finance Code 001. The authors are grateful to the Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPQ), Fundação de Amparo a Pesquisa no Rio de Janeiro (FAPERJ), and the Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Brazil, for financial support. The authors have not stated any conflicts of interest.

REFERENCES

- Asghar, M. T., Y. A. Yusof, M. N. Mokhtar, M. E. Ya'acob, H. M. Ghazali, L. S. Chang, and Y. N. Manaf. 2019. Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. *Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1002/fsn3.1191>.
- Balthazar, C. F., T. C. Pimentel, L. L. Ferrão, C. N. Almada, A. Santillo, M. Albenzio, N. Mollakhalili, A. M. Mortazavian, J. S. Nascimento, M. C. Silva, M. Q. Freitas, A. S. Sant'Ana, D. Granato, and A. G. Cruz. 2017. Sheep milk: Physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16:247–262. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12250>.
- Balthazar, C. F., A. Santillo, J. T. Guimarães, V. Capozzi, P. Russo, M. Caroprese, R. Marino, E. A. Esmerino, R. S. L. Raices, M. C. Silva, H. L. A. Silva, M. Q. Freitas, D. Granato, A. G. Cruz, and M. Albenzio. 2019. Novel milk–juice beverage with fermented sheep milk and strawberry (*Fragaria × ananassa*): Nutritional and functional characterization. *J. Dairy Sci.* 102:10724–10736. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16909>.
- Bourrie, B. C., P. D. Cotter, and B. P. Willing. 2018. Traditional kefir reduces weight gain and improves plasma and liver lipid profiles more successfully than a commercial equivalent in a mouse model of obesity. *J. Funct. Foods* 46:29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.039>.
- Canetti, L., E. Bachar, and E. M. Berry. 2002. Food and emotion. *Behav. Processes* 60:157–164. [https://doi.org/10.1016/S0376-6357\(02\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S0376-6357(02)00082-7).
- Cannas, A., L. O. Tedeschi, A. S. Atzori, and M. F. Lunesu. 2019. How can nutrition models increase the production efficiency of sheep and goat operations? *Anim. Front.* 9:33–44. <https://doi.org/10.1093/af/vfz005>.
- Coskun, F., and L. Karabulut Dirican. 2019. Effects of pine honey on the physicochemical, microbiological and sensory properties of probiotic yoghurt. *Food Sci. Technol. (Campinas)* 39(Suppl. 2):616–625. <https://doi.org/10.1590/fst.24818>.
- Costa, G. M., M. M. Paula, C. E. Barão, S. J. Klososki, E. G. Bonafé, J. V. Visentainer, A. G. Cruz, and T. C. Pimentel. 2019. Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. *Int. Dairy J.* 97:139–148. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.05.007>.
- Curi, P. N., C. D. S. Carvalho, D. L. Salgado, R. Pio, M. Pasqual, F. B. M. D. Souza, and V. R. D. Souza. 2017. Influence of different types of sugars in physalis jellies. *Food Sci. Technol. (Campinas)* 37:349–355. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.08816>.
- FAO. 2020. FAOSTAT: Compare data. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Accessed Jun. 12, 2020. <http://faostat.fao.org/>.
- Fidelis, M., S. M. De Oliveira, J. S. Santos, G. B. Escher, R. S. Rocha, A. G. Crus, M. A. V. Do Carmo, L. Azevedo, T. Kaneshima, W. Y. Oh, F. Shahidi, and D. Granato. 2020. From byproduct to a functional ingredient: Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seed extract as an antioxidant agent in a yogurt model. *J. Dairy Sci.* 103:1131–1140. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17173>.
- Fiorda, F. A., G. V. de Melo Pereira, V. Thomaz-Soccol, A. P. Me-deiros, S. K. Rakshit, and C. R. Soccol. 2016. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. *Lebensm. Wiss. Technol.* 68:690–697. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.003>.
- García-Gómez, B., A. Romero-Rodríguez, L. Vázquez-Odériz, N. Muñoz-Ferreiro, and M. Vázquez. 2019. Sensory quality and consumer acceptance of skim yoghurt produced with transglutaminase at pilot plant scale. *Int. J. Dairy Technol.* 72:388–394.
- Jiang, Y., J. M. King, and W. Prinyawiwatkul. 2014. A review of measurement and relationships between food, eating behavior and emotion. *Trends Food Sci. Technol.* 36:15–28. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.12.005>.
- Mitra, S., and B. C. Ghosh. 2020. Quality characteristics of kefir as a carrier for probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Int. J. Dairy Technol.* 73:384–391. <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12664>.
- Montanuci, F. D., T. C. Pimentel, S. Garcia, and S. H. Prudencio. 2012. Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk Kefir. *Food Sci. Technol. (Campinas)* 32:850–865. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000119>.
- Nascimento, M., and A. Mondal. 2017. Microbial ecology of confectionary products, honey, sugar, and syrups. Pages 533–546 in *Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- O'Brien, K., C. Boeneke, W. Prinyawiwatkul, J. Lisano, D. Shackelford, K. Reeves, M. Christensen, R. Hayward, K. C. Ordóñez, and L. K. Stewart. 2017. Sensory analysis of a kefir product designed for active cancer survivors. *J. Dairy Sci.* 100:4349–4353. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12320>.

6. CAPÍTULO 2 – CAN SUCROSE-SUBSTITUTES INCREASE THE ANTAGONISTIC ACTIVITY AGAINST FOODBORNE PATHOGENS AND IMPROVE THE TECHNOLOGICAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF SHEEP MILK KEFIR?

O artigo científico intitulado “*Can sucrose-substitutes increase the antagonistic activity against foodborne pathogens and improve the technological and functional properties of sheep milk kefir?*” foi submetido ao *International Journal of Food Microbiology* no mês de abril de 2020, cujo texto formatado de acordo com as normas do periódico segue abaixo.

Can sucrose-substitutes increase the antagonistic activity against foodborne pathogens and improve the technological and functional properties of sheep milk kefir?

Cristiane P. Larosa¹, Celso F. Balthazar², Jonas T. Guimarães², Larissa P. Margalho³, Felipe S. Lemos⁴, Felipe L. Oliveira⁴, Yuri K.D. Abud⁵, Celso Sant'Anna⁵, Maria Carmela K.H. Duarte², Daniel Granato⁶, Renata S.L. Raices¹, Monica Q. Freitas², Anderson S. Sant'Ana^{3*}, Erick Almeida Esmerino^{2,7}, Tatiana C. Pimentel⁸, Marcia Cristina Silva¹, Adriano G. Cruz²

¹Federal Institute of Science and Technology Rio de Janeiro (IFRJ), Food Department, 20270-021, Rio de Janeiro, Brazil.

²Federal Fluminense University (UFF), Faculty of Veterinary, 24230-340, Niterói, RJ, Brazil.

³Department of Food Science, Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil.

⁴Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Institute of Biomedical Sciences, 21941-902 -

Rio de Janeiro, Brazil

⁵Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Inmetro), Duque de Caxias 25250-020, Rio de Janeiro, Brazil

⁶Food Processing and Quality, Production Systems Unit, Natural Resources Institute Finland (Luke), FI-02150 Espoo, Finland

⁷Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFFRJ), 23890-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

⁸Federal Institute of Paraná (IFPR), 87703-536, Paranavaí, Brazil

*Corresponding author: Prof. Anderson S. Sant'Ana. E-mail: and@unicamp.br

Rua Monteiro Lobato, 80. CEP: 13083-862, Campinas, São Paulo – Brazil.

Abstract

The effect of different types of sugar (sucrose, demerara, brown, fructose, coconut sugar, and honey) on sheep milk kefir was evaluated. Microbial counts (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, yeast), antagonistic activity against foodborne pathogens, microstructure (scanning electron microscopy), and anticancer activity were evaluated. Furthermore, the antioxidant activity (DPPH), ACE, α -amylase, and α -glucosidase inhibitory activities, concentrations of substrates (lactose) and metabolites (lactic acid, acetic acid, ethanol), fatty acid profile and volatile compounds were determined. The addition of sugars increased the *Lactobacillus* population (up to 2.24 log CFU/mL), metabolites concentration, antagonistic activity against pathogens, antioxidant activity (11.1 to 24.1%), ACE inhibitory activity (27.5 to 37.6%), α -amylase inhibition (18 to 37.4 %), and anti-cancer activity.

Furthermore, it improved the fatty acid profile and volatile compounds. The results suggest that the replacement of sucrose with different types of sugar constitute an interesting option to be used in sheep milk kefir formulations.

Kew-words: anticancer activity, pathogens, sugar substitute, bioactive compounds.

1. Introduction

Kefir is a viscous fermented milk, slightly effervescent, and with acid taste, and characteristic flavor due to the presence of yeasts (Bengoa et al., 2019). Kefir has been reported to contain 0.5 to 2% alcohol, presence of carbon dioxide, and pH of 4.6 (Farag et al., 2020). Cow, goat, camel, sheep or buffalo milk can be used for the production of kefir, which is fermented by microorganisms from kefir grains or commercial starter cultures, including lactic acid bacteria (*Lactococcus*, *Lactobacillus*, and *Leuconostoc*), acetic acid bacteria, and yeasts (Farag et al., 2020). In particular, sheep milk has higher concentrations of proteins, fats, minerals, and vitamins when compared to milk from other domestic species, thus being an interesting raw material for the production of kefir (Balthazar et al., 2016). However, studies on the kefir production using sheep milk are still scarce in the literature (Lima et al., 2018; Kiss et al., 2019).

The consumption of kefir has been associated to several health benefits, such as reduction of the risk of obesity (Choi et al., 2017), gut microbiome modulation and improvement in the lipid profile (Bourrie, Cotter, & Willing, 2018), and improved immunological properties (Davras, Guzel-Seydim, & Tas, 2018). Furthermore, kefir can act on different types of cancer, such as malignant T lymphocytes, colorectal cancer, lung carcinoma, and breast cancer (Sharifi et al., 2017). Finally, kefir has

antimicrobial activity against several pathogens (Sindi, Badsha, Nielsen, & Ünlü, 2020). However, conflicting results on the efficiency of kefir against cancer cells and pathogens have been reported (Kim et al., 2016).

The higher incidence of several diseases including diabetes, obesity, hypertension, and heart disease has increased the consumer concern with the intake of traditional sugar (sucrose), leading to an increased demand for products without sucrose (Asghar et al., 2019). However, the exclusion of sucrose from kefir has been related to low consumer acceptance (Ertekin, Zeynep & Guzel-Seydim, 2009, Nogueira et al., 2016), consequently, sucrose has been added to the commercialized products (Magodrive, 2020) or those evaluated in scientific studies (Montanuci, Garcia & Prudencio, 2010, Almeida et al., 2011, Vimercati et al., 2020). In this way, there is a demand for products containing sugars with greater nutritional value and health benefits aiming substitution of sucrose (Asghar et al., 2019).

Demerara sugar is obtained from sugar cane and undergoes slight refinement, without the addition of chemical additives, presenting a higher nutritional value when compared to sucrose, while brown sugar is an unrefined sugar obtained from sugar cane, with a dark color, strong molasses flavor, and a higher concentration of phytochemicals when compared to sucrose (Curi et al., 2017). Coconut sugar is an unrefined sugar obtained from coconut sap, containing a higher concentration of minerals, vitamins, short-chain fatty acids, polyphenols, and antioxidants (Asghar et al., 2019). Finally, honey is the natural sweet substance produced by bees (*Apis mellifera*) from nectar, secretions, or excretions from plant-sucking insects and consists mainly of fructose and glucose, being fructose the natural sugar present in fruits and vegetables (Nascimento & Mondal, 2016).

Prebiotics are food components that confer health benefits to the host associated with the modulation of the microbiota (Gibson et al., 2017). The prebiotic components most used in dairy products are inulin-type fructans and galactooligosaccharides, which showed ability to increase the microbial population in fermented products, mainly the counts of probiotic cultures (da Silva et al., 2020). Previous studies have reported the ability of honey (Sarkar & Chandra, 2020), and brown sugar (Gurpilhares et al., 2019) in improving microbial population in fermented dairy products, but the impact of coconut sugar and demerara sugar utilization has not been reported.

The technological, functional, and microbiological properties of kefir depend on several factors, including the type of milk used, culture (grains or commercial starter cultures), ingredients (the type of sugar, milk powder, etc.) and the manufacturing technology (Farag et al., 2020). Sugar addition can improve the sensory acceptance of the products by consumers; however, it can inhibit the microbial activity and, consequently, the impact on the functional properties (Costa et al., 2019). To the best of our knowledge, no study has evaluated the impact of substituting sucrose for different types of sugar in kefir. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of the addition of different types of sugar (sucrose, demerara sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar, and honey) on the microbial viability, antagonistic activity against pathogens, and technological and functional properties of sheep milk kefir.

2. Material and methods

2.1 Activation of kefir starter culture

The freeze-dried starter culture (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc* spp. and *Saccharomyces bayanus*, Lyofast MT 030 LV, Sacco®) was activated in skimmed milk (1 g/100 mL, 24 h, 25 °C) and stored into 10 mL flasks, which were subsequently frozen (-18 °C) until use, according to the manufacturer's instructions. This kefir starter culture is commonly used to produce commercially kefir fermented milks in Brazil and have already been applied in previous studies (Montanuci et al., 2012, Bakhshandeh & Pourahmad, 2013).

2.2 Kefir Processing

A mixture containing pasteurized sheep milk (82.4 g/100 g moisture, 5.9 g/100 g fat, 1.0 g/100 g ash, 5.0 g/100 g lactose, 5.7 g/100 g protein), 35 g/L of skimmed milk powder, and 100 g/L of the respective sugar was heat-treated in a water bath at 90 °C for 3 min and cooled to 25 °C. The skimmed milk powder was used to increase the total solids content and improve the texture properties of the product. The concentration of sugars was based on the typical sugar addition to yogurts (Januário et al., 2017; Costa et al., 2019) and kefir (Montanuci, Garcia & Prudencio, 2010). Then, 10 mL/L of the starter culture was added, and fermentation was carried out at 25 °C for 24 h (Montanuci et al., 2012). The sheep milk kefir was homogenized and stored in polystyrene bottles at 4 °C for 28 days. The storage conditions were chosen based on the commercialization temperature and shelf life of yogurts and fermented milks.

Six kefir formulations were prepared, as follows: KI (with sucrose, União, Rio de Janeiro, Brazil, from sugar cane, refined, submitted to clarification), KII (demerara sugar, União, Rio de Janeiro, from sugar cane, slight refinement, no clarification), KIII (brown sugar, União, Rio de Janeiro, Brazil, from sugar cane, no refinement, no clarification), KIV (fructose, Linea, Rio de Janeiro, Brazil, from fruits), KV (coconut sugar, Vila Salute, São Paulo, Brazil, from coconut sap, no refinement, no clarification), and KVI (honey, BomMel, São Paulo, Brazil, produced by bees, predominant flowering of wild flowers).

2.3 Lactococcus, Leuconostoc, Lactobacillus and yeast counts

Lactococcus spp. counts were performed using M17-lactose agar (Difco®) and incubation under aerobic conditions at 37 °C for 48 h (Satir & Guzel-Seydim, 2015). *Leuconostoc* spp. were determined in APT agar (Merck®) supplemented with sucrose (100 g/L) and sodium azide (0.05 g/L) and aerobic incubation at 22 °C for 4 days (Montanuci et al., 2012). *Lactobacillus* spp. counts were performed using MRS agar (Merck®) and incubation under anaerobic conditions at 37 °C for 48 h (Satir & Guzel-Seydim, 2015). Yeasts were enumerated using acidified potato agar (Merck®) (pH 3.5) and incubation under aerobic conditions at 25 °C for 5 days (Satir & Guzel-Seydim, 2015).

2.4 Pathogen-antagonistic activity

The antagonistic activity of the sheep milk kefir was evaluated using pathogenic strains as indicator cultures, as follows: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* spp. ATCC 12325, and *Bacillus cereus* ATCC 33019, according to Romeiro (2005), with modifications. The indicator strains were previously activated in Brain

Heart Infusion broth (BHI, Acumedia® 7116A) at 37 °C for 24 h, subjected to the Gram staining procedure, and the slides were examined under an immersion microscope aiming verify the accuracy of the cultures. Subsequently, the bacterial concentration was adjusted to an optical density equal to 0.5 McFarland standards (10^8 CFU/mL). To check the initial concentration of the inoculum under study, 1 mL of the dilutions were transferred to Petri dishes containing MacConkey Sorbitol agar (Acumedia®) for *E. coli*, and Oxford Selective Listeria agar (Merck®) for *L. monocytogenes* and the counts enumerated after 24 and 48 h after aerobic incubation at 37 °C. The spread plate method was used by inoculating 0.1 mL of the dilutions on Baird-Parker Agar selective agar (Merck®) for *S. aureus*, bismuth sulfite agar (BSA) for *Salmonella* spp., and Mannitol egg Yolk Polymyxin agar (MYP Merck®) for *B. cereus*, and the counts enumerated after 24 and 48 h after aerobic incubation at 37 °C.

The kefir samples were centrifuged at 10000 x g for 20 min at 4 °C. Then, the cell-free supernatants were pH-adjusted to 7.0 using 5 M NaOH to neutralize the effect of organic acids. Then, they were filtered with a 0.22 mm pore size filter. With the aid of a swab, the samples with indicators were spread on plates in the Mueller Hinton agar surface. Then, four equidistant wells were used to inoculate the kefir extracts (30 µL) to perform the well-diffusion antagonism assay. The plates were incubated at 37 °C for 24-48 h for later observation of the formation of inhibition halos, which were measured with the aid of a halometer (mm).

2.5 Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was performed according to Chen et al. (2009). The kefir samples were fixed in 30 g/L glutaraldehyde in 0.1 M phosphate

buffer (pH 7.0) at 25 °C for 4 h. Following that, they were washed in 3 changes of buffer and post-fixed with 10 g/L osmium tetroxide in the same buffer at 25 °C for 1 h. After washing in distilled water, the samples were dehydrated in an ethanol series: 15, 30, 50, and 70% for 10 min each; 85 and 95% for 15 min each; and 100% for 1 h. The resulting specimens were then critical-point dried (CO₂ Critical Point Dryer Samdri-PVT-3B, Tousimis, Rockville, MD), covered with a fine layer of gold while applying a current of 40 mA, and observed by SEM (JSM-6300, Jeol Ltd.).

2.6 pH values, substrate, and metabolites contents

The pH was determined by a potentiometric measurement using a standard hydrogen electrode (AOAC, 2002). Lactic acid, acetic acid, lactose, and ethanol were quantified using a High-Performance Liquid Chromatography (Gul et al., 2015).

2.7 Volatiles profiling

The volatile compounds were extracted by solid phase microextraction (SPME) and identified by gas chromatography (AGILENT TECHNOLOGIES, model 5975C) coupled with mass spectrometry, according to the methodologies described by Ferreira et al. (2019) and Cappato et al. (2018). The identification of volatile compounds was carried out by comparing the results with the computer data system NIST (National Institute of Standards & Technology, USA). The final identification of the volatile compounds was made by comparing the spectrum of the samples with the reference spectra present in the computer library.

2.8 Fatty acid profile and health indices

The fat from the sheep milk kefir was extracted according to the methodology described by Balthazar et al. (2016). The fatty acid profile was analyzed by gas chromatography (7890A, Network GC System, Agilent Technologies, Santa Clara,

CA), mass spectrometry (5975C, Network GC System, Agilent Technologies®) using a CP Wax 52 Capillary CB column (60 m long, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm film; J & W Scientific/Agilent Technologies®). The operating conditions were helium as a carrier gas with a flow rate of 1 mL/min; injection temperature of 250 °C; detector temperature of 270 °C; injection volume of 1 µL (split ratio 1:10). The ramp temperature was programmed as follows: initial temperature of 70 °C for 10 min, from 70 to 80 °C to 5 °C/min for 1 min, followed by a temperature increase of 10 °C/min to 240 °C for 30 min. The identification of fatty acids was based on the comparison of retention times with those of fatty acids methyl esters containing linoleic acid geometric isomers of c9t11 and t10c12 (189-19 and O-5626, Sigma, USA) and equivalent chain length (ECL) (Sperry et al., 2018). The atherogenic index (AI, Sperry et al., 2018, Eq. 1), thrombogenic index (TI, Sperry et al., 2018, Eq. 2), desired fatty acids index (DFA, Barlowska et al., 2018, Eq.3), and hypercholesterolemic saturated fatty acids index (HSFA, Barlowska et al. al., 2018, Eq. 4) were calculated.

$$AI = (C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0)/[\Sigma MUFA + \Sigma PUFA(n-6) \text{ and } (n-3)] \text{ (Eq. 1)}$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[0.5 \times \Sigma MUFA + 0.5 \times \Sigma PUFA(n-6) + 3 \times \Sigma PUFA(n-3) + (n-3)/(n-6)] \text{ (Eq. 2)}$$

$$DFA = MUFA + PUFA + C18:0 \text{ (Eq. 3)}$$

$$HSFA = C12:0 + C14:0 + C16:0 \text{ (Eq. 4)}$$

2.9 Antioxidant activity, and ACE, α -amylase, and α -glucosidase inhibition activity

The antioxidant activity of sheep milk kefir was determined as described by Ferreira et al. (2019). The Angiotensin-Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity was determined according to the methodology described by Ayyash et al. (2018).

The inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes was evaluated according to the methodology described by Ayyash et al. (2018) and Ferreira et al. (2019).

2.10 Anti-cancer activity

For the evaluation of anti-cancer activity, the kefir pH was adjusted using 1M HCl or 1 M NaOH to pH 4.6 and centrifuged at 10000 x g for 15 min at 4 °C. Then, the supernatants were filtered through a syringe filter of 0.45 μ m. The anticarcinogenic activity was determined according to Ayyash et al. (2018). The cell lines HT29 (human colon adenocarcinoma), CACO-2 (human epithelial colorectal adenocarcinoma), DU145 (human prostate cancer), PCa (prostate cancer) and HepG2 (human hepatocellular carcinoma) were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (Inmetro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All cells were cultured in 25 cm² flasks individually (5.0×10^6 cells/flask) and kept in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), pH 7.4, under atmosphere 5% CO₂. Each cell line was cultured for 48 h in contact with the isolated medium (control) or with the different extracts of kefir formulations. The objective was to evaluate the anticancer activity, therefore, we used as control the same cells but without the kefir extract. As we used a commercial kefir culture, the safety aspects (normal cells) were not used. The same procedure was used by Ayyash et al. (2018).

Each extract of kefir formulation was used individually in the culture system (1 mL of kefir extract + 1 mL of medium). Subsequently, the supernatant of each condition was collected, and the cells were detached with trypsin at room temperature. After centrifugation, the cells were resuspended in 0.5 mL of PBS (phosphate-buffered saline) containing 5% FBS and 50 μ g/mL of propidium iodide

(PI, Sigma-Aldrich, USA). After 15 min of incubation, the cell suspension was analyzed by flow cytometry in a flow cytometer (FACSCalibur®, Becton Dickinson, USA). The PI⁺ and PI⁻ cells were considered as dead and viable cells, respectively. The software CellQuest was used for analysis.

2.11 Statistical analysis

The experiment was performed in a completely randomized design and it was repeated three times. The results of fatty acid profile, volatiles profiling, scanning electron microscopy and anti-cancer activity did not change during the storage time, therefore, only the data of day 1 were presented. The results of the metabolites, bioactive compounds, and microbial counts were presented on days 1, 14, and 28 of storage. All data were submitted to Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey's means comparison test ($p < 0.05$) and they were analyzed using the XLSTAT 2019.4 software (Adinsoft, Paris, France).

The Principal Component Analysis (PCA) was performed through a matrix of 6 rows (formulations) and 27 columns (number of variables). In PCA, confidence ellipses were built using the bootstrap technique (with 500 resampling). Hierarchical clustering analysis (HCA) was done using the coordinates of the samples in the first and second dimensions of PCA map, considering Euclidean distances (dissimilarity), Ward's method (agglomeration method) and automatic truncation. The quality of the dendrogram was evaluated by the cophenetic correlation coefficient (Silva et al., 2020).

3. Results and discussion

3.1 Microbial counts

Figure 1 shows the microbial counts of the sheep milk kefir samples. The formulations showed microbial viability in the following range (log CFU/mL): *Lactococcus* (7.09-9.87), *Lactobacillus* (7.42-9.66), yeasts (6.15-9.16), and *Leuconostoc* (7.03-9.28 log CFU/mL) (Figure 1). On the 1st day of storage, the type of sugar used in the preparation of kefir had a significant effect on the microbial viability ($p < 0.05$), with decreases in the viability of *Lactobacillus* in the products with honey (KVI), decreases in the *Lactococcus* in the products with demerara sugar (KII), and increases in the yeasts in the products with brown sugar (KIII, $p < 0.05$) compared to the product with sucrose (KI). Furthermore, the presence of coconut sugar (KV) increased the *Lactobacillus* counts ($p < 0.05$) compared to KI. Therefore, the effect of the unconventional sugars on the microbial viability during the fermentation process was dependent on the type of sugar used. *Lactococcus* has a high ability to metabolize lactose and produce lactic acid and tends to grow faster than the other microorganisms in milk during fermentation. The produced lactic acid changes the environment to a more favorable for yeast growth. Then, yeasts synthesize and/or release important compounds for bacteria growth (vitamin B, peptides, and amino acids), and they use oxygen and produce ethanol. The interaction among the different microorganisms may be stimulated or inhibited and is dependent on the available nutrients (Leite et al., 2013). *Saccharomyces* strains are recognized by their resistance to high concentrations of sugar and ethanol (Miguel et al., 2013), which can be associated to the similar counts found in almost all kefir formulations after fermentation. On the other hand, the concentration of sugar and

ethanol may have a significant impact on the viability of *Lactobacillus* and *Lactococcus* (Bengoa et al., 2019). Therefore, the results suggest that the type of unconventional sugar and the ethanol concentration may increase or decrease the survival of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in the products.

On the 14th day of storage, the use of unconventional sugars increased the viability of *Lactobacillus* ($p < 0.05$ except KVI), while a decrease in *Lactococcus* (except KV), *Leuconostoc* (only KIV), and yeasts (except KIII) was observed ($p < 0.05$), compared to the product with sucrose (KI). The addition of demerara sugar increased the *Leuconostoc* counts at this storage time ($p < 0.05$). Finally, at the 28th day of storage, no significant effect of the addition of unconventional sugars was observed on the microbial viability compared to KI ($p > 0.05$), except an increase in *Leuconostoc* provided by the addition of honey (KVI) and in the yeasts by brown sugar (KIII). These results indicate that the use of unconventional sugars (except honey) led to an increase in *Lactobacillus* during the storage time (until 14 days) compared to the product with sucrose.

During storage, there was an increase in the microbial viability in all evaluated formulations and for all types of microorganisms. The microorganisms can withstand and grow even at refrigerated storage. This is result of the consumption of sugars present in the medium, mainly lactose (Costa et al., 2019).

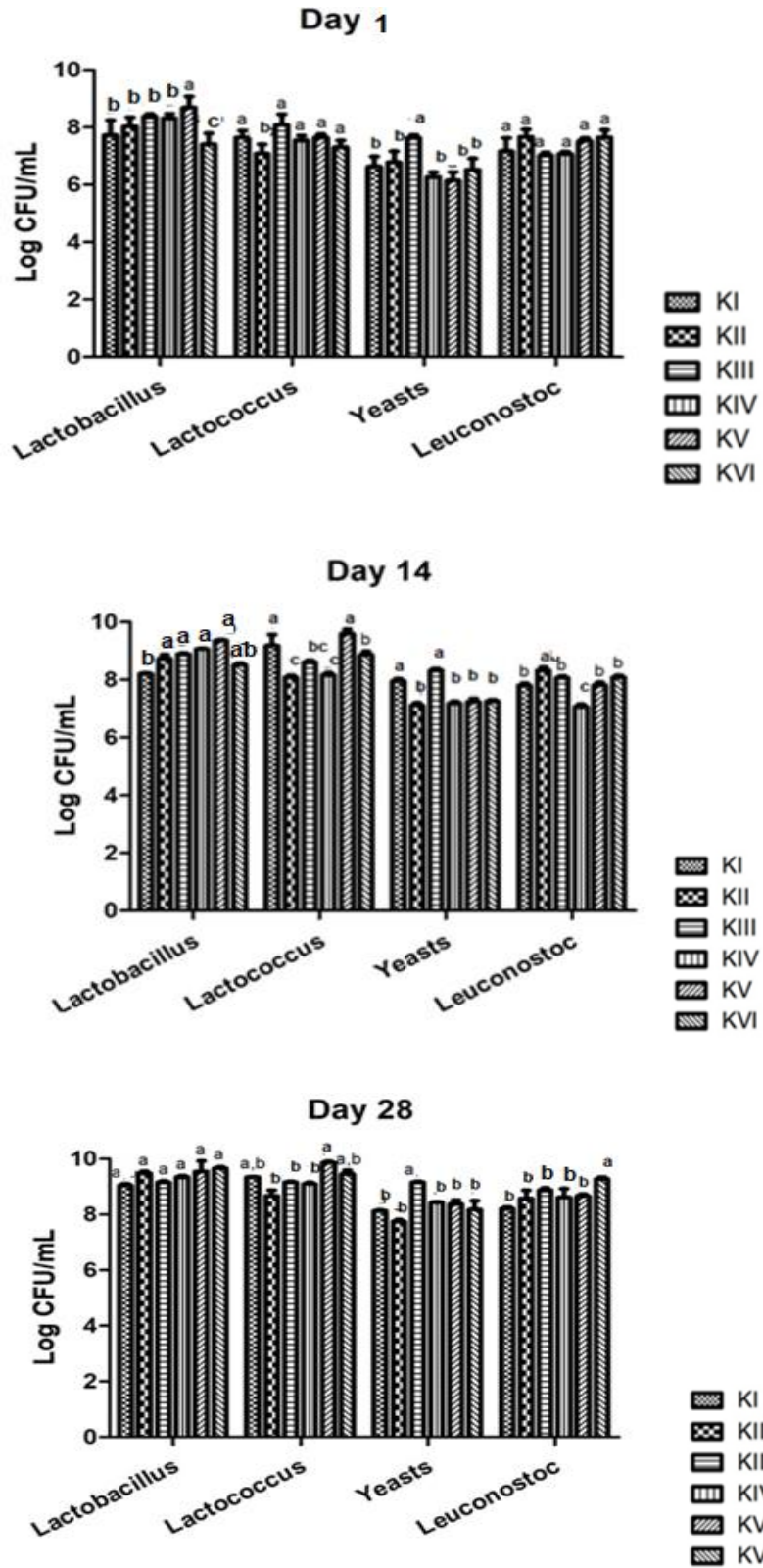


Figure 1. Viable count (log CFU/mL) in sheep Kefir formulations (n=6). Formulations: KI (sucrose), KII (demerara sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey). Different letters in the same group indicate significant differences between samples (p<0.05).

3.2 Scanning electron microscopy

Figure 2 shows the SEM images of the sheep milk kefir samples. The microbiological composition of the sheep milk kefir formulations consists of a high density of *Lactococcus* (green arrow), *Leuconostoc* (red arrow), and long *Lactobacillus* (purple arrow). Short *Lactobacillus* could also be visualized distributed in the matrix. *Lactococcus* was the most visualized microorganism, which is in accordance with its highest population (7.09-9.87 log CFU/mL, Figure 1). Bengoa et al. (2020) also reported that the genera that showed higher abundance in kefir were *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, and *Acetobacter*. The lower visualization of *Lactobacillus* in the images can be associated to their higher ability to embed in void spaces of the protein matrix (Toba et al., 1990, Prado et al., 2015). Chen et al. (2008) reported that short-chain *Lactobacillus*, yeasts, and *Lactococcus* are commonly observed distributed in the matrix, while long-chain *Lactobacillus* are commonly observed in spaces between protein molecules.

Figure 3 shows the pH values and the lactic acid, acetic acid, lactose, and ethanol contents of the sheep milk kefir samples along the storage time. pH values ranged from 4.18 to 4.62, lactic acid from 8.26 to 11.42 mg/mL, acetic acid from 1.08 to 3.47 mg/mL, lactose from 3.02 to 3.80 g/100 mL, and ethanol from 1.02 to 1.92 mg/mL (Figure 3, day 1). All kefir formulations with unconventional sugars exhibited a lower pH when compared with the product made with the addition of sucrose ($p < 0.05$) at day 1 of storage, while no significant differences were observed at day 28 ($p > 0.05$). At the same time, a decrease in the pH values during storage was observed in all formulations ($p < 0.05$). These findings are due to the metabolic activity of the microorganisms during storage, with the production of

organic acids, thus leading to a decrease in pH (Montanuci et al., 2012). The greater viability of *Lactobacillus* in the products with unconventional sugars in the first weeks of storage (Figure 1, except honey) may be associated to the lower pH values observed.

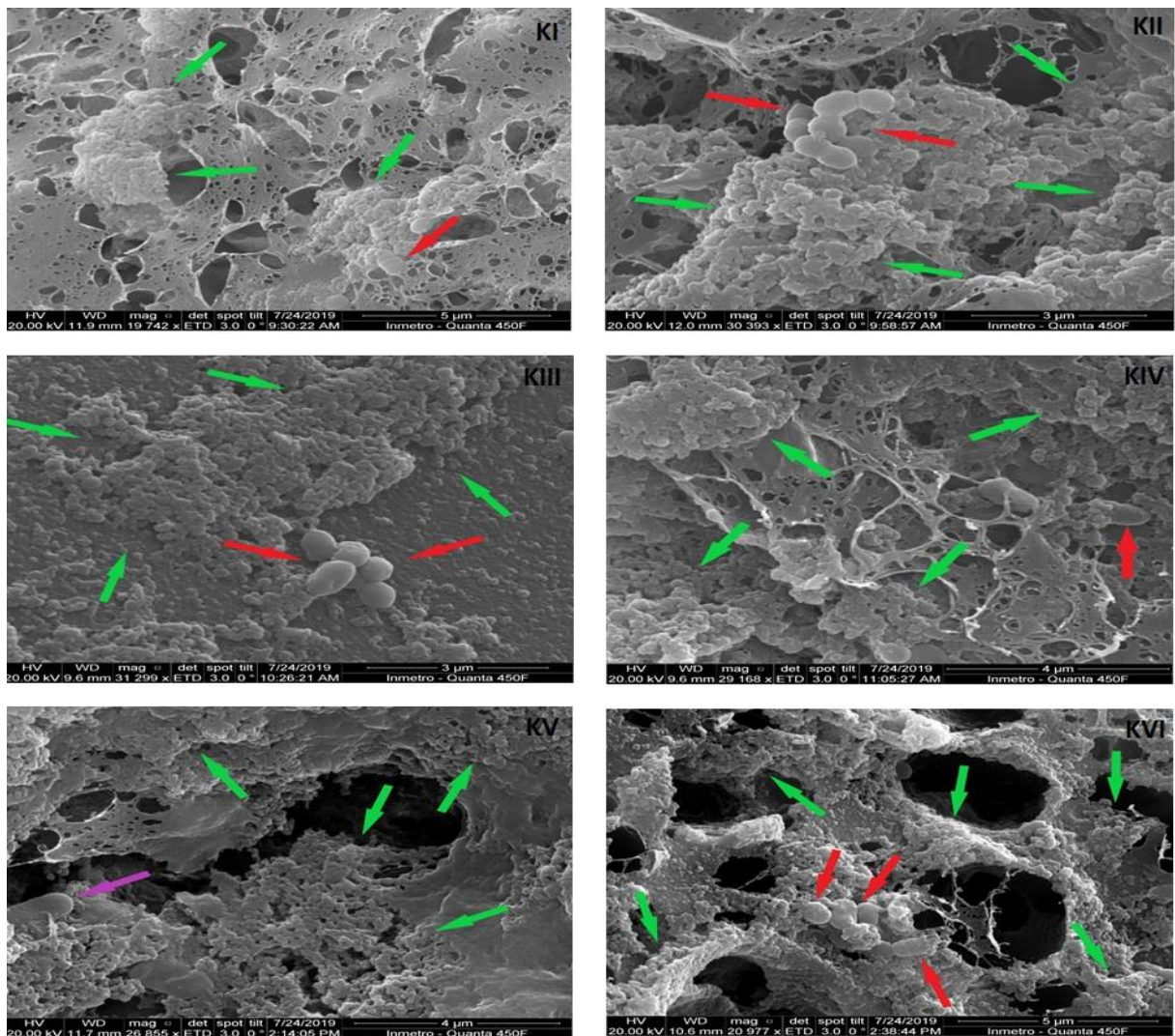


Figure 2. Scanning electron microscopy (SEM) of the sheep Kefir formulations. Green arrow – *Lactococcus*; Red arrow – *Leuconostoc*; Purple arrow - *Lactobacillus*. Formulations: KI (sucrose), KII (raw sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey).

3.3 pH , and lactic acid, acetic acid, lactose, and ethanol values

The formulation with the addition of fructose (KIV) presented a concentration of metabolites similar to the product made with sucrose during all the storage time ($p > 0.05$). This similarity resulted in products with similar consumer acceptance to the sucrose-added one (Larosa et al., 2020). The use of demerara sugar (KII) resulted in fermented milk with lower concentrations of lactic acid, acetic acid, and ethanol when compared to the product with the addition of sucrose (KI, $p < 0.05$, except day 28). The lower *Lactococcus* counts (Figure 1) may have contributed to the lower metabolites' levels. The lower content of organic acid and ethanol did not impact on the sensory acceptance of the products by consumers ($p > 0.05$), with KII and KI formulations presenting similar scores (Larosa et al., 2020).

The use of coconut sugar (KV) resulted in a higher lactic acid concentration during the first 14 days of storage ($p < 0.05$), due to the greater *Lactobacillus* viability in this product (Figure 1). The higher acidity resulted in a decrease in the consumer acceptance in the taste, but without impact on the overall impression. Furthermore, this product was considered less refreshing (Larosa et al., 2020). The formulation with the addition of honey (KVI) presented a higher concentration of acetic acid during the entire storage period. Probably, the lower concentrations of *Lactococcus* (day 14), *Lactobacillus* (day 1), and yeasts (day 14) (Figure 1) in kefir made with the addition of honey improved the action of acetic-acid bacteria, leading to the production of acetic acid. However, the higher concentration of acetic acid did not impact negatively on the consumer acceptance of the products (Larosa et al., 2020).

The use of brown sugar (KIII) decreased the concentration of acetic acid ($p < 0.05$). Probably the higher concentrations of yeasts (Figure 1) inhibited the action of acetic-acid bacteria, leading to a lower production of acetic acid. This was associated to a decrease in the consumer acceptance in the taste, and, consequently, in the overall impression. Furthermore, this product was perceived as lower active, loving, energetic, healthy, and refreshing (Larosa et al., 2020).

The results indicate that the use of unconventional sugars can lead to changes in the metabolites produced during the fermentation process and storage time, which is closely related to the changes in the microbiota. During the storage, there was a decrease in lactose levels of kefir-fermented milk, besides an increase in lactic and acetic acids and ethanol levels and the microbial viability ($p < 0.05$) for all formulations evaluated (Figures 1 and 3). The increase in lactic and acetic acids during the refrigerated storage are due to the post-acidification, which is related to the continuous metabolism of lactose by the microbiota present in the product, with the production of lactic and acetic acids and ethanol (Montanuci et al., 2012). These results agree with the increase in the microbial viability in the products during storage (Figure 1).

3.4 In vitro antagonistic activity

The kefir-fermented milk showed antagonistic activity in the following ranges (mm): 3-4.33 (*Listeria*), 0-3.33 (*Salmonella*), 2.33-3 (*E. coli*), and 2.33-2.67 (*Staphylococcus*), with no antagonistic activity observed for *B. cereus*. Purutoğlu et al. (2020) reported that inhibition zones < 2 mm are associated to weak antagonistic activity, 2-5 mm to medium antagonistic activity, and > 5 mm to high antagonistic activity. Therefore, the kefir fermented milk showed medium antagonistic activity. It

is important to mention; however, that the antimicrobial activity in this study was evaluated for the product (kefir fermented milk) and not for the isolated microorganisms, which is commonly found in several studies. The antimicrobial activity of kefir may be due to the production of organic acids (lactic and acetic acids), bioactive peptides, and inhibitory compounds by lactic acid cultures, such as bacteriocins (Bengoa et al., 2019). Lactic acid inhibits the growth of microorganisms due to the decrease in pH, acting as a preservative acidulant (Farag et al., 2020). Likewise, bacteriocins and bioactive peptides induce leakage of cellular materials across the cell membrane of pathogens (Farag et al., 2020).

The type of sugar had no significant effect on the levels of inhibition of *Listeria*, *E. coli*, and *Staphylococcus* ($p > 0.05$). For *Salmonella*, the formulations with the addition of demerara sugar (KII), coconut sugar (KV) and honey (KVI) showed greater antagonistic activity when compared to the others ($p < 0.05$, data not shown). The results indicate that although kefir-fermented milk was not capable of inhibiting *B. cereus*, it exhibited a significant antagonistic effect against *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli*, and *Staphylococcus*. The higher antagonistic effect against *Salmonella* with the use of demerara sugar, coconut sugar, and honey, is possibly due to the higher concentration of organic acids (Figure 2), bioactive peptides, and/or bacteriocins in the products. In addition, the antimicrobial activity of honey is related to its osmotic properties, hydrogen peroxide content, low pH, presence of the bee-derived peptide defensin-1, and polyphenol levels (Valdés-Silverio et al., 2018). The antimicrobial activity of coconut sugar is probably due to the higher concentration of polyphenols (Asghar et al., 2019).

3.5 Volatiles profile

The volatile profiling of kefir samples is shown in Table 1. Fourteen volatile compounds were identified, corresponding to 5 acids, 1 ketone, 5 alcohols, 1 hydrocarbon, and 2 esters. All fermented milk presented acetic acid, butanoic acid, hexanoic acid, ethanol, 1-propanol, 2-methyl-, and 1-butanol, 3-methyl-. These compounds are related to the sweet and floral (hexanoic acid), pungent (acetic acid), buttery (butanoic acid), alcoholic (1-Butanol, 3-methyl-) and effervescent (ethanol) aromas of this type of product (Ranadheera et al., 2019, Farag et al., 2020). The present results suggest that these compounds are inherent to sheep milk kefir.

The use of unconventional sugars (KII, KIII, KIV, KV, and KVI) led to the appearance of octanoic acid, which is responsible for the fruity aroma of fermented milk (Ranadheera et al., 2019). Thus, the use of unconventional sugars contributed slightly to the improvement of the aromatic profile of the products.

The type of sugar affected the volatiles profile of sheep milk kefir. The use of demerara sugar (KII) led to the disappearance of the compounds propanoic acid, 2-oxo (precursor of the diacetyl and acetoin, corresponding to the creamy, sweet, buttery aroma, Ranadheera et al., 2019) and butanoic acid, ethyl ester (aroma of herbs, characteristic of kefir, Farag et al., 2020). The addition of fructose led to the disappearance of 2-pentanol acetate (herbaceous and green aroma) (Hamdan et al., 2020). The use of coconut sugar resulted in the disappearance of the compound 4-Heptanol, 2,6-dimethyl- (fruity and sweet aroma, Kaprasob et al., 2018) and the appearance of hexanoic acid, ethyl ester (aroma of herbs, characteristic of kefir, Farag et al., 2020). The addition of honey to the formulations led to the disappearance of the compound propanoic acid, 2-oxo and the appearance of

hexanoic acid, ethyl ester. Thus, the use of unconventional sugars can lead to slight changes in the volatiles profile of the products. The alterations on the volatile profile resulted in an increase in the consumer acceptance in the aroma for the products added with honey (KVI) compared to the product with sucrose (KI), with no significant differences for the other products (Larosa et al., 2020).

3.6 Fatty acid profile and health indices

The results of the fatty acid profile of the sheep milk kefir are shown in Table 2. All the formulations showed high saturated fatty acids levels (SFA, 84.52-89.71 g/100 g), represented by palmitic acid (27.26-31.36 g/100 g), myristic acid (13.11-15.05 g/100 g), stearic acid (9.02-12.58 g/100 g) and docanoic acid (12.68-15.08 g/100 g). Monounsaturated fatty acids (MUFA) were found in the range of 9.72-14.21 g/100 g, and oleic acid (9.72-11.92g/100 g) was the only representative form. Lower polyunsaturated fatty acids levels (PUFA) were observed (2.49-4.47 g/100 g), being represented by linoleic acid (0.57-1.28 g/100 g), CLA (1.30-2.23 g/100 g), and ALA (0.34-1.33 g/100 g). Concerning the health indices, all sheep milk kefir had intermediate levels of AI (4.86-7.16), TI (6.51-11.0), HSFA (45.16-51.28), and DFA (23.63-27.39).

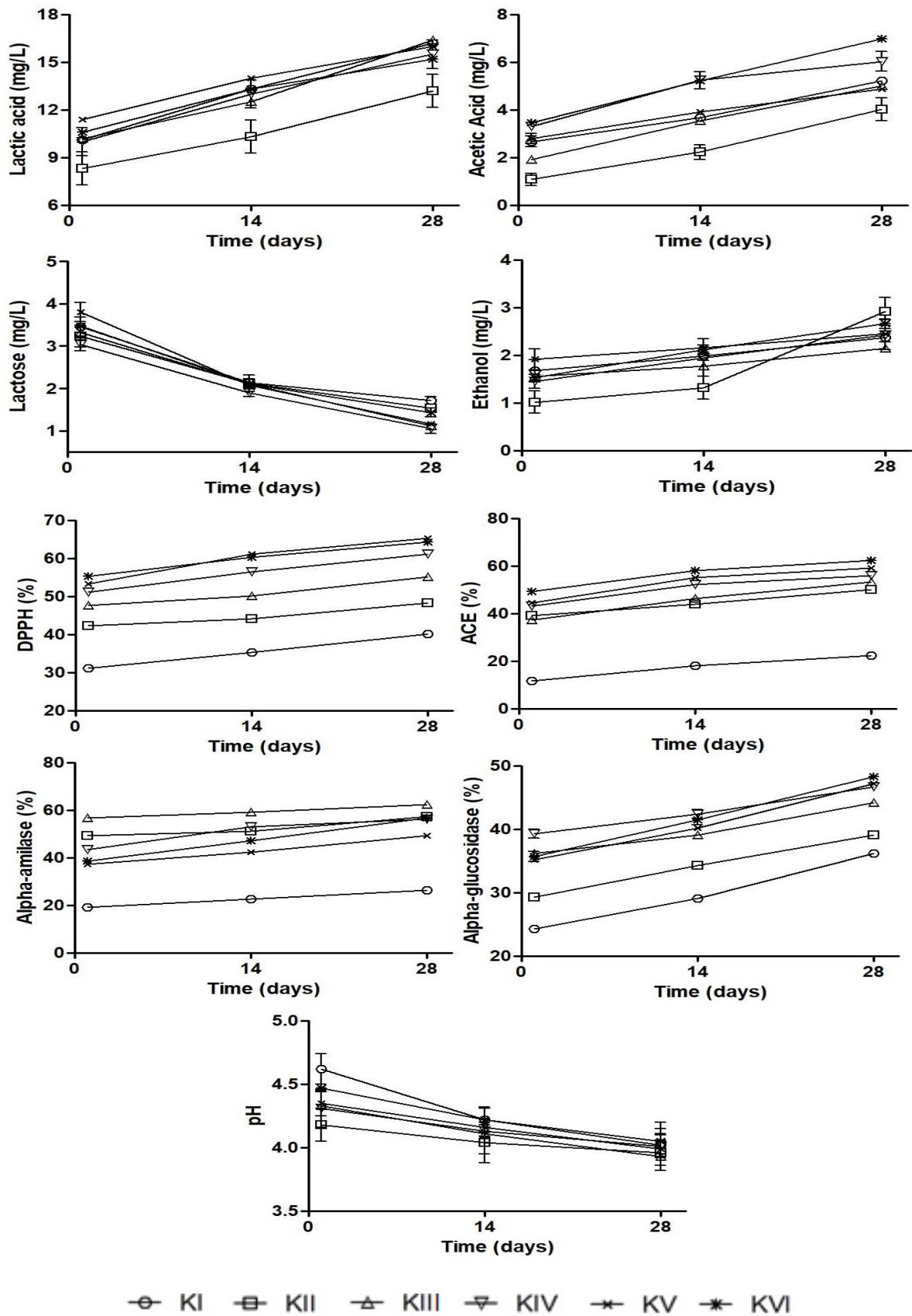


Figure 3. Microbial metabolites (Lactic acid, acetic acid, lactose, ethanol) and bioactive compounds (DPPH, ACE, α -amylase e α -glucosidase inhibitory activities, and pH of the sheep Kefir formulations (n=6). Formulations: KI (sucrose), KII (raw sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey).

The use of unconventional sugars (KII to KVI) increased the PUFA levels when compared to sucrose ($p < 0.05$, KI). These results are due to the increase in linoleic acid, CLA and ALA levels ($p < 0.05$), which was more significant for the formulation containing coconut sugar ($p < 0.05$). Sheep milk kefir made with the addition of unconventional sugars showed a higher concentration of lactic acid bacteria (*Lactobacillus*) (Figure 1), which can explain the increase in PUFA levels, once lactic acid bacteria are able to synthesize unsaturated fatty acids (Kiss et al., 2018). The increase in PUFA levels may contribute to the formation of a creamy aroma in sheep kefir (Farag et al., 2020), and to improve the health properties of the products, once the consumption of PUFA is associated with anti-thrombotic, anti-inflammatory, and antihypertensive effects (Ranky et al., 2017).

Table 1. Volatile compounds profile of the Kefir formulations

Compounds	LRI	Formulations					
		KI	KII	KIII	KIV	KV	KVI
Acids							
Propanoic acid, 2-oxo	1074	X	-	X	X	X	-
Acetic acid	1433	X	X	X	X	X	X
Butanoic acid	1610	X	X	X	X	X	X
Hexanoic acid	1825	X	X	X	X	X	X
Octanoic acid	2039	-	X	X	X	X	X
Total		4	4	5	5	5	4
Ketones							
2-Butanone, 3-hydroxy-	1281	X	X	X	X	-	X
Total		1	1	1	1	0	1
Alcohols							
Ethanol	1068	X	X	X	X	X	X
1-Propanol, 2-methyl-	1095	X	X	X	X	X	X
2-Pentanol, acetate	1120	X	X	X	-	X	X
1-Butanol, 3-methyl-	1195	X	X	X	X	X	X
4-Heptanol, 2,6-dimethyl-	1473	-	X	X	X	-	X
Total		4	5	5	4	4	5
Hydrocarbons							
1-Pentene, 4,4-dimethyl-1,3-diphenyl-1-(trimethylsilyloxy)-	1429	X	-	-	-	-	-
Total		1	0	0	0	0	0
Esters							
Butanoic acid, ethyl ester	1085	X	-	X	X	X	X
Hexanoic acid, ethyl ester	1234	-	-	-	-	X	X
Total		1	0	1	1	2	2
Total		11	10	12	11	11	12

*LRI=Linear Retention Index on CP-Wax 52 CB according to the Van der Dool and Kratz equation. Organized by families. X=presence, -=absence. Formulations: KI (sucrose), KII (raw sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey).

The type of sugar used in the kefir formulations had a significant effect on the fatty acid profile and health indices of the samples ($p < 0.05$). Lower changes in the fatty acids profile were observed for the formulation containing brown sugar (KIII), with a slight decrease in octanoic acid, CLA, and ALA ($p < 0.05$) when compared to the product made with sucrose (KI), resulting in the maintenance of the health indices (AI, TI, DFA, and HSFA) ($p > 0.05$). The use of coconut sugar also resulted in a slight change in the fatty acid profile, and maintenance of health indices ($p > 0.05$). The addition of fructose and honey resulted in changes in most fatty acids ($p < 0.05$) with a negative impact on health indices, once the formulation with fructose (KIV) exhibited lower DFA and higher HSFA levels, while the formulation with honey (KVI) presented lower DFA levels ($p < 0.05$). The use of demerara sugar improved the health indices, with a decrease in AI, TI, and HSFA ($p < 0.05$), which is related to a decrease in stearic and palmitic acids and an increase in oleic, linoleic, and ALA levels ($p < 0.05$). The results indicate that the type of sugar has significant importance in the fatty acid profile and health indices of kefir, with better results observed for demerara sugar.

3.7 Antioxidant activity, and ACE, α -amylase, and α -glucosidase inhibition activity

The antioxidant activity, ACE-inhibitory activity, α -amylase, and α -glucosidase inhibition of the sheep milk kefir samples are showed at the Figure 3. The formulations showed antioxidant activity from 31.2 to 55.3%, ACE inhibitory activity from 11.6 to 49.2%, α -amylase inhibition from 19.3 to 56.7%, and α -glucosidase inhibition from 24.3 to 39.3% (Figure 3). The use of unconventional sugars (KII-KVI) resulted in an improvement in the functional properties of fermented milk, leading to an increase in the antioxidant activity (11.1 to 24.1%), ACE inhibitory activity (27.5

to 37.6%) and α -amylase inhibition (18 to 37.4 %) ($p < 0.05$) when compared to the formulation containing sucrose. The improvement of the functional properties was more pronounced in kefir with coconut sugar (KV) and honey (KVI) for the antioxidant and ACE inhibitory activities ($p < 0.05$), and kefir with demerara sugar (KII), brown sugar (KIII), and fructose (KIV) for the α -amylase inhibition ($p < 0.05$). Regarding the α -glucosidase inhibition, only the formulations KIII, KIV, and KV exhibited an increase in this parameter ($p < 0.05$). The changes in the concentration and type of microorganisms (Figure 1) in the products with unconventional sugars may have increased the metabolic activity of these cultures on the food components, which may have resulted in a higher release of bioactive compounds, such as small peptides or phenolic compounds (Ferreira et al., 2019). Apostolidis et al. (2007) reported that free phenolic compounds and their polymeric forms produced by the microorganisms during fermentation and/or storage of the products can increase the α -amylase and α -glucosidase inhibition. At the same time, the authors reported that the presence of higher concentrations of lactic acid would positively affect the ACE inhibitory activity, mainly because of the action of lactic acid on protein denaturation and modification. This latter aspect can justify the higher ACE inhibitory activity of the products with coconut sugar (KV) and honey (KVI), which presented the highest concentrations of lactic acid (Figure 3). The increase in α -amylase inhibition can lead to a decrease in the hydrolysis of polysaccharides and disaccharides and glucose absorption, contributing to the maintenance of blood glucose levels. The α -amylase inhibition, together with the inhibition of α -glucosidase, has been considered an alternative for the control of diabetes (Ayyash et al., 2018), while the inhibition of

ACE activity is an indicator of the antihypertensive properties of dairy products (Ayyash et al., 2018).

During the storage, there was an improvement of the functional properties of kefir formulations ($p < 0.05$), probably due to the increase in the microbial viability, with the consequent generation of lactic acid (Figure 3) and bioactive compounds (Ayyash et al., 2018). This finding is interesting as suggest the functional potential of the sheep milk kefir. Future studies should evaluate the proteolytic activity of the microorganisms and measure the bioactive peptides produced, as well as the phenolic compounds. In this way, the impact of the different sugars on the functional properties could be better elucidated.

3.8 Anticarcinogenic activity

Figure 4 shows the anti-cancer activities of the sheep milk kefir samples, using different cell lines (HT29, CACO-2, DU145, PCa, and HepG2). All cancer cell lines showed less viability when in contact with different types of kefir ($p < 0.05$) when compared to the control, indicating an anticarcinogenic activity *in vitro*. These results are due to the higher concentration of bioactive peptides in the formulations when compared to the control. The antiproliferative activity of bioactive peptides is associated with competition between these compounds and the growth factor receptors leading to cancer initiation, as well as the specific cytotoxicity of these compounds in cancer cells, inducing apoptosis (Ayyash et al., 2018).

Table 2. Fatty acid profile of the Kefir formulations

Fatty acid profile (g/100 g fat)	Formulations					
	KI	KII	KIII	KIV	KV	KVI
Butanoic (C4:0)	5.08 ^a ± 0.64	5.47 ^a ± 0.42	5.66 ^a ± 0.41	5.13 ^a ± 0.19	5.06 ^a ± 0.22	5.26 ^a ± 0.78
Hexanoic (C6:0)	5.08 ^c ± 0.32	5.45 ^{ab} ± 0.27	5.42 ^{bc} ± 0.24	5.44 ^{ab} ± 0.19	5.55 ^{ab} ± 0.13	5.79 ^a ± 0.24
Octanoic (C8:0)	3.64 ^c ± 0.21	4.18 ^b ± 0.13	3.98 ^b ± 0.21	3.98 ^b ± 0.15	4.72 ^a ± 0.18	4.57 ^a ± 0.19
Docanic (C10:0)	12.68 ^e ± 0.50	14.27 ^{bc} ± 0.63	13.22 ^{de} ± 0.52	13.75 ^{cd} ± 0.47	15.04 ^{ab} ± 0.69	15.08 ^a ± 0.29
Dodecanoic (C12:0)	4.25 ^c ± 0.14	4.79 ^{ab} ± 0.39	4.45 ^{bc} ± 0.41	4.86 ^{ab} ± 0.27	5.19 ^a ± 0.24	5.15 ^a ± 0.24
Myristic (C14:0)	13.59 ^{cd} ± 0.57	13.11 ^d ± 0.41	13.18 ^d ± 0.52	15.05 ^a ± 0.37	14.31 ^b ± 0.17	14.08 ^{bc} ± 0.70
Palmitic (C16:0)	30.32 ^b ± 0.28	27.26 ^d ± 0.38	30.89 ^{ab} ± 1.21	31.36 ^a ± 0.39	28.39 ^c ± 0.95	28.97 ^c ± 0.35
Stearic (C18:0)	12.58 ^a ± 2.21	9.99 ^{bc} ± 0.38	11.28 ^{ab} ± 0.10	10.13 ^{bc} ± 0.07	9.02 ^c ± 0.10	9.82 ^c ± 0.30
Oleic (C18:1)	11.92 ^b ± 2.55	14.20 ^a ± 0.63	10.99 ^{bc} ± 1.13	9.72 ^c ± 0.50	11.67 ^{bc} ± 1.59	10.39 ^{bc} ± 0.79
Linoleic acid (C18:2)	0.86 ^c ± 0.13	1.28 ^a ± 0.04	0.94 ^{bc} ± 0.03	0.57 ^d ± 0.02	1.05 ^b ± 0.11	0.89 ^c ± 0.03
CLA	1.30 ^d ± 0.02	1.30 ^d ± 0.33	1.90 ^b ± 0.04	2.12 ^a ± 0.07	2.23 ^a ± 0.03	1.53 ^c ± 0.02
ALA	0.34 ^d ± 0.03	0.61 ^c ± 0.17	0.54 ^c ± 0.04	1.08 ^b ± 0.04	1.19 ^b ± 0.02	1.33 ^a ± 0.04
Saturated fatty acid (SFA)	87.22 ^{ab} ± 2.67	84.52 ^b ± 0.63	88.06 ^a ± 1.13	89.71 ^a ± 0.51	87.29 ^{ab} ± 1.69	88.72 ^a ± 0.79
Monounsaturated fatty acid (MUFA)	11.92 ^{ab} ± 2.55	14.21 ^a ± 0.63	10.99 ^b ± 1.12	9.72 ^b ± 0.50	11.67 ^{ab} ± 1.59	10.40 ^b ± 0.79
Polyunsaturated fatty acid (PUFA)	2.49 ^d ± 0.11	3.19 ^c ± 0.28	3.38 ^c ± 0.10	3.77 ^b ± 0.11	4.47 ^a ± 0.14	3.75 ^b ± 0.04
AI	6.31 ^{ab} ± 0.98	4.86 ^c ± 0.27	6.16 ^{ab} ± 0.53	7.16 ^a ± 0.24	5.66 ^{bc} ± 0.67	6.34 ^{ab} ± 0.28
TI	9.15 ^{ab} ± 1.99	6.51 ^c ± 0.22	9.33 ^{ab} ± 0.76	11.00 ^a ± 0.48	8.26 ^{bc} ± 1.21	9.40 ^{ab} ± 0.56
DSA	26.99 ^a ± 1.39	27.39 ^a ± 0.98	25.66 ^{ab} ± 1.04	23.63 ^b ± 0.58	25.23 ^{ab} ± 1.78	24.11 ^b ± 0.98
HSFA	48.16 ^b ± 0.76	45.16 ^c ± 0.68	48.52 ^b ± 0.54	51.28 ^a ± 0.26	47.90 ^b ± 1.19	48.20 ^b ± 0.52

* Values are expressed as mean \pm standard deviation (n=6). Similar lowercase letters in the same line do not represent statistical difference (p <0.05). AI = (C12:0 + 4 C14:0 + C16:0)/[Σ MUFA + Σ PUFA(n-6) and (n-3)]; TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[0.5 x Σ MUFA + 0.5 x Σ PUFA(n-6) + 3 x Σ PUFA(n- 3) + (n 3)/(n-6)]; DFA = MUFA + PUFA + C18:0; HSFA = C12:0 + C14:0 + C16:0. Formulations: KI (sucrose), KII (raw sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey).

The sheep milk kefir samples were able to induce death in approximately 40% of HT29 cells (human colon adenocarcinoma), with the most significant effect observed for the formulation containing coconut sugar (KV) (Figure 4A). Likewise, significant toxicity ($p < 0.05$) close to 40% on CACO-2 cells (human epithelial colorectal adenocarcinoma) was observed for the sheep milk kefir, with a greater effect for the formulations with the addition of brown sugar (KIII) and coconut sugar (KV) (Figure 4B). For DU145 cells (human prostate cancer), the formulations with the addition of demerara sugar (KII), brown sugar (KIII), fructose (KIV), and coconut sugar (KV) induced high mortality, and approximately 60% of these cells were positive for PI, indicating dead cells (Figure 4C). The PCa (prostate cancer) and HepG2 (human liver carcinoma) cells responded equally to all kefir formulations, with viability close to 50% (Figure 4D and 4E, respectively). Overall, the present findings showed that the use of unconventional sugars contributed positively to an improvement in the anticarcinogenic activity of sheep milk kefir, with the best performance for the coconut sugar.

The results of the present study are important for the dairy industry, as it indicated that the utilization of unconventional sugars can improve the quality of the sheep milk kefir, increasing the microbial viability, the antagonistic activity against pathogens, the fatty acid profile, and the functionality of the products (antioxidant activity, inhibition of the α -amylase and ACE, and anticarcinogenic activity).

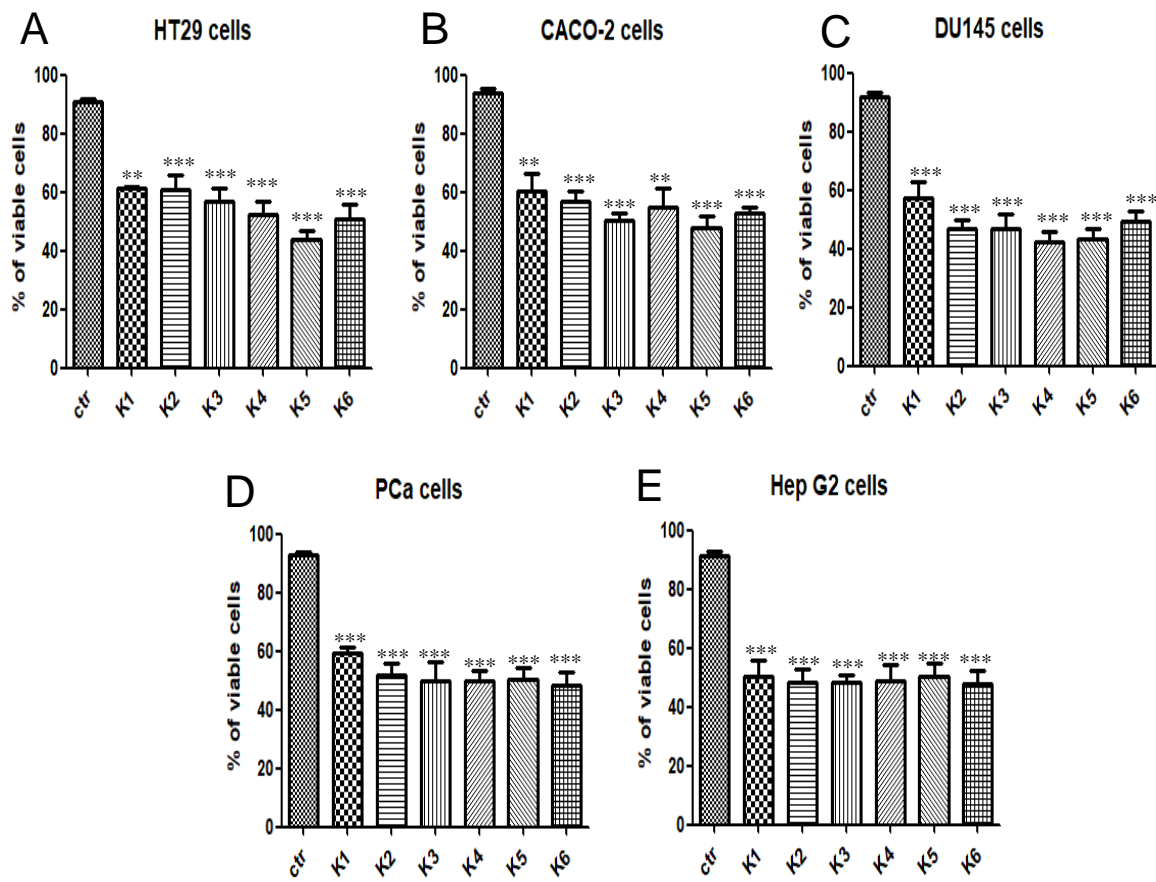


Figure 4. Effects of sheep milk Kefir on cancer cell viability. HT29 (A), CACO-2 (B), DU145 (C), PCa (D) and HepG2 (E). Cancer cell lineages were maintained for 48 h in medium alone (Ctr) or treated with distinct Kefir extracts, being KI (sucrose), KII (demerara sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey). (*) $P < 0.05$; (**) $P < 0.005$; (***) $P < 0.001$.

3.9 Multivariate analysis

Supplementary Figure shows the PCA map of the kefir formulations. The variation was mainly explained by the component F1 (42.65%) followed by F2 (22.53%), totaling 65.18% of explanation. In F1, the attributes *Lactobacillus*, lactic acid, acetic acid, DPPH, ACE inhibitory activity, α -glucosidase inhibitory activity, acids, esters, CLA, ALA, SFA and PUFA were positively correlated, while HT29, CaCO₂, DU145, PCa, ketones, hydrocarbons, and MUFA were negatively correlated. In F2, α -amylase inhibitory activity and alcohols were positively correlated, while

Lactococcus, ethanol and HepG2 were negatively correlated. Yeast, *Leuconostoc*, and lactose were not correlated with any axis (<0.6).

The first principal component (F1) separated the formulations with sucrose (KI) and demerara (KII) (on the left side) from the other formulations (KIII, KIV, and KV, on the right side). The KI and KII formulations were characterized by the higher anticarcinogenic activity (HT29, CACO-2, DU145, PCa), improved aromatic profile (hydrocarbons, ketones), and higher levels of MUFA. On the other hand, the formulations with brown sugar (KIII), fructose (KIV), coconut sugar (KV) and honey (KVI) were characterized by the highest functional properties (DPPH, ACE-inhibitory activity, α -glucosidase inhibitory activity), microbial viability (*Lactobacillus*), concentrations of metabolites (acetic acid, lactic acid), aromatic profile (esters), and fatty acid profile (ALA, CLA, SFA and PUFA). The second principal component (F2) separated the formulations KI, KIV and KV (below the axis) (higher *Lactococcus* viability, ethanol, and HepG2) from the KII, KIII and KVI (above the axis) (higher α -amylase inhibitory activity, and alcohols).

The dendrogram obtained by HCA (Figure 5C) identified the existence of 2 groups: the first group containing the kefir with sucrose (KI) and that with demerara sugar (KII), and the other group with the other formulations (KIII, KIV, KV and KVI). In addition, the dendrogram presented a cophenetic correlation coefficient value of 0.814, indicating high stability and good choice of the truncation method, since cophenetic correlation values above 0.8 are related with an adequate clustering method (Silva et al., 2020). Therefore, kefir with demerara sugar would be the most similar to the product with sucrose.

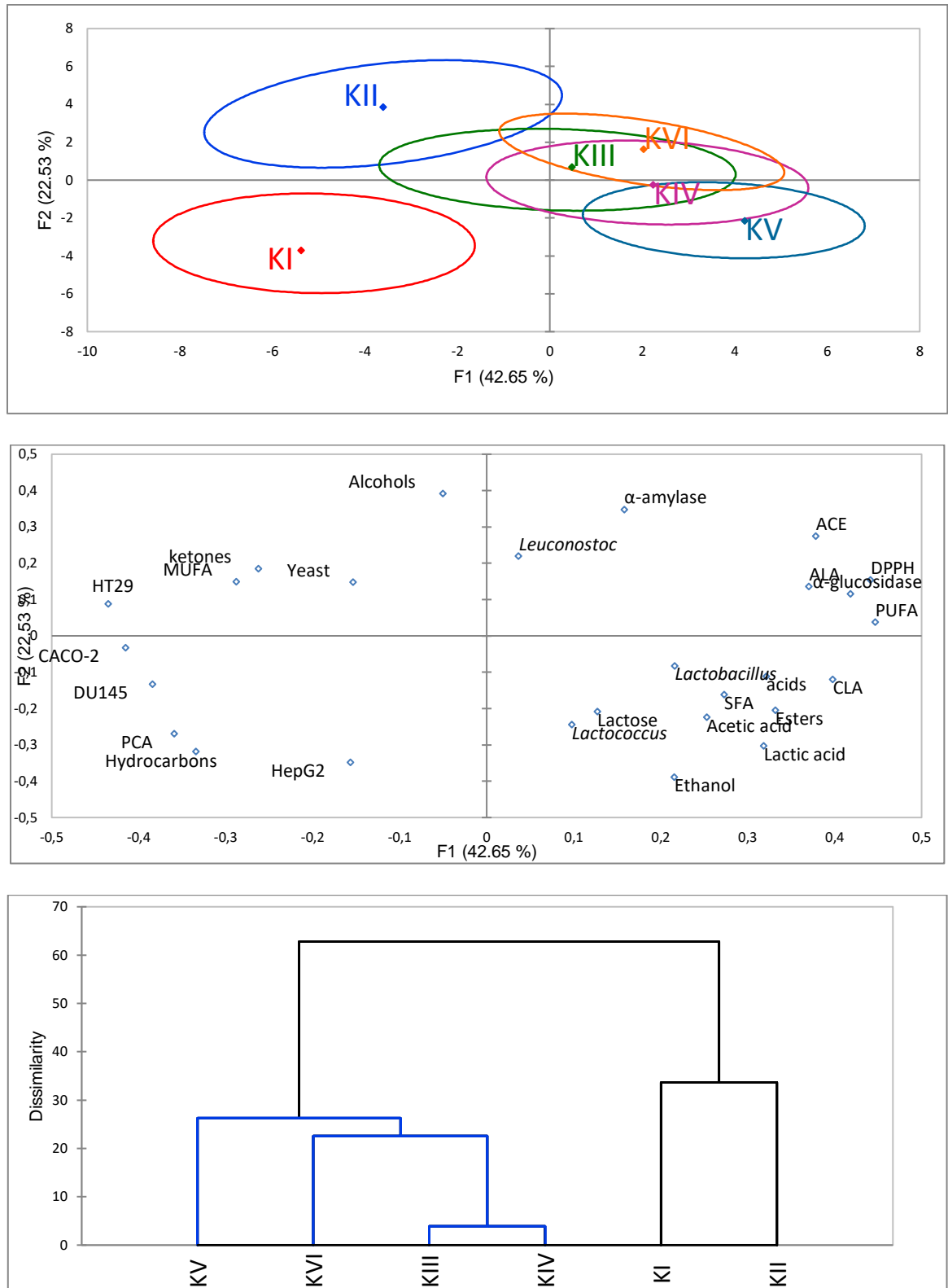


Figure 5 Supplementary. Sensory maps (A), confidence ellipses (B) and hierarchical cluster analysis (HCA) (C) of the Kefir formulations. KI (sucrose), KII (demerara sugar), KIII (brown sugar), KIV (fructose), KV (coconut sugar), KVI (honey).

4. Conclusion

This study is the first attempt to evaluate the replacement of sucrose by unconventional sugars (demerara sugar, brown sugar, fructose, coconut sugar, and honey) in sheep milk kefir, and the effects on microbial viability, pathogen-antagonistic activity, and technological and functional properties of the formulated products. The use of unconventional sugars improved the antagonistic activity against pathogens (*Salmonella*), the fatty acid profile (increase in polyunsaturated fatty acids) and the functionality of the products, which presented greater antioxidant activity, ACE, and α -amylase inhibitory activities, and anticarcinogenic activity. The kefir formulation with the addition of demerara sugar presented the best performance, with a decrease in atherogenic index, thrombogenic index, and hypercholesterolemic saturated fatty acids index. None of the formulations inhibited *B. cereus* counts. These results are important for the dairy industry since the replacement of refined sugar by components with health benefits is of great interest for consumers.

Acknowledgements

The authors acknowledge *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP) for financial support (Grants #2015/25641-4 and #2017/03899-5), *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Grants #403865/2013-1, #302763/2014-7 and #305804/2017-0). This study was financed, in part, by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil* (CAPES) - Finance Code 001, *Fundação de Apoio a Pesquisa no Rio de Janeiro* (FAPERJ) and *Instituto Federal de Educação em Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro* (IFRJ).

References

- Almeida, F. A., Ângelo, F. F., da Silva, S. L., & da Silva, S. L. (2011). Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, *66*, 51-56.
- AOAC International. (2002). *Official Methods of Analysis*. 17th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- Apostolidis, E., Kwon, Y. I., Ghaedian, R., & Shetty, K. (2007). Fermentation of milk and soymilk by *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* enhances functionality for potential dietary management of hyperglycemia and hypertension. *Food Biotechnology*, *21*, 217-236.
- Asghar, M. T., Yusof, Y. A., Mokhtar, M. N., Ya'acob, M. E., Mohd. Ghazali, H., Chang, L. S., & Manaf, Y. N. (2019). Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. *Food Science & Nutrition*.
- Ayyash, M., Al-Nuaimi, A. K., Al-Mahadin, S., & Liu, S. Q. (2018). In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. *Food Chemistry*, *239*, 588-597.
- Bakhshandeh, T., & Pourahmad, R. (2013). Effects of incubation temperature and storage period on flavor and aroma compounds in kefir. *International Journal of Biology and Biotechnology*, *10*, 187-192.
- Balthazar, C. F., Júnior, C. C., Moraes, J., Costa, M. P., Raices, R. S. L., Franco, R. M., ... & Silva, A. C. O. (2016). Physicochemical evaluation of sheep milk

yogurts containing different levels of inulin. *Journal of Dairy Science*, *99*, 4160-4168.

Barłowska, J., Pastuszka, R., Rysiak, A., Król, J., Brodziak, A., Kędzierska-Matysek, M., ... & Litwińczuk, Z. (2018). Physicochemical and sensory properties of goat cheeses and their fatty acid profile in relation to the geographic region of production. *International Journal of Dairy Technology*, *71*, 699-708.

Bengoa, A. A., Iraporda, C., Garrote, G. L., & Abraham, A. G. (2019). Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. *Journal of Applied Microbiology*, *126*, 686-700.

Bourrie, B. C., Cotter, P. D., & Willing, B. P. (2018). Traditional kefir reduces weight gain and improves plasma and liver lipid profiles more successfully than a commercial equivalent in a mouse model of obesity. *Journal of Functional Foods*, *46*, 29-37.

Chen, T. H., Wang, S. Y., Chen, K. N., Liu, J. R., & Chen, M. J. (2009). Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Science*, *92*, 3002-3013.

Choi, J. W., Kang, H. W., Lim, W. C., Kim, M. K., Lee, I. Y., & Cho, H. Y. (2017). Kefir prevented excess fat accumulation in diet-induced obese mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*, 958-965.

Costa, G. M., Paula, M. M., Barão, C. E., Klososki, S. J., Bonafé, E. G., Visentainer, J. V., ... & Pimentel, T. C. (2019). Yoghurt added with *Lactobacillus casei* and sweetened with natural sweeteners and/or prebiotics: Implications on quality parameters and probiotic survival. *International Dairy Journal*, *97*, 139-148.

- Curi, P. N., Carvalho, C. D. S., Salgado, D. L., Pio, R., Pasqual, M., Souza, F. B. M. D., & SOUZA, V. R. D. (2017). Influence of different types of sugars in physalis jellies. *Food Science and Technology*, *37*, 349-355.
- da Silva, J. M., Klososki, S. J., Silva, R., Raices, R. S. L., Silva, M. C., Freitas, M. Q., ... & Pimentel, T. C. (2020). Passion fruit-flavored ice cream processed with water-soluble extract of rice by-product: What is the impact of the addition of different prebiotic components?. *LWT*, 109472.
- Davras, F., Guzel-Seydim, Z. B., & Tas, T. K. (2018). Immunological effects of Kefir produced from Kefir grains versus starter cultures when fed to mice. *Functional Foods in Health and Disease*, *8*, 412-423.
- Ertekin, B., & Guzel-Seydim, Z. B. (2010). Effect of fat replacers on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*, 543-548.
- Farag, M. A., Jomaa, S. A., & El-Wahed, A. A. (2020). The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavor chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*, *12*, 346.
- Ferreira, M. V. S., Cappato, L. P., Silva, R., Rocha, R. S., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., ... & Neto, R. P. (2019). Ohmic heating for processing of whey-raspberry flavored beverage. *Food Chemistry*, *297*, 125018.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., ... & Verbeke, K. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *14*, 491.

- Gul, O., Atalar, I., Mortas, M., & Dervisoglu, M. (2018). Rheological, textural, colour and sensorial properties of kefir produced with buffalo milk using kefir grains and starter culture: A comparison with cows' milk kefir. *International Journal of Dairy Technology*, *71*, 73-80.
- Gurpilhares, D. B., Cinelli, L. P., Simas, N. K., Pessoa Jr, A., & Sette, L. D. (2019). Marine prebiotics: Polysaccharides and oligosaccharides obtained by using microbial enzymes. *Food Chemistry*, *280*, 175-186.
- Hamdan, A. B., Riaty, C., Fitriya, W., & Ekantari, N. (2020). Effects of Nanoencapsulated Carotenoid of *Spirulina platensis* on the Sensory Profiles of Dark and Milk Chocolate. *In E3S Web of Conferences (Vol. 147, p. 03022)*. EDP Sciences.
- Kaprasob, R., Kerdchoechuen, O., Laohakunjit, N., Thumthanaruk, B., & Shetty, K. (2018). Changes in physico-chemical, astringency, volatile compounds and antioxidant activity of fresh and concentrated cashew apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Food Science and Technology*, *55*, 3979-3990.
- Kim, D. H., Jeong, D., Kim, H., Kang, I. B., Chon, J. W., Song, K. Y., & Seo, K. H. (2016). Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, *36*, 787.
- Kiss, A., Naár, Z., Daróczi, L., Kukovics, S., Kukovics, F., Mirmazloun, I., & Némedi, E. (2019). Changes of free fatty acid composition and number of lactic acid bacteria in three functional goat and sheep milk products fortified with inulin or fish oil. *CyTA-Journal of Food*, *17*, 51-59.
- Januário, J. G. B., da Silva, I. C. F., De Oliveira, A. S., De Oliveira, J. F., Dionísio, J. N., Klososki, S. J., & Pimentel, T. C. (2017). Probiotic yoghurt flavored with organic beet with carrot, cassava, sweet potato or corn juice: Physicochemical and texture

- evaluation, probiotic viability and acceptance. *International Food Research Journal*, 24, 359.
- Larosa, C. P., Balthazar, C. F., Guimaraes, J. T., Ramon, Silva Rocha, Pimentel, T. C., Granato, D., Duarte, Maria Carmela K. H., Silva, M. C., Freitas, M. Q., Cruz, A. G., Esmerino, E. A. (2020). Sheep milk-based kefir sweetened with different sugars: Sensory acceptance and consumer emotion profiling. *Journal of Dairy Science*. In press.
- Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 341-349.
- Lima, M. D. S. F., da Silva, R. A., da Silva, M. F., da Silva, P. A. B., Costa, R. M. P. B., Teixeira, J. A. C., ... & Cavalcanti, M. T. H. (2018). Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10, 446-455.
- Magodrive. (2020). Iogurte kefir parcialmente desnatado adoçado. Available at <https://www.magodrive.com.br/iogurte-kefir-desnatado-natural-pia-p1020309>. Accessed in 07 Sep. 2020.
- Miguel, M. G. C. P., Cardoso, P. G., Magalhães-Guedes, K. T., & Schwan, R. F. (2013). Identification and assessment of kefir yeast potential for sugar/ethanol-resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44, 113-118.
- Montanuci, F. D., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2010). Sensory characterization and acceptance of sweetened full fat and low fat kefir with inulin. *Brazilian Journal of Food Technology*, 8, 79-90.

- Montanuci, F. D., Pimentel, T. C., Garcia, S., & Prudencio, S. H. (2012). Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk Kefir. *Food Science and Technology, 32*, 580-865.
- Nascimento, M., & Mondal, A. (2016). Microbial ecology of confectionary products, honey, sugar, and syrups. *Quantitative Microbiology in Food Processing: Modeling the Microbial Ecology*, 533-546.
- Nogueira, L. K., Aguiar-Oliveira, E., Kamimura, E. S., & Maldonado, R. R. (2016). Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. *Acta Amazônica, 46*, 417-424.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology, 6*, 1177.
- Purutoğlu, K., İspirli, H., Yüzer, M. O., Serencam, H., & Dertli, E. (2020). Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. *International Journal of Dairy Technology, 73*, 57-66.
- Ranadheera, C. S., Evans, C. A., Baines, S. K., Balthazar, C. F., Cruz, A. G., Esmerino, E. A., ... & Graça, J. S. (2019). Probiotics in goat milk products: Delivery capacity and ability to improve sensory attributes. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 18*, 867-882.
- Ránky, M., Köteles, F., Nyakas, C., Bárdos, G., & Szabo, A. (2017). A 90 day supplementation of polyunsaturated fatty acids (PUFA) has benefits on health measures and exercise performance. *Baltic Journal of Sport and Health Sciences, 1*, (104).

- Romeiro, R. S. (2005). Constatação da produção de bacteriocinas por isolamentos de bactérias fitopatogênicas. *Departamento de Fitopatologia-UFV, Viçosa, MG Brasil*.
- Sarkar, S., & Chandra, S. (2020). Honey as a functional additive in yoghurt—a review. *Nutrition & Food Science, 50*, 168-178.
- Satir, G., & Guzel-Seydim, Z. B. (2015). Influence of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. *LWT-Food Science and Technology, 63*, 852-858.
- Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., & Sheikhi, A. (2017). Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Medical Oncology, 34*, 183.
- Silva, R., Rocha, R. S., Guimarães, J. T., Balthazar, C. F., Scudino, H., Ramos, G. L. P., ... & Esmerino, E. A. (2020). Dulce de Leche submitted to ohmic heating treatment: Consumer sensory profile using preferred attribute elicitation (PAE) and temporal check-all-that-apply (TCATA). *Food Research International*, 109217.
- Sindi, A., Badsha, M., Nielsen, B., & Ünlü, G. (2020). Antimicrobial Activity of Six International Artisanal Kefirs Against *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Staphylococcus aureus*. *Microorganisms, 8*, 849.
- Sperry, M. F., Silva, H. L., Balthazar, C. F., Esmerino, E. A., Verruck, S., Prudencio, E. S., ... & Rocha, R. S. (2018). Probiotic Minas Frescal cheese added with *L. casei* 01: Physicochemical and bioactivity characterization and effects on hematological/biochemical parameters of hypertensive overweighted women—

- A randomized double-blind pilot trial. *Journal of Functional Foods*, 45, 435-443.
- Toba, T., Nakajima, H., Tobitani, A., & Adachi, S. (1990). Scanning electron microscopic and texture studies on characteristic consistency of Nordic ropy sour milk. *International Journal of Food Microbiology*, 11, 313-320.
- Valdés-Silverio, L. A., Iturralde, G., García-Tenesaca, M., Paredes-Moreta, J., Narváez-Narváez, D. A., Rojas-Carrillo, M., ... & Alvarez-Suarez, J. M. (2018). Physicochemical parameters, chemical composition, antioxidant capacity, microbial contamination and antimicrobial activity of *Eucalyptus* honey from the Andean region of Ecuador. *Journal of Apicultural Research*, 57, 382-394.
- Vimercati, W. C., da Silva Araújo, C., Macedo, L. L., Fonseca, H. C., Guimarães, J. S., de Abreu, L. R., & Pinto, S. M. (2020). Physicochemical, rheological, microbiological and sensory properties of newly developed coffee flavored kefir. *LWT*, 123, 109069.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o uso de açúcares não convencionais aumentou a viabilidade microbiana, melhorou a atividade antagonista contra patógenos de origem alimentar, favoreceu o perfil de ácidos graxos (aumentando os ácidos graxos poli-insaturados), ampliou as atividades funcionais dos compostos bioativos e promoveu atividade anticarcinogênica.

Com base nos dados sensoriais, destaca-se o uso de açúcar demerara ou frutose como substituto da sacarose.

8. REFERÊNCIAS

ADİLOĞLU, A. K.; GÖNÜLATES, N.; İŞLER, M.; ŞENOL, A. The effect of kefir consumption on human immune system: a cytokine study. **Mikrobiyol Bul**; 47(2): 273-281, 2013.

AHMED, Z.; WANG, Y.; AHMAD, A.; KHAN, S. T.; NISA, M.; AHMAD, H.; AFREEN, A. Kefir and health: a contemporary perspective. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 53(5), 422–434, 2013.

ALMEIDA, F. A.; ÂNGELO, F. F.; SILVA, S. L.; SILVA, S. L. Análise sensorial e microbiológica de *kefir* artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Jan/Fev, nº 378, 66, 51:56, 2011.

ALSHA'AR, I. A.; ALOKLAH, B.; AL-DEEN, R. B.; ALJAMALI, M.; ALKADRY, R.; ALBISKI, F. In vitro anticancer properties of kefir and kefir products produced by a novel method in Syria. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, 6(5), 1-6, 2017.

ARAÚJO, N. G.; SILVA, J. B.; BARBOSA, I. M.; MACÊDO, C. S. Influência da concentração de polpa de goiaba na aceitação de fermentado de *kefir*. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, out/dez , v. 72, n. 4, p. 184-191, 2017.

ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA - Journal of Food**, 13(3), 340-345, 2014.

ASGHAR, M. T.; YUSOF, Y. A.; MOKHTAR, M. N.; YA'ACOB, M. E.; MOHD. GHAZALI, H.; CHANG, L. S.; MANAF, Y. N. Coconut (*Cocos nucifera* L.) sap as a potential source of sugar: Antioxidant and nutritional properties. **Food Science & Nutrition**, 2019.

AYYASH, M.; AL-NUAIMI, A. K.; AL-MAHADIN, S.; LIU, S-Q. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: a comparative study with fermented bovine Milk. **Food Chemistry**, 2017.

BALTHAZAR, Celso Fasura. **Leite de ovelha: a relevância da matriz alimentar no desenvolvimento de alimentos funcionais**. 2015a. 45 f. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de especialista em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional. Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* Especialização em Segurança Alimentar e Qualidade Nutricional, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro IFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2015a.

BALTHAZAR, C. F.; GAZE, L. V.; AZEVEDO DA SILVA, H. L.; PEREIRA, C. S.; FRANCO, R. M.; CONTE-JÚNIOR, C. A.; FREITAS, M. Q.; DE OLIVEIRA SILVA, A. C. Sensory evaluation of ovine milk yoghurt with inulin addition. **International Journal of Dairy Technology**, 68(2), 281–290, 2015b.

BALTHAZAR, C. F.; CONTE-JUNIOR, C. A.; MORAES, J.; COSTA, M. P.; RAICES, R. S. L.; FRANCO, R. M.; CRUZ, A. G.; SILVA, A. C. O. Physicochemical evaluation of sheep milk yogurts containing different levels of inulin. **Journal of Dairy Science**, 99, 4160-4168, 2016a.

BALTHAZAR, C. F.; CRUZ, A. G. **Leite de ovelha: características tecnológicas e potenciais benefícios para a saúde**. 2016b. Disponível em: <<https://www.milkpoint.com.br/artigos/industria/leite-de-ovelha-caracteristicas-tecnologicas-e-potenciais-beneficios-para-a-saude-102821n.aspx>>. Acesso em: 21 set. de 2019.

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRÃO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; SANTANA, A. S.; GRANATO, D.; Cruz, A. G. Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 16, 247-262, 2017.

BALTHAZAR, C. F.; SANTILLO, A.; FIGLIOLA, L.; SILVA, H. L. A.; ESMERINO, E. A.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G.; ALBENZIO, M. Sensory evaluation of a novel prebiotic sheep milk strawberry beverage. **LWT – Food Science & Technology**, 98, 94-98, 2018a.

BALTHAZAR, C. F.; SANTILLO, A.; GUIMARÃES, J. T.; BEVILACQUA, V.; CORBO, M. R.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G.; ALBENZIO, M. Ultrasound processing of fresh and frozen semi-skimmed sheep milk and its effects on microbiological and physical-chemical quality. **Ultrasonics Sonochemistry**, 51:241–248, 2019a.

BALTHAZAR, C. F.; SANTILLO, A.; GUIMARÃES, J. T.; CAPOZZI, V.; RUSSO, P.; CAROPRESE, M.; MARINO, R.; ESMERINO, E. A.; RAICES, R. S. L.; SILVA, M. C.; SILVA, H. L. A.; FREITAS, M. Q.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G.; ALBENZIO, M. Novel milk-juice beverage with fermented sheep milk and strawberry (*Fragaria x ananassa*): nutritional and functional characterization. **J. Dairy Sci.**, 102 (12), 10724–10736, 2019b.

BEKAR, O.; YILMAZ, Y.; GULTEN, M. Kefir improves the efficacy and tolerability of triple therapy in eradicating *Helicobacter pylori*. **Journal of Medicinal Food**, 14(4), 344-347, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12/2001. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 76, de 26 de novembro de 2018. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 9, 30 dezembro 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 331/2019. Dispõe Sobre os Padrões Microbiológicos de Alimentos e sua Aplicação. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 60/2019. Estabelece as Listas de Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 de dezembro de 2019b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 58, de 6 de novembro de 2019. Altera a IN nº 76 de 2018. **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 18, 7 novembro 2019c.

CARASI, P.; RACEDO, S. M.; JACQUOT, C.; ROMANIN, D. E.; SERRADELL, M. A.; URDACI, M. C. Impact of *kefir* derived *Lactobacillus kefir* on the mucosal immune response and gut microbiota. **Journal of Immunology Research**, 1-12, 2015.

CARPINO, S.; HORNE, J.; MELILLI, C.; LICITRA, G.; BARBANO, D. M.; VAN SOEST, P. J. Contribution of Native Pasture to the Sensory Properties of Ragusano Cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, 308–315, 2004.

CASSANEGO, D. B.; RICHARDS, N. S. P. S.; MAZUTTI, M. A.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. Leveduras: diversidade em *kefir*, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**: Ed. especial - nano e microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, v. 37, p. 175-186, 2015.

CHAMPAGNE, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p.160-166, 2018.

CHEN, H. -L.; TUNG, Y. -T.; CHUANG, C. -H.; TU, M. -Y.; TSAI, T. -C.; CHANG, S. -Y.; CHEN, C. -M. Kefir improves bone mass and microarchitecture in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis. **Osteoporosis International**, 26(2), 589-599, 2014a.

CHEN, H. -L.; TUNG, Y. -T.; TSAI, C. -L.; LAI, C. -W.; LAI, Z. -L.; TSAI, H. -C.; LIN, Y. -L.; WANG, C. -H.; CHEN, C. -M. Kefir improves fatty liver syndrome by inhibiting the lipogenesis pathway in leptin-deficient *ob/ob* knockout mice. **International Journal of Obesity**, 38(9), 1-8, 2014b.

CHEN, Y. -P.; HSIAO, P. J.; HONG, W. S.; DAI, T. Y.; CHEN, M. J. *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from milk *kefir* grains ameliorates experimental colitis in vitro and in vivo. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 63-74, 2012.

CHEN, Y. -P.; CHEN, M. -J. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from *kefir* grains on germ-free mice. **PLOS ONE**, 8(11), e78789, 2013a.

CHEN, Y. -P.; LEE, T. Y.; HONG, W. S.; HSIEH, H. H.; CHEN, M. J. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from kefir grains on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection using mouse and intestinal cell models. **Journal of Dairy Science**, 96(12), 7467-7477, 2013b.

CHEN, Z.; SHI, J.; YANG, X.; NAN, B.; LIU, Y.; WANG, Z. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**, 43, 15-21, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (2011) **Milk and Milk Products (CODEX STAN 243-2003)**, vol. 2 edition, pp. 6–16. Rome, Italy: World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003.

COGULU, D.; TOPALOGLU-AK, A.; CAGLAR, E.; SANDALLI, N.; KARAGOZLU, C.; ERSIN, N.; YERLIKAYA, O. Potential effects of a multistrain probiotic-kefir on salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus spp.* **Journal of Dental Sciences**, 5(3), 144-149, 2010.

CONTIM, L. S. R.; OLIVEIRA, I. M. A.; NETO, J. C. Avaliação microbiológica, físico-química e aceitação sensorial do kefir com polpa de graviola. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, jan/mar, v. 73, n. 1, p. 1-9, 2018.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2ª edição revisada e ampliada. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, 3(10), 777-788, 2005.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Processamento de consumo**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017a.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Processamento de produtos lácteos: queijos, leites fermentados, bebidas lácteas, sorvete, manteiga, creme de leite, doce de leite, soro em pó e lácteos funcionais**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017b.

CRUZ, A. G.; ZACARCHENCO, P. B.; OLIVEIRA, C. A. F.; CORASSIN, C. H. **Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leites e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019.

DE MORENO DE LEBLANC, A.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGÓN, G. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. **Journal of Dairy Science**, 90(4), 1920-1928, 2007.

DE VRESE, M.; MARTEAU, P. R. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. **The Journal of Nutrition**, 137, 803S–811S 2007.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de *kefir*. **Ciência Animal Brasileira**, 19, 1-8, 2018.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA CAPRINOS E OVINOS. Panorama da ovinocultura e da caprinocultura a partir do Censo Agropecuário 2017. **Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**, n. 7, dez. 2018.

FAHMY, H. A.; ISMAIL, A. F. M. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 85- 93, 2015.

FAO. Food and Agriculture Organization of The United Nations. **FAOSTAT – Statistic Database**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL/visualize>>. Acesso em: 29 jan. 2021.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization—FAO/WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Cordoba, Spain: Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. 34 p., 2001.

FARROKH, C.; JORDAN, K.; AUVRAY, F.; GLASS, K.; OPPEGAARD, H.; RAYNAUD, S.; THEVENOT, D.; CONDRON, R.; REU, K. D.; GOVARIS, A.; HEGGUM, K.; HEYNDRIKX, M.; HUMMERJOHANN, J.; LINDSAY, D.; MISZCZYCHA, S.; MOUSSIEGT S.; VERSTRAETE, K.; CERF, O. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p.190-212, 2013.

FATHI, Y.; FAGHIH, S.; ZIBAEENEZHAD, M. J.; TABATABAEI, S. H. R. Kefir drink leads to a similar weight loss, compared with milk, in a dairy-rich non-energy-restricted diet in overweight or obese premenopausal women: a randomized controlled trial. **European Journal of Nutrition**, 55(1), 295-304, 2015.

FAVA L. W.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; PINTO, A. T. Rendimento de coalhada obtida a partir de leite fresco, refrigerado e congelado de ovelhas da raça Lacaune e caracterização física do soro obtido. **Ciência Rural**; v. 44, n. 5, p.937-942, 2014.

FIESP/IBOPE - FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DE SÃO PAULO e INSTITUTO BRASILEIRO DE OPINIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Nacional Fiesp/IBOPE sobre o Perfil do Consumo de Alimentos no Brasil: Brasil Food Trends 2020**, 2010. Disponível em: < <https://docplayer.com.br/19002988-Pesquisa-nacional-fiesp-ibope-sobre-o-perfil-do-consumo-de-alimentos-no-brasil.html> >. Acesso em: 15 janeiro 2020.

FRANCO, M. C.; GOLOWCZYC, M. A.; DE ANTONI, G. L.; PÉREZ, P. F.; HUMEN, M.; SERRADELL, M. d. I. A. Administration of kefir-fermented milk protects mice against *Giardia intestinalis* infection. **Journal of Medical Microbiology**, 62, 1815-1822, 2013.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Preservation of *kefir* grains, a comparative study. **Lebensm-Wiss Technol**, 30(1), 77–84, 1997.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterization of *kefir* grains. **Journal of Dairy Research**, 68(04), 2001.

GHAEMPOUR, M.; SEFIDGAR, S. A. A.; MOGHADAMNIA, A. A.; GHADIMI, R.; GHAREKHANI, S.; SHIRKHANI, L. Comparative study of kefir yogurt-drink and sodium fluoride mouth rinse on salivary mutans streptococci. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, 15(2), 214-217, 2014.

GOMES, A. C.; BUENO, A. A.; DE SOUZA, R. G. M.; MOTA, J. F. Gut microbiota, probiotics and diabetes. **Nutrition Journal** 13, 60, 2014.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 9(5), 455–470, 2010.

GRISHINA, A.; KULIKOVA, I.; ALIEVA, L.; DODSON, A.; ROWLAND, I.; JIN, J. Antigenotoxic effect of kefir and ayran supernatants on fecal water-induced DNA damage in human colon cells. **Nutrition and Cancer**, 63(1), 73-79, 2011.

GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. **Journal of Veterinary Medicine, Serie B**, 50(8), 412-416, 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; TAS, T. Determination of antimutagenic properties of some fermented milks including changes in the total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. **International Journal of Dairy Technology** 59, 209–215, 2006.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; KOK-TAS, T.; GREENE, A. K.; SEYDIM, A. C. Review: Functional Properties of *Kefir*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 51:3, 261-268, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; DIBEKCI, M.; CAGDAS, E.; SEYDIM, A. C. Effect of kefir on *Fusobacterium nucleatum* in potentially preventing intestinal cancer. **Functional Foods in Health and Disease**, 6(7), 469-477, 2016.

HADISAPUTRO, S.; DJOKOMOEJANTO, R. R. J.; JUDIONO; SOESATYO, M. H. N. E. The effects of oral plain kefir supplementation on proinflammatory cytokine properties of the hyperglycemia Wistar rats induced by streptozotocin. **Acta Med Indones** 44(2), 100-104, 2012.

HERNÁNDEZ-LEDESMA B.; CONTRERAS M. M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: production, bioavailability and incorporation into foods. **Advances in Colloid and Interface Science**, 165(1), 23-35, 2011.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. *Kefir* improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, 103:582–587, 2003.

HILL, C; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.B.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C; SANDERS, M.E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, n. 11, p. 506–514, 2014.

HUANG, Y.; WANG, X.; WANG, J.; WU, F.; SUI, Y.; YANG, L.; WANG, Z. *Lactobacillus plantarum* strains as potential probiotic cultures with cholesterol-lowering activity. **Journal of Dairy Science**, 96(5), 2746-2753, 2013a.

HUANG, Y.; WU, F.; WANG, X.; SUI, Y.; YANG, L.; WANG, J.. Characterization of *Lactobacillus plantarum* Lp27 isolated from Tibetan kefir grains: a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. **Journal of Dairy Science**, 96(5), 2816-2825, 2013b.

HUSEINI, H. F.; RAHIMZADEH, G.; FAZELI, M. R.; MEHRAZMA, M., SALEHI, M. **Evaluation of wound healing activities of kefir products**. *Burns*, 38(5), 719–723, 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo Agropecuário 2017**, [Rio de Janeiro, 2018]. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 21 jan. de 2020.

ISMAIEL, A. A.; GHALY, M. F.; EL-NAGGAR, A. K. Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. **Current Microbiology**, 62(5), 1602-1609, 2011.

KAKISU, E. J.; ABRAHAM, A. G.; PÉREZ, P. F.; DE ANTONI, G. L. Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. **Journal of Food Protection**, 70(11), 2613–2616, 2007.

KANBAK, G.; UZUNER, K.; KUSAT OL, K.; OĞLAKÇI, A.; KARTKAYA, K.; ŞENTÜRK, H. Effect of kefir and low-dose aspirin on arterial blood pressure measurements and renal apoptosis in unihypertensive rats with 4 weeks salt diet. **Clinical and Experimental Hypertension**, 36(1), 1-8, 2014.

KESENKAS, H.; GÜRSOY, O.; ÖZBAR, H. Kefir. **Fermented Foods in Health and Disease Prevention**, p. 339-361, 2017.

KHOURY, N.; EL-HAYEK, S.; TARRAS, O.; EL-SABBAN, M.; EL-SIBAI, M.; RIZK, S. *Kefir* exhibits anti-proliferative and pro-apoptotic effects on colon adenocarcinoma cells with no significant effects on cell migration and invasion. **International Journal of Oncology**, 45(5), 2117–2127, 2014.

KLIEM, K. E.; GIVENS, D. I. Dairy Products in the Food Chain: Their Impact on Health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 21-36, 2011.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, 404(6778), 635-643, 2000.

KUHL, Gabriela Christina. **Seleção de bactérias ácido lácticas para a otimização tecnológica na bioprodução de ácido linoléico conjugado em iogurte de leite de ovelha**. 2016. 115 f. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência dos Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Florianópolis, SC, Brasil, 2016.

LEE, J. -I.; SONG, K. -Y.; CHON, J. -W.; HYEON, J. -Y.; KIM, H.; SEO, K. -H. Effects of oral administering kefir on blood glucose levels in diabetic mice. **Korean Journal of Food and Nutrition**, 24(1), 79-84, 2011.

LEITE, A.M.O.; MAYO, B.; RACHID, C.T.C.C.; PEIXOTO, R.S; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, F.M.F; DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**. v. 31, p. 215-221, 2012.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C. A.; DEL AGUILA, E. M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S.; MIGUEL, M. A. L.; SILVA J. T.; PASCHOALIN, V. M. F.; Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, 96(7), 4149–4159, 2013a.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; ROSADO, A. S.; SILVA, J. T., PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, 44(2), 341–349, 2013b.

LEMBO, A.; CAMILLERI, M. Chronic Constipation. **New England Journal of Medicine**, 349(14), 1360-1368, 2003.

LIU, J. -R.; WANG, S. -Y.; LIN, Y. -Y.; LIN, C. -W. Antitumor activity of milk kefir and soymilk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**, 44(2), 183-187, 2002.

LIU, J. -R.; CHEN, M. -J.; LIN, C. -W. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(7), 2467-2474, 2005a.

LIU, J. -R.; LIN, Y. -Y.; CHEN, M. -J.; CHEN, L. -J.; LIN, C. -W. Antioxidative activities of kefir. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**;18(4): 567-573, 2005b.

LIU, J. -R.; WANG, S. -Y.; CHEN, M. -J.; CHEN, H. -L.; YUEH, P. -Y.; LIN, C. -W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. **British Journal of Nutrition**, 95(5), 939-946, 2006a.

LIU, J. -R.; WANG, S. -Y.; CHEN, M. -J.; YUEH, P. -Y.; LIN, C. -W. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86(15), 2527-2533, 2006b.

MAEDA, H.; ZHU, X.; OMURA, K.; SUZUKI, S.; KITAMURA, S. Effects of an exopolysaccharide (kefiran) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **BioFactors**, 22(1-4), 197-200, 2004a.

MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide kefiran produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* WT-2BT. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(17), 5533-5538, 2004b.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 693-702, abr./jan. 2011.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; CORPAS, I.; MUNOZ, J.; ZAZO, J.; PEINADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, 35(2), 136–140, 2002.

MARTIN, N. H.; TRMčlć, A.; HSIEH, T.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. The Evolving Role of Coliforms as Indicators of Unhygienic Processing Conditions in Dairy Foods. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p.1-8, 2016.

MARTINS, J. F. L.; MARINHO, E.; FIRMINO, H. H.; RAFAEL, V. C.; FERREIRA, C. L. L. F. Avaliação da adição do *kefir* em dieta hospitalar. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Mai/Jun, nº 386, 67: 13-19, 2012.

MEDRANO, M.; PÉREZ, P. F.; ABRAHAM, A. G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. **International Journal of Food Microbiology**, 122(1-2), 1–7, 2008.

MEDRANO, M.; HAMET, M. F.; ABRAHAM, A. G.; PÉREZ, P. F. Kefiran protects Caco-2 cells from cytopathic effects induced by *Bacillus cereus* infection. **Antonie van Leeuwenhoek**, 96(4), 505-513, 2009.

MEDRANO, M.; RACEDO, S. M.; ROLNY, I. S.; ABRAHAM, A. G.; PÉREZ, P. F. Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59(10), 5299-5304, 2011.

MERLIN JUNIOR, I. A.; DOS SANTOS, J. S.; COSTA, L. G.; COSTA, R. G.; LUDOVICO, A.; REGO, F. C. A.; SANTANA, E. H. W. Sheep milk: physical-chemical characteristics and microbiological quality. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion Organo Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**. v. 65, nº 3, 2015.

MIRANDA R. F.; PEREIRA, C. S. S.; ARAÚJO, I. O.; Análise da fermentação alcoólica do *kefir* em biorreator. **Revista Teccen**, Jan./Dez.; 07(1/2):21-26, 2014.

MILANI, F. X.; WENDORFF, W. L. Goat and sheep production in the United States (USA). **Small Ruminant Research**, v. 101, p. 134-139, 2011.

MONTE, D. F. M.; LOPES JÚNIOR, W. D.; OLIVEIRA, C. J. B; MOURA, J. F. P. Indicadores de qualidade microbiológica do leite caprino produzido na Paraíba. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 12, n. 4, p.354-358, 2016.

MOREIRA JUNIOR, S.; FREITAS, M. L.; MARTINS, M. L.; BENEVENUTO, W. C. A. N.; GONÇALVES, I. F.; MARTINS, A. D. O. Avaliação do efeito de yacon em *kefir* sabor morango. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, abr/jun, v. 73, n. 2, p. 51-61, 2018.

MORRIS, V. J. Starch Relation and retrogradation. **Trend in Food Science and Technology**, v.1, p. 2-6, 1990.

MUNIEWEG, F. R.; NESPOLO, C. R.; PINHEIRO, F. C.; GAVIÃO, E. R.; PINHEIRO, F. C.; CZARNOBAY, M. Qualidade do leite cru ovino armazenado sob refrigeração. **Vigil. Sanit. Debate**, 5(1):52-59, 2017.

NEGRULESCU, A.; PATRULEA, V.; MINCEA, M. M.; IONASCU, C.; VLAD-OROS, B. A.; OSTAFE, V. Adapting the reducing sugars method with dinitrosalicylic acid to microtiter plates and microwave heating. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 12, p. 2176-2182, 2012.

NOĞAY, N. H. Kefir Beverage and Its Effects on Health. **Milk-Based Beverages**, in Volume 9 of The Science of Beverages, 273-296, 2019.

NOORI, N.; BANGASH, M. Y.; MOTAGHINEJAD, M.; HOSSEINI, P.; Behshad NOUDOOST, B. *Kefir* protective effects against nicotine cessation-induced anxiety and cognition impairments in rats. **Advanced Biomedical Research**, 3, 251, 2014.

NTULI, V.; NJAGE, P. M.; BUYS, E. M. Characterization of *Escherichia coli* and other Enterobacteriaceae in producer-distributor bulk milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9534-9549, 2016.

OSTADRAHIMI, A.; TAGHIZADEH, A.; MOBASSERI, M.; FARRIN, N.; PAYAHOO, L.; BEYRAMALIPOOR GHESHLAGHI, Z.; VAHEDJABBARI, M. Effect of probiotic fermented milk (*kefir*) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. **Iranian Journal of Public Health**, 44(2), 228–237, 2015.

OZCAN, A.; KAYA, N.; ATAKISI, O.; KARAPEHLIVAN, M.; ATAKISI E.; CENESIZ, S. Effect of kefir on the oxidative stress due to lead in rats. **Journal of Applied Animal Research**, 35, 91–93, 2009.

ÖZER, B. H.; KIRMACI, H. A. Functional milks and dairy beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v. 63(1), p. 1-15, 2010.

PANDEY, K. R.; NAIK, S. R.; VAKIL, B.V. Probiotics, prebiotics and symbiotic - a review. **Journal of Food Science and Technology**, 52(12), 7577–7587, 2015.

PARK, Y. W.; JUÁREZ, M.; RAMOS, M.; HAENLEIN, G. F. W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, 68(1-2), 88–113, 2007.

PARK, Y. W.; HAENLEIN, G. F. W.; WENDORFF, W. L. **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**, 2 ed., John Wiley & Sons Ltd., p.210-221, 2017.

PELLEGRINI, Luiz Gustavo. **Caracterização do leite ovino em função do período de lactação**. 2012. 60 f. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, 2012.

PIMENTA, F. S.; LUACES-REGUEIRA, M.; TON, A. M.; CAMPAGNARO, B. P.; CAMPOS-TOIMIL, M.; PEREIRA, T. M.; VASQUEZ, E. C. Mechanisms of action of kefir in chronic cardiovascular and metabolic diseases. **Cellular Physiology and Biochemistry**, 48(5), 1901-1914, 2018.

PLESSAS, S.; NOUSKA, C.; MANTZOURANI, I.; KOURKOUTAS, Y.; ALEXOPOULOS, A.; BEZIRTZOGLU, E. Microbiological exploration of different types of kefir grains. **Fermentation**, 3(1), 1, 2017.

PRADO, M. R. M.; BOLLER, C.; ZIBETTI, R. G. M.; SOUZA, D.; PEDROSO, L. L.; SOCCOL, C. R. Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan *kefir*. **Microvascular Research**, v. 108, p. 29-33, 2016.

PUBLIC HEALTH ENGLAND. Identification of *Enterobacteriaceae*. **UK Standards for Microbiology Investigations**, v. 16, n. 4, 2015.

PUNARO, G. R.; MACIEL, F. R.; RODRIGUES, A. M.; ROGERO, M. M.; BOGSAN, C. S. B.; OLIVEIRA, M. N.; IHARA, S. S. M.; ARAUJO, S. R. R.; SANCHES, T. R. C.; ANDRADE, L. C.; HIGA, E. M. S. *Kefir* administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. **Nitric Oxide**, 37, 53–60, 2014.

RAMOS, Gustavo Luis de Paiva Anciens. **Caracterização de bacilos gram-negativos e detecção da presença de resíduos de antibióticos em leite caprino cru**. 2019. 115 f. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Mestrado Profissional em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro IFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2019.

REVILLA, I.; ESCUREDO, O.; GONZÁLEZ-MARTÍN, M. I.; PALACIOS, C. Fatty acids and fat-soluble vitamins in ewe's milk predicted by near infrared reflectance spectroscopy. Determination of seasonality. **Food Chem** 214:468-77, 2017.

RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAGRIFFOUL, G.; PACCARD, P.; GUILLET, I.; CHILLIARD, Y. Composition of goat and sheep milk products: an update. **Small Ruminant Research**, 79(1), 57–72, 2008.

RIBEIRO, Alice de Souza. **Caracterização de micro-organismos com potencial probiótico da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul**. 2015. 79 f. Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria UFSM, Santa Maria, RS, Brasil, 2015.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 25(5), 404-408, 2005.

RODRIGUES, Maria Claudia Novo Leal. **Elaboração e caracterização de um produto com potencial probiótico a partir do microencapsulamento de kefir por spray drying**. 2018. 157 f. Tese apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências Nutricionais. Programa de Pós-

Graduação em Nutrição do Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2018.

ROHENKOHL, E. J.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O agronegócio de leite de ovinos e caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 39, n. 2, p. 97-114, Porto Alegre, 2011.

ROSA, D. D.; DIAS, M. M. S.; GRZES´KOWIAK Ł. M.; REIS, S. A.; CONCEIÇÃO L. L.; PELUZIO, M. C. G. Milk *kefir*: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, 30(01), 82–96, 2017.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, 26(3), 434-437, 2003.

SANTOS, Augusto César Costa. **Aplicação de aquecimento ôhmico em leite de ovelha e seus efeitos na qualidade físico-química e microbiológica**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau de Especialista em Gestão da Segurança de Alimentos e Qualidade Nutricional. Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* Especialização em Gestão da Segurança de Alimentos e Qualidade Nutricional, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro IFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2018.

SANTOS JUNIOR, Elizeu Rocha. **Estabilidade físico-química e microbiológica de micropartículas de kefir obtidas por spray drying e análise sensorial de bebida reconstituída**. 2018. 80 f. Dissertação apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2018.

SELVAGGI, M.; LAUDADIO, V.; DARIO, C.; TUFARELLI, V. Investigating the genetic polymorphism of sheep milk proteins: an useful tool for dairy production. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 94:3090–9. 2014.

SHARIFI, M.; MORIDNUA, A.; MORTAZAVI, D.; SALEHI, M.; BAGHERI, M.; SHEIKHI, A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, 34(11), 2017.

TURAN, I.; DEDELI, O.; BOR, S.; ILTER, T. Effects of a kefir supplement on symptoms, colonic transit, and bowel satisfaction score in patients with chronic constipation: a pilot study. **Turk J Gastroenterol**, 25, 650–656, 2014.

UCHIDA, M.; ISHII, I.; INOUE, C.; AKISATO, Y.; WATANABE, K.; HOSOYAMA, S.; TOSHIHIKO, T.; NORITAKA, A.; KITADA, M. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, 17(9), 980-988, 2010.

ULUSOY, B. H.; COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ERKAN, M. E. An *in vitro* study on the antibacterial effect of *kefir* against some food-borne pathogens. **Turkish Microbiological Society**. 37:103–107, 2007.

UMEDA, C.; SONOYAMA, K.; YAMAGUCHI, N.; SAITO, R.; AKASHI, K.; MOTOSHIMA, H.; KAWABATA, J. Oral administration of freeze-dried kefir reduces intestinal permeation of and oral sensitization to ovalbumin in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 69(1), 249-251, 2005.

URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research**, 27(10), 653-658, 2007.

VINDEROLA, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, 72(2), 195-202, 2005.

VINDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, 211(3), 149-156, 2006a.

VINDEROLA, G.; PERDIGÓN, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by *kefir* microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research**, 73(04), 472, 2006b.

WANG, T.; LEE, H. G. Advances in research on cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid: a major functional conjugated linoleic acid isomer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 55:5, 720–731, 2015.

WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; ZHANG, B.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84(2), 341–347, 2009.

WENDORFF, W. L. Sheep milk and milk products: composition. **Encyclopedia of Animal Science**, Second Edition 964-966. 2011.

WENDORFF, W. L.; HAENLEIN, G. F. W. Sheep milk - composition and nutrition. **Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals**, 210–221, 2017.

WESCHENFELDER, S.; WLEST, J. M.; CARVALHO, H. H. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Mar/Jun, nº 367/368, 64: 48-55, 2009.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. M.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.2, p.473-480, 2011.

WESCHENFELDER, S.; PAIM, M. P.; GERHARDT, C.; WIEST, J. M. Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT. **Boletim de Indústria Animal**, v. 73, n. 1, p. 32-38, 2016.

YENER, A. U.; SEHITOGLU M. H.; OZCAN M. T. A.; BEKLER, A.; EKIN, A.; COKKALENDER, O.; DENIZ, M.; SACAR, M.; KARACA, T.; OZCAN, S.; KURT, T. Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, 19, 887-896, 2015.

YILMAZ-ERSAN, L.; OZCAN, T.; AKPINAR-BAYIZIT, A.; SAHIN, S. Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefirs. **Journal of Dairy Science**, 101, 3788-3798, 2018.

YILMAZ-AKYUZ, E.; USTUN-AYTRKIN, O.; BAYRAM, B.; TUTAR, Y. Nutrients, bioactive compounds, and health benefits of functional and medicinal beverages. **Nutrients in Beverages**, 175–235, 2019.

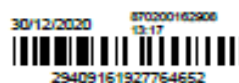
YUAN, G. -F.; CHEN, X. -E.; LI, D. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. **Food & Function**, 5:1360–8, 2014.

ZHENG, Y.; LU, Y.; WANG, J.; YANG, L.; PAN, C.; HUANG, Y. Probiotic properties of lactobacillus strains isolated from Tibetan kefir grains. **PLOS ONE** 8, e69868, 2013.

9. ANEXOS

ANEXO A – PATENTE DE INVENÇÃO

Foi depositado pelo Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial pedido de patente invenção, com o número de processo: “BR 10 2020 027022 2”, datado de 30/12/2020.



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 027022 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO DE JANEIRO (IFRJ)

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 10952708000104

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Pereira Almeida, 88 - Tijuca

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 20270021

País: Brasil

Telefone: 21 3293-6025

Fax:

Email: inovacao@ifrj.edu.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/12/2020 às 13:17, Petição 870200162908

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSAMENTO DE KEFIR DE LEITE DE OVELHA ADICIONADO DE DIFERENTES AÇÚCARES E KEFIR DE LEITE DE OVELHA ADICIONADO DE DIFERENTES AÇÚCARES

Resumo: A presente invenção diz respeito a um processo de obtenção de kefir de leite de ovelha caracterizado pela adição de diferentes açúcares (10 % p/v açúcar demerara, açúcar mascavo, frutose, açúcar de coco ou mel), submetido ao tratamento térmico (90°C/5 min), resfriado e fermentado a 25°C até pH=4.5. Com propriedades potenciais anti-oxidante, anti-hipertensiva e anti-diabética, e escores de acidez global entre 7.5-8.3, superiores aos comparados ao produto convencional feito a partir de sacarose.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 30/12/2020 às 13:17, Petição 870200162908

ANEXO B - CERTIFICADO DE TRABALHO APRESENTADO 13 SLACA -
SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS 2019

13 SLACA
Simpósio Latino Americano
de Ciência de Alimentos
O FUTURO DOS ALIMENTOS

Certificado
10 a 12 de Novembro de 2019

Certificamos que
Cristiane Pereira Larosa
participou do 13º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos: "O Futuro do Alimento", realizado de 10 a 12 de Novembro de 2019, Campinas - São Paulo - Brasil.

Dr. Mario Roberto Maróstica Jr.
Coordenador do Comitê de Programação

Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordenador do Comitê Científico

Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente do Evento

CNPq FAPESP CAPES PÁTRIA AMADA BRASIL

Certification by Galois

13 SLACA
Latin American Symposium
of Food Science
THE FUTURE OF FOOD

LETTER OF ACCEPTANCE
November 10-12, 2019 - Campinas, SP

We are pleased to inform you that your abstract entitled
KEFIR DE LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR DIFERENTES AÇÚCARES
by
Cristiane Pereira Larosa, Luciano Fernandes Albuquerque Santos, Mateus Alexandre Alves Silva,
Jonas T Guimarães, Celso Fasura, Julio Cesar Queiroz Penha, Maria Carmela Kasnowski, Ramon
Silva, Erick Almeida Esmerino, Mônica Queiroz Freitas, Marcia Cristina, Adriano Gomes da Cruz
submitted to the 13 SLACA – Latin American Symposium of Food Science - "The Future of Food."
was ACCEPTED.

We are looking forward to seeing you soon.
Sincerely,

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas

CNPq FAPESP CAPES PÁTRIA AMADA BRASIL

Certification by Galois

ANEXO C - CERTIFICADO DE TRABALHO APRESENTADO I CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS SENSORIAIS E DO CONSUMIDOR 2020

SENSE
LATAM

I Congresso Latino-Americano de Ciências Sensoriais e do Consumidor
24 A 26 DE NOVEMBRO DE 2020 . EVENTO ON-LINE

Certificamos que o trabalho

SHEEP MILK KEFIR SWEETENED WITH DIFFERENT SUGARS: SENSORY ACCEPTANCE AND CONSUMER EMOTION PROFILING

de autoria de

Cristiane Pereira Larosa, Jade Martins, Celso Fasura Balthazar, Tatiana Pimentel, Adriano Gomes da Cruz, Erick Almeida Esmerino

foi apresentado como poster na plataforma do I Congresso Latino-Americano de Ciências Sensoriais e do Consumidor – SenseLatam 2020, realizado entre os dias 24 e 26 de novembro de 2020, de forma virtual.

Márcia Arocha Gularte
Márcia Arocha Gularte

Maria Teresa Esteves Lopes Galvão
Maria Teresa Esteves Lopes Galvão

Regina Lúcia F. de Noronha
Regina Lúcia F. de Noronha

OURO

PRATA

BRONZE

Certification by Galoá

SENSE
LATAM

I Congresso Latino-Americano de Ciências Sensoriais e do Consumidor
24 A 26 DE NOVEMBRO DE 2020 . EVENTO ON-LINE

Certificamos que el trabajo intitulado

SHEEP MILK KEFIR SWEETENED WITH DIFFERENT SUGARS: SENSORY ACCEPTANCE AND CONSUMER EMOTION PROFILING

de autoría de

Cristiane Pereira Larosa, Jade Martins, Celso Fasura Balthazar, Tatiana Pimentel, Adriano Gomes da Cruz, Erick Almeida Esmerino

fue presentado como poster en la plataforma del I Congreso Latinoamericano de Ciencias Sensoriales y del Consumidor – SenseLatam 2020, realizado entre el 24 y el 26 de noviembre de 2020, en formato virtual.

Márcia Arocha Gularte
Márcia Arocha Gularte

Maria Teresa Esteves Lopes Galvão
Maria Teresa Esteves Lopes Galvão

Regina Lúcia F. de Noronha
Regina Lúcia F. de Noronha

OURO

PRATA

BRONZE

Certification by Galoá

ANEXO D - CERTIFICADO DE TRABALHO APRESENTADO CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS CBCTA 2020





CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
2 a 4 de dezembro de 2020

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado:

Microbial viability, antagonistic activity against four foodborne pathogens of sheep milk Kefir: Impact of addition of different sugars

De autoria de

Cristiane Pereira Larosa, Ramon Silva, Ramon Silva Rocha, Jonas T Guimarães, Celso Fasura Balthazar, Tatiana Pimentel, Marcia Cristina, Erick Esmerino, Mônica Queiroz Freitas, Adriano Gomes da Cruz

foi apresentado no formato Pôster no evento Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, que ocorreu de 2 a 4 de dezembro de 2020.

Adriano Gomes da Cruz
PROF. ADRIANO GOMES DA CRUZ
DIRETOR DE PUBLICAÇÕES SBCTA

Lucia Maria Jaeger de Carvalho
PROFA. DRA. LUCIA MARIA JAEGER
DE CARVALHO
PRESIDENTE SBCTA

ERICK ALMEIDA ESMERINO
PROF. ERICK ALMEIDA ESMERINO
SECRETÁRIO SBCTA DO
RIO DE JANEIRO

APOIO




Certification by Galoá






CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
2 a 4 de dezembro de 2020

CERTIFICADO

Nós certificamos que

Cristiane Pereira Larosa

participou do evento **Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos** que ocorreu de 2 a 4 de dezembro de 2020.

Adriano Gomes da Cruz
PROF. ADRIANO GOMES DA CRUZ
DIRETOR DE PUBLICAÇÕES SBCTA

Lucia Maria Jaeger de Carvalho
PROFA. DRA. LUCIA MARIA JAEGER
DE CARVALHO
PRESIDENTE SBCTA

ERICK ALMEIDA ESMERINO
PROF. ERICK ALMEIDA ESMERINO
SECRETÁRIO SBCTA DO
RIO DE JANEIRO

APOIO




Certification by Galoá

