



QualiKefir: Avaliação da Qualidade Físico-Química e Sensorial em Produtos derivados de Kefir, Leite e Iogurte Líquido Natural

Marisa Alexandra da Cruz Mascarenhas

2012



QualiKefir: Avaliação da Qualidade Físico-Química e Sensorial em Produtos derivados de Kefir, Leite e Iogurte Líquido Natural

Marisa Alexandra da Cruz Mascarenhas

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Susana Bernardino

2012

Título: Avaliação da qualidade físico-química de derivados de Kefir

Copyright © Marisa Alexandra da Cruz Mascarenhas
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche
Instituto Politécnico de Leiria
2011

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço à minha família, nomeadamente aos meus pais, por todo o apoio, tanto emocional como financeiro, sem eles nada disto seria possível.

Em segundo lugar agradeço ao Rui, por me ter incentivado, apoiado e acreditado em mim, por estar sempre ao meu lado e ainda por dar tanta importância aos meus sonhos, como se fossem dele.

Agradeço especialmente à Ana e à Raquel, por serem as amigas que são, por me terem ajudado na fase laboratorial, a superar todos os obstáculos que se apresentaram nesta fase. Obrigada por todo o apoio ao longo destes meses, obrigada por todos os momentos que passámos juntas e que me ajudaram a terminar esta tese.

Deixo também um agradecimento muito especial à professora Susana Bernardino, pela sua orientação, que tanta ajuda me deu e me guiou nesta dissertação, mais do que uma orientadora, demonstrou-se uma amiga sempre disponível para me ajudar.

Agradeço ainda à professora Susana Mendes, por toda a sua ajuda na parte do tratamento estatístico dos resultados, a sua ajuda foi muito importante.

Agradeço ao professor Rui Ganhão por me ter auxiliado na análise sensorial do novo produto, batido de kefir com frutos vermelhos.

Agradeço aos técnicos responsáveis pelos laboratórios, em especial ao Pedro Ramalho, por toda a disponibilidade que demonstrou ao longo destes meses.

Agradeço ao Tiago Simões por toda a sua ajuda com a Cromatografia Gasosa.

Agradeço a todo o pessoal do GIRM, em especial ao André Horta, ao Francisco Avelas, ao Celso Alves, à Rita Sousa e à Cátia Velez pela ajuda e disponibilidade para provar as amostras.

Por fim, dedico esta dissertação à memória dos meus avós, Miguel e António José.

Resumo

O kefir é um leite fermentado produzido pela ação de bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras contidas nos seus grãos, onde vivem em simbiose envolvidas por uma matriz de polissacáridos (kefiran). Este produto, de origem caucasiana, é considerado alimento probiótico com propriedades benéficas para a saúde, sendo ideal para pessoas intolerantes à lactose, proporcionando uma melhor digestão e funcionamento do intestino. Esta dissertação teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química e sensorial em produtos derivados de kefir, durante diferentes tempos de fermentação, nomeadamente 12, 24, 48 e 72 horas, leite e iogurte líquido natural. Foi realizado um plano HACCP para um batido de kefir com frutos vermelhos, onde se definiram, como pontos críticos de controlo, as etapas de mistura e armazenamento refrigerado.

Na avaliação da qualidade físico-química os resultados obtidos foram: o pH obtido para o Kefir24h (4,60) foi o que mais se aproximou do pH do iogurte (4,23); também no teor de acidez, o Kefir24h (250 mL/L) apresentou-se mais próximo do iogurte (269,5 mL/L) do que as restantes amostras. O teor de matéria gorda do Kefir24h foi o valor mais baixo de todas as amostras (1,96%), no entanto, os teores de matéria gorda das 6 amostras não apresentaram diferenças significativas entre elas; os teores de proteína bruta obtidos em cinco das amostras, com exceção do iogurte, foram bastante próximos. Na determinação do teor de lactose, os resultados demonstraram que ao longo da fermentação a lactose foi sendo consumida e degradada pelas bactérias, o iogurte (4,06%), apesar de possuir menos lactose do que o leite (4,83%), apresenta mais do que o Kefir24h (3,90%). Verificou-se que o leite obteve um teor de açúcares totais de 3,09%, valor próximo do teor do Kefir12h (2,88%). Na determinação da cinza total existiram algumas inconsistências. Na quantificação dos ácidos gordos verificou-se que existiu um aumento significativo dos ácidos gordos caproico, caprílico, cáprico, láurico e mirístico no kefir com frutos vermelhos com uma semana quando comparado com o kefir com frutos vermelhos inicial ou com as restantes amostras. O ácido palmítico foi o que apareceu em maiores percentagens em todas as amostras.

Na análise sensorial verificou-se que ao comparar o produto com um iogurte com frutos vermelhos comercial, apesar dos indivíduos preferirem o aspeto do kefir, em termos gerais, preferiram o iogurte, e afirmaram que o odor se apresentou bastante desagradável e que era ácido demais. Na prova de aceitação, e de acordo com os resultados obtidos, de 51 provadores, 47 comprariam o produto e apenas 4 se

recusariam. Tendo em conta os resultados que se obtiveram na prova de aceitação conclui-se que este produto foi bastante aceite pelos provadores.

Tendo em conta, todos os resultados, conclui-se que, em termos gerais, o kefir fermentado durante 24 horas demonstrou ser o mais indicado para todos os consumidores, principalmente os intolerantes à lactose.

Palavras-chave: kefir, HACCP, lactose, leite, frutos vermelhos

Abstract

Kefir is a fermented milk produced by the action of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeasts contained in its grains, which live in symbiosis surrounded by a matrix of polysaccharides (kefiran). This product, of Caucasian origin, is considered a probiotic food with beneficial properties for health, making it ideal for people with lactose intolerance, providing better digestion and bowel function. This work aimed to evaluate the physicochemical and sensory quality products derived from kefir during different fermentation times, namely 12, 24, 48 and 72 hours, milk and natural yoghurt. A HACCP plan was developed for a kefir smoothie with red fruit and the steps of mixing and refrigerated storage were defined as critical points.

In the evaluation of the physico-chemical quality results were: pH obtained for the Kefir24h (4,60) was near to the pH of the yogurt (4,23); also in the acidity, the Kefir24h (250 mL / L) appeared closer to the yogurt (269,5 mL / L) than the other samples. The fat content of the Kefir24h was the lowest of all the samples (1,96%), however, the fat content of the 6 samples showed no significant differences between them; the total protein obtained in the five samples except the yogurt, were very close. In the quantification of the lactose content the lactose content, the results showed that throughout the fermentation the lactose was being consumed and degraded by bacteria. The yogurt (4,06%), despite having less lactose than milk (4,83%) presents more than Kefir24h (3,90%). It has been found that the milk obtained a total sugar content of 3.09%, a value close to the Kefir12h content (2,88%). In the determination of the ash content there were some inconsistencies. In the quantification of fatty acids it was found that there was a significant increase in caproic, caprylic, capric, lauric and myristic fatty acids in kefir with red fruits after a week when compared with the initial kefir with red fruits or other samples. Palmitic acid was appeared at higher percentages in all samples.

In the sensory analysis it was found that when comparing the product with a commercial red fruit yogurt in spite of individuals prefer the look kefir, in general, they preferred yogurt, and stated that kefir was an unpleasant odor, mainly high acidity. In the test of acceptance, and in accordance with results obtained from 51 panellists, 47 and only buy the product 4 would refuse. Taking into account the results that were obtained in the test of acceptance was concluded that this product has been widely accepted by the tasters.

Taking into account all the results, it is concluded that, in general, kefir fermented for 24 hours has proved to be the most suitable for all consumers, especially those who are lactose intolerant.

Keywords: kefir, HACCP, lactose, milk, red fruits

Índice Principal

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
1. Introdução	1
1.1 Lactose e Lactase	1
1.2 Intolerância à Lactose	2
1.3 O Kefir	3
1.4 Produção de Kefir	6
2. Revisão da Literatura	7
3. Plano HACCP Kefir com frutos vermelhos	13
3.1 Âmbito	13
3.2 Fundamentos do HACCP	13
3.3 Programa de Pré-Requisitos	15
3.4 Equipa de Segurança Alimentar (Equipa HACCP)	19
3.5 Características do Produto	19
3.5.1 Estudo das Matérias-primas	19
3.5.1.1 Leite	19
3.5.1.2 Kefir	20
3.5.1.3 Frutos vermelhos congelados	22
3.5.1.4 Açúcar refinado	22
3.5.2 Características/descrição do produto acabado	23
3.5.3 Identificação da utilização prevista	23
3.5.3.1 Utilização prevista	23
3.5.3.2 Público-alvo	23
3.6 Fluxograma	24
3.6.1 Descrição das Etapas	24
3.6.1.1 Receção do material de embalagem	24
3.6.1.2 Receção de matérias-primas	25
3.6.1.3 Armazenamento de matérias-primas	25
3.6.1.4 Inoculação com culturas de kefir	26
3.6.1.5 Fermentação	26
3.6.1.6 Filtração	26
3.6.1.7 Mistura	26
3.6.1.8 Embalamento e Rotulagem	27

3.6.1.9	Armazenamento Refrigerado	27
3.6.1.10	Expedição	27
3.7	Análise de Perigos e Medidas preventivas	27
3.7.1	Perigos Biológicos	28
3.7.2	Perigos Químicos	28
3.7.3	Perigos Físicos.....	29
3.8	Avaliação dos Perigos e Determinação de PCC's	33
3.8.1	Matriz de Risco	33
3.8.2	Árvore de decisão	34
3.9	Fluxograma com PCC's	40
3.10	Sistema de Rastreabilidade	40
3.10.1	Rastreabilidade a Montante	41
3.10.2	Rastreabilidade a Jusante	41
3.10.3	Rastreabilidade do produto	42
3.10.4	Rastreabilidade interna	42
4.	Metodologia	43
4.1	Preparação das amostras	43
4.2	Determinação do pH	43
4.3	Determinação da acidez	43
4.4	Determinação do teor de matéria gorda	44
4.5	Determinação do teor de proteína bruta	45
4.6	Determinação do teor de Lactose	46
4.7	Determinação do teor de açúcares totais	46
4.8	Determinação da cinza total	47
4.9	Determinação dos ácidos gordos	48
4.10	Análise Sensorial	49
5.	Discussão de Resultados	51
5.1	Determinação do pH	52
5.2	Determinação da acidez	54
5.3	Determinação do teor de matéria gorda	55
5.4	Determinação do teor de proteína bruta	57
5.5	Determinação do teor de Lactose	58
5.6	Determinação do teor de açúcares totais	59
5.7	Determinação da cinza total	61
5.8	Determinação dos ácidos gordos	62
5.9	Análise Sensorial	66

6.	Conclusão	73
7.	Bibliografia	77
8.	Anexos	81
8.1	Metodologia	81
8.1.1	Preparação das amostras	81
8.1.2	Determinação do pH	81
8.1.3	Determinação do teor de matéria gorda	81
8.1.4	Determinação do teor de proteína bruta	82
8.1.5	Determinação do teor de lactose	82
8.1.6	Determinação do teor de açúcares totais	82
8.1.7	Determinação da cinza total	83
8.1.8	Determinação dos ácidos gordos	83
8.1.9	Análise Sensorial	84
8.2	Determinação da acidez	85
8.3	Determinação do teor de matéria gorda	88
8.4	Determinação do teor de proteína bruta	93
8.5	Determinação do teor de lactose	98
8.6	Determinação do teor de açúcares totais	106
8.7	Determinação da cinza total	111
8.8	Folha de prova afetiva	114
8.9	Folha de prova de aceitação	115
8.10	Tratamento Estatístico dos Resultados	116

Índice de Figuras

Figura 3.1 – Fluxograma do processo de produção do batido de kefir com frutos vermelhos	24
Figura 3.2 - Mapa de severidade versus probabilidade de ocorrências - identificação de perigos identificativos (exemplo) (Codex Alimentarius, 2005)	33
Figura 3.3 - Árvore de decisão (Codex Alimentarius, 2005)	34
Figura 3.4 – Fluxograma com PCC's do processo de produção do batido de kefir com frutos vermelhos	40
Figura 5.1 - Comparação dos valores médios de pH, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥). Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite	53
Figura 5.2 - Comparação dos valores médios de acidez, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥). Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite	54
Figura 5.3 - Comparação dos valores médios de matéria gorda, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥). Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite	56

Figura 5.4- Comparação dos valores médios de proteína bruta, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥). Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite

..... 57

Figura 5.5 - Comparação dos valores médios de teor de lactose, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥). Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite

..... 59

Figura 5.6 - Comparação dos valores médios de açúcares totais, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥). Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite

..... 60

Figura 5.7 - Comparação dos valores médios de cinzas totais, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥)

..... 61

Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite 63

Figura 5.9 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do iogurte ...	63
Figura 5.10 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h	63
Figura 5.11 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h com frutos vermelhos	63
Figura 5.12 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h com uma semana	63
Figura 5.13 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h com frutos vermelhos com uma semana	63
Figura 5.14 - Diagrama resultante da ACM para os diferentes parâmetros e classificação atribuída	69
Figura 5.15 - Diagrama resultante da ACM para as classificações agrupadas como 1+2, 3 e 4+5	70
Figura 5.16 - Análise fatorial dos parâmetros analisados na prova sensorial de aceitação	70
Figura 5.17 - Agrupamento das classificações em 1+2, 3 e 4+5 na análise fatorial	71
Figura 8.1.1 - Grãos de kefir antes de divididos pelos frascos	81
Figura 8.1.2 - Grãos de kefir e leite, durante a fermentação	81
Figura 8.1.3 - Potenciômetro utilizado para a determinação do pH (Crison, pH-meter basic 20)	81
Figura 8.1.4 - Estufa utilizada em várias determinações (Binder)	81
Figura 8.1.5 - Exsiccador com balões a arrefecer	81
Figura 8.1.6 - Destilador (Foss, Kjeltex TM 2100)	82
Figura 8.1.7 - Antes da destilação (à esquerda) e após a destilação (à direita)	82
Figura 8.1.8 - Placa de aquecimento (Velp)	82
Figura 8.1.9 - Banho utilizado para esta e outras determinações (Julabo)	82
Figura 8.1.10 - Determinação da Proteína Bruta	82
Figura 8.1.11 - Bico de Bunsen	83
Figura 8.1.12 – Centrifuga (Eppendorf)	83
Figura 8.1.13 - Cromatografo Gasoso Capilar (Finnigan TRACE GC Ultra)	83
Figuras 8.1.14, 8.1.15 e 8.1.16 - Preparação do kefir com frutos vermelhos	84
Figura 8.1.17 - Tabuleiro distribuído a cada provador. O copo da esquerda contém o batido de kefir com frutos vermelhos, o copo do centro contém água e o copo da direita contém o iogurte comercial de frutos vermelhos	84

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Constituição da equipa HACCP	19
Tabela 3.2 – Tabela nutricional do leite pasteurizado (Lønnerdal, 1997)	20
Tabela 3.3 – Composição microbiológica dos grãos de kefir (Irigoyen et al, 2004)	20
Tabela 3.4 – Composição físico-química dos grãos de kefir (Weschenfelder, 2009)	21
Tabela 3.5 – Tabela Nutricional do kefir (Carvalho, 2009)	21
Tabela 3.6 – Tabela nutricional dos frutos vermelhos (Embalagem do produto, Adélie)	21
Tabela 3.7 – Tabela nutricional do açúcar refinado (Embalagem do produto, Sidul)	23
Tabela 3.8 – Características do produto acabado	23
Tabela 3.9 – Atividade da água, pH e temperatura de crescimento de alguns microrganismos (Domingues, 2008)	28
Tabela 3.10 – Identificação de Perigos e Medidas Preventivas	30
Tabela 3.11 – Avaliação de Perigos e Determinação de PCC's	35
Tabela 3.12 – Plano HACCP	39
Tabela 3.13 - Informação que operadores e autoridades devem possuir (Ministério da Agricultura)	42
Tabela 5.1 - Resultados obtidos nas diferentes análises químicas, onde K1, K2 e K3 corresponde às três repetições realizadas, Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h e Kefir72h correspondem às médias das três repetições e, por fim, D. Padrão corresponde ao desvio padrão associado a cada média	51
Tabela 5.2 - Percentagem de ácidos gordos encontrados em cada uma das amostras ...	64
Tabela 5.3 - Resultados obtidos na prova sensorial de comparação, onde 1 significa que o provador preferiu o batido de kefir com frutos vermelhos e 2 significa que o provador preferiu o iogurte com frutos vermelhos comercial	67
Tabela 5.4 - Resultados obtidos na prova sensorial de aceitação, onde está apresentado o número de provadores que deram cada classificação a cada parâmetro	68
Tabela 8.10.1 – Teste da Homogeneidade das Variâncias	116
Tabela 8.10.2 – Teste Kruskal-wallis para o pH, teor de matéria gorda (gordura), proteína e cinzas	116
Tabela 8.10.3 – Teste de comparações múltiplas, Teste Post Hoc, para o pH, para o teor de matéria gorda, de proteína e cinzas	116
Tabela 8.10.4 – Teste ANOVA para o teor de acidez, de lactose e açúcares totais	119
Tabela 8.10.5 – Teste de comparações múltiplas, Teste Post Hoc, para o teor de acidez, lactose e açúcares totais	120

Lista de abreviaturas

ufc – unidades formadoras de colónias

HACCP – Hazard analysis and critical control points (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo)

ASAE – Autoridade Administrativa Nacional especializada no âmbito da Segurança Alimentar e da Fiscalização Económica.

FAO – Food and Agriculture Organization

Reg – Regulamentos do Parlamento Europeu

CE – Comunidade Europeia

PCC – Ponto Crítico de Controlo

GMP – Good MAnufacturing Practices, boas práticas de produção

SSOP – Standard Sanitation Operational Procedures (Procedimentos padrão de higiene operacionais)

PPR – Programas de pré-requisitos

NP – Norma Portuguesa

BPH – Boas práticas de higiene

BPF – Boas práticas de fabrico

K12h/ Kefir12h – Kefir fermentado durante 12 horas

K24h/ Kefir24h – Kefir fermentado durante 24 horas

K48h/ Kefir48h – Kefir fermentado durante 48 horas

K72h/ Kefir72h – Kefir fermentado durante 72 horas

Sig, nível de significância - limite que se toma como base para afirmar que um certo desvio é decorrente do acaso ou não

P value - estatística utilizada para sintetizar o resultado de um teste de hipóteses; é definido como a probabilidade de se obter uma estatística de teste igual, assumindo verdadeira a hipótese nula (as amostras são iguais)

1. Introdução

O leite é um alimento equilibrado e naturalmente rico em nutrientes entre os quais proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e sais minerais. As proteínas do leite são de elevado valor nutricional (entre 3 e 4% da sua composição), essenciais para o desenvolvimento e boa saúde dos tecidos e são uma fonte de aminoácidos indispensáveis, que o organismo humano não consegue produzir. Os hidratos de carbono no leite (4 a 6%), apresentam-se normalmente sob a forma de lactose que desempenha um papel importante no equilíbrio da flora intestinal (Lönnerdal, 1997). O teor lipídico é constituído por gorduras de fácil digestão, sobretudo ácidos gordos saturados e monoinsaturados, no entanto as gorduras representam apenas cerca de 3,5% do leite gordo e entre 1,5 e 1,8% do meio gordo. O leite magro praticamente não possui gordura. O leite inclui essencialmente vitaminas B1, B2, B12, A e D, cálcio, sódio, potássio, fósforo e zinco, não apresentando vitamina C e ferro. As vitaminas A e D, lipossolúveis, perdem-se na eliminação da gordura para obter o leite magro (Lönnerdal, 1997).

O leite é um alimento rico em cálcio, indispensável para a formação e boa manutenção dos ossos. O homem atinge a densidade óssea máxima aos 20 anos, a partir dessa idade ocorre uma erosão progressiva que se acentua na menopausa, nas mulheres, e a partir dos 55 anos, nos homens. Em pessoas com carência de cálcio, o processo de erosão intensifica-se, podendo dar origem a uma descalcificação dos ossos (osteoporose). Este é o motivo pelo qual se deve ingerir de 800 a 1200 mg de cálcio diariamente, dependendo da idade e/ou sexo (Lönnerdal, 1997; Deco Pro teste)

1.1 Lactose e Lactase

A lactose é um hidrato de carbono, mais especificamente um dissacarídeo redutor, composto por dois monossacarídeos: a glicose e a galactose. Esta é o único hidrato de carbono do leite e é exclusiva deste alimento, devido ao facto de apenas ser produzida nas glândulas mamárias dos mamíferos: no leite humano representa cerca de 7,2% e no leite de vaca cerca de 4,7%. A lactose é hidrolisada pela lactase na célula intestinal para que os seus componentes possam ser absorvidos por transporte ativo para dentro dessas células (Terra, 2007).

A lactase é produzida na mucosa intestinal, na zona superficial das microvilosidades do intestino delgado. A sua localização superficial torna-a vulnerável a qualquer agressão à mucosa intestinal, podendo deixar de ser produzida

temporariamente até à recuperação da mucosa ou permanentemente se a lesão for irreversível (Sociedade Portuguesa de Gastreterologia).

Ao longo do crescimento e na vida adulta, o uso de leite de outros mamíferos, pode causar perturbações digestivas, mais ou menos graves, podendo variar entre pequenas indisposições a complicações que podem impedir as atividades do dia a dia. Isto deve-se ao facto de, por norma, após o desmame, o homem manter apenas uma fração da atividade intestinal da lactase, comparativamente aos recém-nascidos, e por isto algumas pessoas não conseguem digerir a lactose (Terra, 2007).

1.2 Intolerância à Lactose

De acordo com a Sociedade Portuguesa de Gastreterologia, cerca de um terço da população Portuguesa sofre de intolerância à lactose. (Sociedade Portuguesa de Gastreterologia).

A intolerância à lactose é tipicamente diagnosticada pelo histórico de sintomas gastrointestinais que ocorrem após a ingestão de leite e derivados. Esta pode ser testada, por exemplo, por: testes do hidrogénio no ar expirado e de tolerância à lactose, dosagens enzimáticas na mucosa intestinal, pesquisa de substâncias reductoras nas fezes, glicose e pH fecal, curvas glicémica e galactosémica (Sociedade Portuguesa de Gastreterologia).

A intolerância pode ser de dois tipos: primária - a mais comum - é uma condição permanente, determinada geneticamente e tem origem na redução da atividade da lactase. Desenvolve-se naturalmente, ao longo do tempo, com a diminuição da produção de lactase desde a infância até à idade adulta. A quantidade de lactose que causa desconforto varia de indivíduo para indivíduo, dependendo da quantidade de lactose consumida, do grau de insuficiência da lactase e da composição nutricional do alimento no qual a lactose é ingerida. Existem situações muito raras em que a criança nasce sem a capacidade de produzir lactase, rejeitando o próprio leite materno. As crianças que nascem prematuramente estão mais predispostas a ter deficiência de lactase porque os níveis desta enzima só aumentam a partir do terceiro trimestre de gravidez (Mattar et al, 2010).

A intolerância à lactose pode ainda ser do tipo secundária, uma condição temporária onde a atividade da lactase é reduzida devido a doenças ou lesões que

prejudicam a mucosa intestinal (como por exemplo doença celíaca não tratada, doença de Chron, etc.). Quando a doença ou a lesão é curada, a atividade da lactase é recuperada. A intolerância pode ser permanente se a lesão for irreversível (Mattar et al, 2010).

A lactose que não é hidrolisada em glicose e galactose permanece no intestino e atua osmoticamente atraindo água para o intestino. As bactérias existentes fermentam a lactose não digerida o que dá origem a ácidos gordos de cadeia curta, dióxido de carbono e hidrogénio. A ação osmótica pode provocar diarreias e a ação bacteriana pode provocar desconforto, distensão e dores abdominais, além de náuseas e flatulência. A combinação destes sintomas pode levar ao desequilíbrio eletrolítico, desidratação, letargia, irritabilidade e acidose metabólica (Terra, 2007).

A população mundial está dividida em três grupos, quanto à prevalência de intolerância à lactose nos indivíduos adultos: grupo de alta prevalência (60% a 100%), que são os que possuem tradições agrícolas e de caça e que nunca beberam leite, ou que passaram a ingeri-lo há poucos milhares de anos (índios das Américas, esquimós, a maioria do povo africano, povos do Médio Oriente e da Ásia e os seus descendentes, judeus e árabes que ingerem leite desde a antiguidade mas em forma de produtos lácteos fermentados); grupo de prevalência intermédia (30% a 60%), que é constituído por africanos mestiços, mistos de europeus com orientais e com índios; e grupo de baixa prevalência (0% a 30%), que são os que têm tradição pastoril e têm consumido leite e produtos ricos em lactose por um longo período histórico (africanos de origem hamita, europeus do Norte e Centro e alguns indianos e árabes) (Terra, 2007).

Os indivíduos intolerantes à lactose podem consumir uma pequena quantidade de lactose, até 6g (ou 6%), sem que se manifestem os sintomas característicos. Este grupo de indivíduos, em alternativa ao leite, pode consumir derivados lácteos com baixo teor de lactose, como queijos duros, leites fermentados (iogurtes), leites com baixo teor de lactose, por exemplo através da utilização de Kefir (Mattar et al, 2010).

1.3 O Kefir

O Kefir é um leite fermentado ácido-alcoólico, originário das montanhas do Cáucaso, do Tibete e Mongólia, há muitos séculos atrás. O povo do Cáucaso descobriu que o leite fresco colocado em bolsas de couro de vez em quando fermentava e originava uma bebida efervescente. Nos países de origem, o Kefir até agora tem sido produzido

principalmente a partir de leite de ovelha, enquanto que na Europa a sua produção em escala comercial se restringe basicamente ao leite de vaca (Fontán et al, 2005).

O Kefir é o produto da fermentação do leite com grãos de Kefir e culturas-mãe preparadas a partir, também, de grãos de Kefir. Os grãos apresentam forma irregular, e têm aspeto de uma massa gelatinosa, os quais podem variar entre 1 e 6 mm de diâmetro. Contêm uma composição variável e complexa de microrganismos que inclui bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas e leveduras acopladas com caseína e açúcares complexos numa matriz de polissacarídeos. Os lactobacilos representam a maior parcela dos microrganismos presentes nos grãos de Kefir (65% a 80%), os lactococos e as leveduras completam a restante parcela (Mainville et al, 2005; *Codex Alimentarius*,1997).

A composição da população microbiana pode diferir se os grãos de Kefir tiverem origens diferentes ou mesmo se forem produzidos por diferentes métodos e substratos. A relação simbiótica existente entre os microrganismos presentes nos grãos indica a existência de espécies específicas que estão sempre presentes em conjunto nos grãos Kefir. Entre as bactérias ácido-lácticas isoladas de Kefir encontram-se: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactococcus lactis* e *Leuconostocs mesenteroides*. Entre as leveduras isoladas de grãos encontram-se: *Kluyveromyces marxianus*, *Torula kefir*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida lambica*. Foram ainda isolados: *Acetobacter aceti*, *A. rasens* e *Geotrichum candidum* (*Codex Alimentarius*, 1997; Irigoyen et al, 2004).

A FAO/WHO define normas alimentares para as culturas *starter* do Kefir, os grãos de Kefir, *Lactobacillus kefiri*, espécies do género *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*. Também incluem *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus* (Mainville et al, 2005; *Codex Alimentarius*, 1997).

As leveduras são importantes na fermentação do Kefir devido à produção de etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir contêm geralmente leveduras lacto-fermentativas (*Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torula kefir*), bem como leveduras que não são lacto-fermentativas (*Saccharomyces cerevisiae*) (Irigoyen et al, 2004).

O polissacarídeo principal é uma substância solúvel em água conhecida como Kefirano, produzido por várias espécies homofermentativas de *Lactobacillus* incluindo *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefir* (Terra, 2007).

A composição do Kefir depende diretamente do tipo de leite utilizado na fermentação. Durante a fermentação ocorrem alterações na composição dos nutrientes e de outros ingredientes do leite. Os principais produtos finais da fermentação são ácido láctico (derivado de aproximadamente 25% da lactose original presente no leite), acetaldeído, acetoína, etanol, diacetil e dióxido de carbono. Além disso, durante a fermentação, a vitamina B1, B12, cálcio, aminoácidos (valina, leucina, lisina e serina), ácido fólico e vitamina K, aumentam no Kefir. Em alguns casos os teores de tiamina e riboflavina tendem a diminuir (Güzel-Seydim et al, 1999).

Após cerca de 24 horas de fermentação, os grãos de Kefir podem apresentar um aumento de massa de aproximadamente 25%. Este aumento de massa possibilita a sua distribuição entre os produtores caseiros de Kefir. A distribuição é tradicionalmente realizada pela doação dos grãos excedentes a pessoas interessadas em cultivar o Kefir e esta forma simples de distribuição é responsável pela utilização do Kefir em todo o Mundo (Terra, 2007).

O Kefir pode ser feito de qualquer tipo de leite (vaca, cabra, ovelha, camelo, búfalo, etc...) e tem as seguintes características: pH cerca de 4,0; teor alcoólico de 0,5% a 2%; o teor de gordura depende do tipo de leite utilizado, o gosto é ácido, irritante e com um ligeiro sabor a levedura. A acidez acentuada e o sabor a levedura, em conjunto com a sensação de irritação, provocada pelo dióxido de carbono produzido pela flora de leveduras, pode ser considerado o sabor típico do Kefir (Irigoyen et al, 2004).

Os microrganismos presentes nos grãos de Kefir, os atributos químicos, e as tecnologias de fabrico do leite são fatores que influenciam as características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais do Kefir durante o armazenamento (Fontán et al, 2005).

Os benefícios de consumir Kefir na dieta são inúmeros, como por exemplo, os efeitos antibacterianos, imunológicos, antitumorais e hipocolesterolémicos (Terra, 2007).

A composição microbiológica do Kefir indica que este é um alimento probiótico complexo com um elevado número de bactérias e leveduras que coabitam em simbiose considerados probióticos. Em função das propriedades probióticas o Kefir é um alimento

que deve ser indicado não somente para indivíduos intolerantes à lactose, como também para todos os indivíduos que não possuem tal diagnóstico (Carvalho et al, 2009).

1.4 Produção de Kefir

O Kefir é tradicionalmente produzido através da adição de grãos de Kefir (2% a 10% do peso do leite), à temperatura ambiente (20°C a 25°C), a uma quantidade de leite previamente pasteurizado. A fermentação do leite dura aproximadamente 24 horas e após esse período, filtram-se os grãos de Kefir que serão novamente sujeitos a fermentação e o filtrado obtido é utilizado como bebida (Terra, 2007).

O processo industrial pode ocorrer de duas formas: semelhante ao método tradicional, utiliza os grãos de Kefir para a fermentação do leite, mas o tempo de fermentação é menor para se evitar a produção de carbono, que pode causar o enchimento da embalagem e recusa por parte do consumidor. Uma outra forma de processo é a utilização de culturas de Kefir previamente selecionadas compostas por microrganismos de interesse industrial estando disponíveis comercialmente misturas liofilizadas dessas culturas. O produto final obtido com grãos de Kefir possui uma variedade maior de microrganismos que o Kefir obtido de uma mistura de um número pequeno de culturas puras (Zajšek et al, 2009).

2. Revisão da Literatura

Na literatura científica, existem muitos estudos sobre as características microbiológicas de grãos de Kefir e sobre as características microbiológicas e bioquímicas de Kefir (produto acabado). No entanto, informações sobre as mudanças que ocorrem durante o processo de fermentação são escassas e só se referem à formação de ácidos orgânicos e substâncias que conferem sabor durante o processo (Fontán et al, 2005).

Fontán M. *et al* (2005) elaboraram um estudo acerca das alterações microbiológicas e químicas durante o fabrico de Kefir realizado com leite de vaca, utilizando uma cultura *starter* comercial. Neste artigo foram determinados, durante 196 h de fermentação: contagem de mesofilos aeróbios totais, bactérias ácido-lácticas (em três meios de cultura diferentes, agar M17, agar MSE, e agar Rogosa) e leveduras, e alguns parâmetros bioquímicos (níveis de lactose, glicose, galactose, L (+) - e D (-)-ácido-lácticos, etanol, acidez titulável e pH) em cinco lotes de Kefir feito a partir de leite de vaca utilizando uma cultura *starter* comercial (Fontán et al, 2005).

Após realizado o estudo Fontán M. *et al* (2005) verificaram que durante as primeiras 48 horas de fermentação o *Lactococcus spp.* predominou ($\approx 8^{10}$ ufc g⁻¹) e o *Lactobacillus spp.* tornou-se a espécie predominante após 48 horas ($\approx 8,5^{10}$ ufc g⁻¹). Durante as primeiras 24 horas de fermentação, o teor de lactose diminuiu de um valor médio de 4,92% (w/w) para 4,02% (w/w), a concentração de L (+)-ácido-láctico aumentou de 0,01% para 0,76% (w/w) e o pH diminuiu para 4,24 no mesmo período. Após 24 horas de fermentação, as mudanças nos níveis de lactose e L (+) – ácido-láctico, e no pH, ocorreram mais lentamente. Nem a glicose nem a galactose foram detetadas durante a fermentação. A produção de etanol foi limitada, atingindo um valor médio final de 0,018% (w/w) (Fontán et al, 2005).

Num outro estudo sobre as alterações em determinados parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais do Kefir durante o armazenamento refrigerado, Irigoyen A. *et al* (2004) realizaram uma preparação de lotes de Kefir utilizando 1% e 5% de adição de grãos de Kefir e as amostras para análise foram retiradas 24 horas após a inoculação e em seguida após 2, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 5°C (Irigoyen et al, 2004).

Depois da fermentação, 24 h após a inoculação, foi verificada a presença de lactobacilos e lactococos (10^8 ufc/ml), leveduras (10^5 ufc/ml) e bactérias ácido-acéticas

(10^6 ufc/ml). A flora microbiana ácido-láctica diminuiu em cerca de 101,5 entre os dias 7 e 14 e, em seguida, estabilizou. A contagem de leveduras e bactérias ácido-acéticas, lactose e pH mantiveram-se constantes ao longo do período de armazenamento, enquanto que o conteúdo de gordura total e matéria seca diminuiu. A percentagem inoculada exerceu influência pelo que nos lotes de amostras efetuados com a adição de 1% de grãos de Kefir obteve-se uma maior contagem de bactérias ácido-láticas, lactose e pH, enquanto que os lotes de amostras efetuadas com 5% de adição de grãos de Kefir obteve-se uma contagem mais elevada de leveduras e bactérias ácido-acéticas e viscosidade. Os conteúdos em gordura total e a matéria seca foram semelhantes em ambos os lotes de amostras. A análise sensorial das amostras de Kefir revelaram níveis de aceitabilidade máxima nos 2 primeiros dias de armazenamento (Irigoyen et al, 2004).

Mainville I. *et al* (2005) elaboraram um estudo que trata a caracterização polifásica de bactérias ácido-láticas no Kefir. Este estudo foi elaborado a fim de compreender a fermentação do Kefir, a composição do produto final, e tornar possível realizar alegações sobre as propriedades probióticas deste produto, e obter uma compreensão clara da microflora que deve ser alcançada (Mainville et al, 2005).

Neste estudo as bactérias ácido-láticas do Kefir foram isoladas e caracterizadas através de métodos fenotípicos, bioquímicos e genotípicos. Uma análise polifásica dos resultados permitiu a identificação da microflora ao nível da estirpe. O género *Lactobacillus* foi representado pelas espécies *Lb. Kefir* e *Lb. kefiranofaciens*. Foram isoladas as subespécies de *Lactococcus lactis* (lactis e cremoris). Foi ainda encontrada *Leuconostoc mesenteroides* subespécie *cremoris* (Mainville et al, 2005).

O Kefir estudado por Mainville I. *et al* (2005) contém poucas espécies de bactérias ácido-láticas, mas mostrou um elevado número de estirpes diferentes. Mainville I. *et al* (2005) descobriram que a abordagem por análise polifásica aumenta a confiança na determinação da estirpe. Este estudo ajudou a confirmar os grupos de estirpes e demonstrou que podem ter um impacto sobre a filogenia das estirpes (Mainville et al, 2005).

Witthuhn R.C. *et al* (2004) desenvolveram um estudo onde realizaram uma caracterização da população microbiana em diferentes fases de produção de Kefir e cultivo em massa de grãos de Kefir. Neste estudo foram utilizados, para o isolamento e identificação de microrganismos, sete meios de crescimento seletivos com características morfológicas e bioquímicas (Witthuhn et al, 2004).

O número de microrganismos durante a produção variou entre $4,6 \times 10^3$ e $2,6 \times 10^8$. Foi isolada *Zygosaccharomyces sp.* a partir de grãos de Kefir tradicionais e depois de aplicadas as condições de cultivo, durante o cultivo em massa, detetou-se a presença de *Candida lambica* e *C. krusei*. Embora estas duas espécies estejam presentes noutros leites fermentados, este estudo foi o primeiro a assinalar a sua presença no Kefir. Espécies de *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Cryptococcus* foram isolados dos grãos tradicionais, *Lactobacillus plantarum* estava presente nos grãos cultivados em massa, mas não nos grãos de Kefir tradicionais (Witthuhn et al, 2004).

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram claramente que a composição dos grãos de Kefir, em termos de espécies microbianas, varia conforme os métodos utilizados durante a produção do Kefir e dos grãos de Kefir. Os isolados de leveduras foram identificados como *C. lambica* e *C. krusei* e em conjunto com *Lactobacillus plantarum*, não foram encontrados em grãos de Kefir tradicionais. Neste estudo, certos microrganismos conseguiram crescer em mais do que um meio específico e isto só se tornou aparente quando os microrganismos isolados foram identificados. Os dados obtidos neste estudo, portanto, indicam que a composição microbiana dos grãos de Kefir não pode ser definida sem serem tidos em conta fatores como os métodos de produção de Kefir, a origem dos grãos e o método de identificação de microrganismos. Todos estes fatores contribuem para a variedade de população microbiana encontrada nos grãos de Kefir (Witthuhn et al, 2004).

Há alguns anos foi elaborado um estudo para a determinação de ácidos orgânicos e substâncias voláteis do sabor durante a fermentação de culturas *starter* de Kefir. Neste estudo realizado por Güzel-Seydim Z.B. et al, (1999) as amostras foram coletadas nos tempos 0, 5, 10, 15 e 22 h de fermentação (pH final = 4,6). As amostras foram analisadas, por HPLC, para a presença de ácido orótico, cítrico, pirúvico, úrico, láctico, acético, butírico, propiónico e hipúrico. A produção de acetaldeído, etanol, acetoína e diacetil foi monitorizada através de GC (Güzel-Seydim et al, 1999).

Güzel-Seydim Z.B. et al (1999) obtiveram os seguintes resultados: os níveis de ácido orótico, cítrico e pirúvico diminuíram ligeiramente durante a fermentação, o ácido hipúrico foi totalmente consumido em 15 h de incubação. Os ácidos acético, propiónico e butírico e o diacetil não foram detetados, a produção de etanol começou apenas após 5 h de incubação enquanto que a produção de acetaldeído e acetoína aumentou durante a fermentação (Güzel-Seydim et al, 1999).

Foi realizado um estudo, por Harta O. *et al*, (2003) acerca da propagação de grãos de Kefir, vigorosamente gaseificados, num sistema batch, utilizando várias soluções puras e mistas de hidratos de carbono (Harta et al, 2003).

Das experiências realizadas a 30°C com meios líquidos sintéticos contendo açúcares simples, a que continha frutose (pH 5,5 e 5 g/l de concentração Kefir inicial), apresentou a maior produção de biomassa (20,75 g) numa experiência de 24 horas. Foram ainda utilizadas misturas de açúcares e a experiência que continha glicose e sacarose na proporção fixa de 1:3, demonstrou ser a mais eficaz, produzindo 27,25 g de biomassa de Kefir (Harta et al, 2003).

Harta O. *et al*, (2003) estudaram ainda a Cinética de bioconversão do açúcar. Os resultados obtidos são importantes para a previsão de medidas eficazes da utilização, a baixo custo, de vários resíduos alimentícios para a produção de biomassa de Kefir e a possibilidade da sua utilização como uma nova cultura (Harta et al, 2003).

Para determinar a capacidade do Kefirano, um exopolissacárido obtido dos grãos de Kefir, para formar filmes e o efeito da adição de glicerol em diferentes concentrações nas propriedades do filme, Piermaria J.A. *et al* (2007) elaboraram um estudo onde verificaram que o Kefirano foi capaz de formar filmes em concentrações que variaram entre 5 e 10 g/kg. A concentração de 10 g/kg foi a selecionada devido ao facto de os filmes serem facilmente removidos da placa (Piermaria et al, 2007).

Neste estudo todas as soluções de formação de filme exibiram um comportamento pseudoplástico; a adição de glicerol não alterou as propriedades reológicas da solução. O filme de kefirano exibiu características de solubilidade diferenciais, a diferentes temperaturas. Estes filmes demonstraram boas propriedades de barreira de vapor de água e a adição de 25 g de glicerol por 100 gramas de polissacarídeo permitiu obter $4,09 \times 10^{-11} \text{g/m s Pa}$. Por sua vez os filmes sem glicerol mostraram-se frágeis e rígidos, dado que apresentavam valores de resistência à tração elevados e baixa deformação na rutura. A adição de glicerol levou a valores de alongamento extremamente elevados, permitindo uma flexibilidade comparável à dos materiais sintéticos (Piermaria et al, 2007).

Foi desenvolvido, por Zajšek K. *et al* (2009) um modelo matemático para descrever o efeito da temperatura e o tempo de fermentação nos parâmetros cinéticos da produção de etanol pela população de levedura mista dos grãos de Kefir, utilizando leite de vaca gordo como meio de fermentação. Para descrever este fenómeno foi utilizado o

modelo de Gompertz modificado, como se verifica no artigo dos autores (Zajšek et al, 2009).

Os parâmetros cinéticos do modelo foram previstos com sucesso usando o método dos mínimos quadrados. Nesta modelação foram investigados e quantificados: a influência do aumento da temperatura na biomassa dos grãos de Kefir e a composição microbiológica do Kefir e dos grãos de Kefir. Além disso, foi estabelecida a relação de Arrhenius entre a temperatura operacional e a taxa máxima de produção de etanol. A energia de ativação da produção de etanol foi de 64,3 kJ/mol. O modelo matemático adotado poderia descrever muito bem a dinâmica da produção de etanol a partir do início até à fase estacionária durante a fermentação do Kefir (Zajšek et al, 2009).

Num estudo acerca do teor de lactose em leites fermentados por grãos de Kefir Flávio Marques Terra (2007), procurou verificar as características físico-químicas, principalmente o teor de lactose, de filtrados de Kefir por períodos de fermentação variados utilizando dois tipos de leite, integral e semidesnatado (Terra, 2007).

Em todas as amostras foram realizadas as seguintes análises: determinação de glícidos redutores em lactose, de açúcares redutores totais, de gordura, de proteínas, acidez em ácido láctico e pH (Terra, 2007).

Flávio Terra (2007) constatou que os filtrados de Kefir de ambos os leites apresentaram um comportamento semelhante: queda do teor de lactose, aumento da concentração de ácido láctico e diminuição do pH, pequena redução do teor de gordura (4%) o teor de proteínas manteve-se constante. O teor de lactose do Kefir fermentado por 36 horas atinge valores abaixo do valor limite que pode ser consumido por indivíduos intolerantes à lactose sem causar desconforto característico (Terra, 2007).

Mattar e Mazo (2010) realizaram um estudo à cerca da intolerância à lactose em indivíduos de diferentes étnias, denominado *Intolerância à Lactose: Mudança de Paradigmas com a Biologia Molecular*. Neste estudo, verificaram que os indivíduos que possuem intolerância à lactose consomem uma menor quantidade de leite e derivados, pelo que, é necessário controlar a ingestão diária de cálcio. Nos adolescentes e adultos jovens geralmente se recomenda cálcio na dieta de 1200 a 1500mg por dia. Já nos adultos a quantia diária varia de acordo com o sexo e presença de menopausa. O cálcio deve ser suplementado caso esteja insuficiente na dieta, com monitorização e suplementação se necessário também de vitamina D. Iogurtes com culturas vivas que contém beta-galactosidase endógena são uma fonte alternativa de calorias e cálcio e

podem ser bem tolerados por muitos pacientes intolerantes. Porém os iogurtes que contém leite ou seus derivados que foram adicionados de volta após a fermentação podem produzir sintomas (Mattar et al, 2010).

3. Plano HACCP Kefir com frutos vermelhos

3.1 Âmbito

A implementação do sistema HACCP surge da necessidade de identificar os perigos e pontos críticos de controlo, tal como a probabilidade da sua ocorrência, em todas as etapas da linha de produção de batidos de kefir com frutos vermelhos. Desta forma, são definidas as medidas de controlo necessárias para uma diminuição do risco de contaminação ao longo do processo e assim garantir a segurança do produto final (Canôa, 2008).

Neste tipo de processo, os perigos encontrados foram biológicos, químicos e físicos. A prevenção começa logo à chegada da matéria-prima e só termina com a expedição do produto.

3.2 Fundamentos do HACCP

O sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo – HACCP – é um sistema preventivo que busca a produção de alimentos seguros. Este sistema está sustentado na aplicação de princípios técnicos e científicos na produção e manuseamento dos alimentos desde o “prado ao prato” do consumidor (*Codex Alimentarius*, 1997).

Deste modo, para além de ser um requisito legal, é importante a implementação de um sistema HACCP numa unidade de produção de kefir com frutos vermelhos, de forma a garantir a produção de um alimento seguro. O sistema HACCP segundo o *Codex Alimentarius*, aborda somente a segurança do alimento e não as operações quotidianas da indústria, que envolvem qualidade, aspetos económicos e questões regulamentares. O conceito de HACCP aplica-se a todos os estágios da cadeia de produção do alimento, ou seja desde o cultivo até ao consumo do produto final. Segundo o *Codex Alimentarius*, é recomendada a adoção, o mais completa possível, do sistema HACCP por toda a cadeia alimentar para obter um produto seguro para o consumidor (*Codex Alimentarius*, 1997).

Este sistema tem como princípio a prevenção, pois é aplicado ao longo de toda a linha de produção, desde a receção e seleção de matérias-primas e fornecedores, passando por toda a cadeia produtiva até à expedição do produto final. Assim a aplicação do HACCP permite identificar pontos críticos do processo para uma melhor segurança do

produto, e fornece informações sobre o que poderá ter provocado esses problemas (Canôa, 2008).

O HACCP tem vantagens na sua aplicação, tais como: a aplicação à totalidade da cadeia, aumento da confiança na segurança dos produtos alimentares, a prevenção em vez do controlo retrospectivo e ferramenta de inspeção e controlo. Este sistema tem também como função proporcionar uma melhor inspeção por parte das autoridades competentes (ASAE, FAO), ao mesmo tempo garante a qualidade dos alimentos e por consequência a sua comercialização nacional e internacional.

Segundo o regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à Higiene dos Géneros Alimentícios, o HACCP é um instrumento que auxilia os operadores de empresas do sector alimentar a alcançar padrões mais elevados de segurança dos géneros alimentícios. A sua aplicabilidade é obrigatória para toda a comunidade europeia. Caso existam infrações, o Dec. Lei nº 113/2006 define as sanções a aplicar quando o referido regulamento não é cumprido pelas empresas do sector alimentar (Reg. (CE) N.º 852/2004; DL n.º 113/2006).

São 7 os princípios gerais em que o HACCP assenta, os quais permitem identificar os perigos específicos e estabelecer as medidas preventivas para o seu controlo (Reg. (CE) N.º 852/2004):

- 1- Identificação de quaisquer perigos que devam ser evitados, eliminados ou reduzidos para níveis aceitáveis;
- 2- Identificação dos pontos críticos de controlo (PCC – pontos, fases operacionais ou procedimentos que devem ser monitorizados, de modo a eliminar um perigo ou a diminuir a probabilidade do seu aparecimento) na fase ou fases em que o controlo é essencial para evitar ou eliminar um risco ou para o reduzir para níveis aceitáveis;
- 3- Estabelecimento de limites críticos em pontos críticos de controlo, que separem a aceitabilidade da não aceitabilidade com vista à prevenção, eliminação ou redução dos riscos identificados;
- 4- Estabelecimento e aplicação de processos eficazes de vigilância em pontos críticos de controlo;
- 5- Estabelecimento de medidas corretivas quando a vigilância indicar que um ponto crítico de controlo não se encontra sob controlo;
- 6- Estabelecimento de processos, a efetuar regularmente, para verificar que as medidas referidas nos pontos anteriores funcionam eficazmente;

- 7- Elaboração de documentos e registos adequados à natureza e dimensões das empresas, a fim de demonstrar a aplicação eficaz das medidas referidas anteriormente.

Existem 14 etapas para a Implementação de um plano HACCP (Canôa, 2008):

- 1ª Etapa – Definição do âmbito do estudo;
- 2ª Etapa – Seleção da equipa HACCP;
- 3ª Etapa – Descrição do produto e do processo;
- 4ª Etapa – Identificação do uso pretendido do produto;
- 5ª Etapa – Elaboração do diagrama de fluxo;
- 6ª Etapa – Confirmação *in loco* do diagrama de fluxo;
- 7ª Etapa – Identificação dos perigos e das suas medidas preventivas (1º princípio);
- 8ª Etapa – Identificação dos pontos críticos de controlo (2º princípio);
- 9ª Etapa – Estabelecimento dos limites críticos (3º princípio);
- 10ª Etapa – Estabelecimento de um sistema de monitorização (4º princípio);
- 11ª Etapa – Estabelecimento de ações corretivas (5º princípio);
- 12ª Etapa – Verificação do sistema (6º princípio);
- 13ª Etapa – Estabelecimento de procedimentos de registos e documentação (7º princípio);
- 14ª Etapa – Avaliação do sistema.

3.3 Programa de Pré-Requisitos

Para que um Sistema HACCP funcione eficazmente, este deve ser acompanhado de programas de pré-requisitos que assegurem as condições operacionais e ambientais básicas necessárias para a produção de alimentos seguros. Os Sistemas HACCP devem ser implementados sobre uma base sólida de cumprimento de pré-requisitos, tais como os incluídos no âmbito das Boas Práticas de Fabrico (GMP – Good Manufacturing Practices) e dos Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (SSOP – Standard Sanitation Operational Procedures), que fazem parte das GMP. As GMP e os SSOP têm uma abordagem ampla e cobrem muitos aspetos operacionais das instalações e de pessoal (Baptista et al, 2003).

Entre os principais pré-requisitos a ter em consideração e a implementar é possível enumerar os seguintes:

- Construção de instalações – O estabelecimento estará localizado, será construído e mantido de acordo com os princípios de desenho higiênico. Haverá um fluxo linear de produtos e um controlo da circulação de materiais e pessoas por forma a minimizar a contaminação cruzada entre produtos.
- Manutenção de instalações – As instalações serão mantidas em bom estado, de modo a não constituírem em perigo para os alimentos nelas processados.
- Ventilação – A ventilação será capaz de promover a adequada renovação de ar e a remoção de humidade quando necessário, evitando a circulação de ar de áreas sujas para áreas limpas, que possa promover a contaminação cruzada.
- Iluminação – A iluminação em cada área será adequada às atividades aí realizadas com particular relevância para os locais onde se efetuam atividades de inspeções aos produtos.
- Qualificação e avaliação de fornecedores – Será garantido que os fornecedores implementam sistemas HACCP e os utilizam de uma forma eficaz, por forma a garantir a segurança alimentar dos produtos que fornecem.
- Especificações – Existirão especificações de todas as matérias-primas, materiais de embalagem e produtos finais.
- Equipamento – Todo o equipamento produtivo será concebido e instalado de acordo com os princípios de desenho higiênico, estabelecendo-se e documentando-se programas de manutenção preventiva. Os equipamentos de inspeção, medição e ensaio serão também calibrados ou verificados.
- Higienização – Todos os procedimentos de limpeza e desinfeção de equipamentos e instalações serão documentados e cumpridos. Será estabelecido um plano de higienização. Os agentes de limpeza e desinfeção serão apropriados e seguros para as condições de uso. Existiram instruções relativas ao modo de preparação e utilização destes produtos, incluindo os aspetos de segurança. Existiram ainda as fichas técnicas e de segurança dos produtos utilizados e será contemplada informação que confirme a possibilidade de utilização desses produtos na indústria alimentar. Caso estas informações não sejam disponibilizadas ou

não estejam ao alcance da empresa, estas serão sempre solicitadas ao fornecedor.

- Higiene pessoal – Todos os operadores ou quaisquer outras pessoas que entrem numa área de processamento de alimentos terão formação e informação para cumprir, entre outros, os requisitos relativos à higiene pessoal. Para tal, serão disponibilizados uniformes adequados e as instalações estarão dotadas dos meios adequados por forma a assegurar a realização das atividades de higiene pessoal requeridos (por exemplo dispositivos para a lavagem e secagem das mãos; lava-botas).
- Controlo de produtos químicos – Existirão procedimentos documentados de forma a garantir a separação e uso adequado de quaisquer produtos químicos usados nas instalações (por exemplo produtos de limpeza).
- Receção, armazenamento e expedição – Todas as matérias-primas serão armazenadas em condições higiénicas e ambientais apropriadas, tais como temperatura e humidade, para garantir a sua inocuidade.
- Rastreabilidade, notificação e recolha – Todas as matérias-primas e produtos serão identificados, por forma a assegurar a rastreabilidade, a notificação e recolha de produto, quando perante uma ocorrência que possa pôr em causa a segurança do consumidor.
- Controlo de pragas – Serão estabelecidos programas eficientes de controlo de pragas, de modo a prevenir a presença de pragas nas áreas de processamento de alimentos. À semelhança do que se passa com os produtos de higienização, irão ser dispostas ou solicitadas as fichas técnicas e de segurança dos produtos utilizados, bem como cópias das declarações de autorização de utilização dos produtos passada por parte da Direção Geral da Saúde.
- Remoção de resíduos – Os resíduos serão transportados, armazenados e eliminados, de modo a minimizar a formação de odores e minimizar a probabilidade de atração e de desenvolvimento de pragas. O sistema de esgotos assegurará uma adequada drenagem de todas as águas residuais geradas nas instalações e não provocará o refluxo ou ligação cruzada com sistemas de tubagens que transportam água.
- Abastecimento e potabilidade de água – A água utilizada possuirá as características definidas na legislação para a água de consumo humano e a sua rede interna de abastecimento encontrar-se-á adequadamente

mantida, de modo a não constituir uma fonte de contaminação para a água e para os alimentos com os quais contacte.

- Instalações sanitárias – Estas serão adequadas, de acordo com a legislação em vigor, não podendo possuir contaminação direta com a área de manipulação de alimentos.

Para além destes pré-requisitos expostos, estão incluídos no programa de pré-requisitos (Baptista et al, 2003):

- Procedimentos de garantia de qualidade.
- Controlo do processo.
- Controlo de formulação e receitas.
- Procedimentos de rotulagem.
- Boas práticas de manipulação de alimentos.
- Plano analítico (microbiológico, químico, parasitologia).
- Formação em matéria de higiene dos géneros alimentícios e HACCP.

O programa de pré-requisitos contempla portanto um conjunto de ações e medidas preventivas, cuja aplicação tem como objetivo principal preparar a empresa para a implementação de um sistema HACCP. Este programa constitui assim a base de aplicação de um sistema de gestão de segurança alimentar, devendo ser incluídas a avaliação de não conformidades e a implementação de todos os pré-requisitos relatados.

Os pré-requisitos serão implementados ao longo de todo o sistema de produção, quer como programas de aplicação geral ou programas aplicáveis a um produto particular ou a uma linha de operação. Todos eles são aprovados pela equipa de segurança alimentar (equipa HACCP), daí a sua estipulação e implementação. A equipa HACCP terá em consideração a utilização da informação adequada (por exemplo requisitos estatutários e regulamentares, requisitos dos clientes, linhas de orientação reconhecidas, princípios e códigos de boas práticas da Comissão do *Codex Alimentarius* e normas sectoriais, nacionais e internacionais para o estabelecimento e posterior aplicação do programa de pré-requisitos (PPR) mencionado. A verificação do PPR será planeada e este será modificado sempre que necessário. Serão mantidos registos das verificações e das modificações (NP EN ISO 22000:2005).

3.4 Equipa de Segurança Alimentar (Equipa HACCP)

A equipa tem de ser multidisciplinar, ou seja, todos os membros da equipa têm que ter formação, visto que para a implementação de um sistema de HACCP são necessários conhecimentos técnico-científicos variados, para que deste modo sejam identificados corretamente os perigos presentes, para posterior estabelecimento de pontos críticos de controlo e um controlo adequado dos mesmos. A equipa é constituída por um líder, escriba e restantes especialistas em áreas distintas. Normalmente estão presentes técnicos de produção e de controlo de qualidade, os quais dão à equipa informação acerca da parte prática da empresa, ou seja, o que realmente ocorre na linha de produção. Existem também os especializados em outras áreas como por exemplo, HACCP, química, microbiológica e alimentar. A direção deve fornecer os meios necessários para o estudo e implementação do HACCP, nomeadamente, tempo para formações e reuniões, assim como acesso à documentação necessária (Poças e Moreira, 2003).

A equipa é composta por (exemplo):

Tabela 3.1 – Constituição da equipa HACCP.

Nome	Formação	Função
Marisa Mascarenhas	Médica Veterinária	Líder da Equipa de Segurança Alimentar
Ana Santana	Engenheira Alimentar	Técnica Superior da Equipa de Segurança Alimentar
Raquel Teixeira	Microbióloga	Técnica de Microbiologia da Equipa de Segurança Alimentar
Marisa Loureiro	Engenheira Química	Técnica de Controlo de Qualidade
Joaquim Mossorovia	Produção Animal	Chefe de Produção

3.5 Características do Produto

3.5.1 Estudo das Matérias-primas:

3.5.1.1 Leite

Esta matéria-prima, já anteriormente referida, é um alimento equilibrado e rico em nutrientes entre os quais proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas e sais minerais (Tabela 3.2)

Foi escolhido o leite pasteurizado uma vez que este é sujeito a um tratamento térmico suave o que mantém as qualidades nutricionais do leite mas que elimina os microrganismos patogénicos.

Tabela 3.2 – Tabela nutricional do leite pasteurizado (Lønnerdal, 1997).

Leite Pasteurizado	200ml
Valor Energético	120Kcal = 504KJ
Hidratos de Carbono	9g
Proteínas	6,0g
Gorduras Totais	6,0g
Gorduras Saturadas	3,5g
Gorduras Trans	0,3g
Fibra alimentar	0 g
Sódio	90 mg
Cálcio	222 mg

3.5.1.2 Kefir

Como já referido anteriormente, o kefir, de origem caucasiana, é uma bebida resultante da fermentação do leite (vaca – exemplo utilizado, cabra, ovelha, coco, arroz ou soja) com grãos de kefir, sendo estes grãos esbranquiçados de textura esponjosa que, no fundo, são um complexo de leveduras e bactérias das quais constam *Lactobacillus*, *Leuconostoc spp.*, *Candida Kefyr*, *Kluyveromyces fragilis* e *Acetobacter*, mas a sua composição é extremamente diversificada e rica como se pode observar nas tabelas 3.3 e 3.4 (Irigoyen et al, 2004).

Tabela 3.3 – Composição microbiológica dos grãos de kefir (Irigoyen et al, 2004).

Constituintes da flora bacteriana	
Bactérias	Leveduras
<i>Lactobacilli</i>	<i>Kluyveromyces species</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Lactobacillus kefiranoformans</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Saccharomyces species</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>
<i>Lactobacillus gasserii</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Torulasporea species</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Torulasporea delbrus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Torulasporea delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Candida species</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Candida valida</i> 6
<i>Lactococci</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Other yeasts</i>
<i>Streptococci</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
<i>Enterococci</i>	<i>Debaromyces hansenii</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Bretanomyces anomalus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Leuconostocs</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	
<i>Acetic acid bacteria</i>	
<i>Acetobacter aceti</i>	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Other bacteria</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Micrococcus sp.</i>	

O consumo de leite fermentado com kefir, alimento probiótico com alto valor nutricional (ver tabela 3.4), está associado ao combate a diversas doenças, desde problemas do foro nervoso, cardiovascular e ósseo, passando por problemas gastrointestinais, metabólicos, diabetes e obesidade (Weschenfelder, 2009; Carvalho, 2009).

Tabela 3.4 – Composição físico-química dos grãos de kefir (Weschenfelder, 2009)

Componentes	Valores aproximados
Água	87%
Acidez em graus Dornic (°D)	80 (final do processo)
Proteínas totais	3,4 – 4,2%
Sacarose	4,4 (mínimo)
Gordura	0,5 – 3,0%
Matérias albuminóides	3,1%
pH	4,2 – 4,5
Acidez volátil	3,9mL de NaOH n/10 x 100mL
Caseína	2,8%
Albumina	0,2%
Lactose	2,6 – 3,75%
Ácido láctico	0,7%
Álcool (etanol)	0,23 – 1,0%
Gás carbônico	20 – 25% (v/v)
Minerais	0,74 – 0,8%
Diacetil	0,49mg/L
Acetaldeído	1,30mg/L

Como se pode observar na tabela 3.4, esta bebida de consistência semelhante à dos iogurtes líquidos tem um carácter ácido (pH<7) devido à presença de ácido láctico e acético e tem, como referido, um efeito probiótico e antimicrobiano assinalável, tendo ainda na sua constituição vitaminas (Vitamina B12, vitamina D,...), minerais (por exemplo: cálcio) e aminoácidos essenciais (tabela 3.5) (Carvalho, 2009).

Tabela 3.5 – Tabela Nutricional do kefir (Carvalho, 2009).

Informação Básica (por 100g)	Energia (Kcal)	65,1
	Proteínas (g)	3,3
	Hidratos de Carbono (g)	5,1 (4 de lactose)
	Lípidos (g)	3,5
	Quantidade de água (g)	87,5
	Colesterol (mg)	13
Vitaminas	Vitamina A (µm)	60
	Vitamina B1 (mg)	0,04
	Vitamina B2 (mg)	0,17
	Vitamina B3 (mg)	0,09
	Vitamina B6 (mg)	0,05
	Vitamina B12 (µm)	0,5
	Vitamina C (mg)	1
	Vitamina D (µm)	80
	Vitamina E (mg)	0,11
Aminoácidos Essenciais (52,4%)	Triptofano (g)	0,05
	Fenilalanina + Tirosina (g)	0,35
	Leucina ((g)	0,34
	Isoleucina (g)	0,21
	Theronine (g)	0,17
	Metionina + Cisteína (g)	0,12

	Lisina (g)	0,27
	Valina (g)	0,22
Minerais	Cálcio (mg)	120
	Fósforo (mg)	100
	Magnésio (mg)	12
	Potássio (mg)	150
	Sódio (mg)	50
	Cloro (mg)	100
Vestígios de Elementos	Ferro (mg)	0,05
	Cobre (µm)	12
	Molibidénio (µm)	5,5
	Manganésio (µm)	5
	Zinco (mg)	0,36

3.5.1.3 Frutos vermelhos congelados

O consumo de frutos vermelhos tem vindo a aumentar ao longo dos anos devido ao valor nutricional e aos efeitos terapêuticos.

Estes frutos contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais e fibras, diversos compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis.

Inúmeros estudos realizados com compostos fenólicos, especialmente os flavonoides (antoxantinas e antocianinas), pigmentos também presentes em vinhos tintos, demonstram a capacidade de captar radicais livres (atividade antioxidante), prevenção de doenças cardiovasculares e circulatorias, cancerígenas, prevenção de diabetes e Alzheimer. As mais recentes publicações relatam as propriedades de vários compostos fitoquímicos, especialmente os compostos fenólicos presentes nas frutas, atuando com eficácia nas infeções causadas por *Helicobacter pylori* e na indução da apoptose (Kuskoski et al, 2005).

Tabela 3.6 – Tabela nutricional dos frutos vermelhos (Embalagem do produto, Adélie).

Frutos Vermelhos Adélie	Por 100 g
Valor Energético	35 Kcal = 148 KJ
Proteínas	1g
Hidratos de Carbono	7,4g
Hidratos de Carbono dos quais Açúcares	7,1g
Lípidos	0,2g
Fibras Alimentares	5,99g
Sal	0,007g

3.5.1.4 Açúcar Refinado

O açúcar, sem outra designação específica, é a sacarose obtida da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) ou da beterraba (*Beta vulgaris*). Neste produto foi utilizado açúcar refinado obtido da cana-de-açúcar.

Tabela 3.7 – Tabela nutricional do açúcar refinado (Embalagem do produto, Sidul).

Açúcar Refinado	100g
Hidratos de Carbono	99,98g
Proteínas	0g
Gordura Total	0g
Calorias	387 Kcal
Vitaminas	0 µg
Cálcio	1mg
Ferro	0,01mg
Cobre	0mg
Magnésio	0mg
Selênio	0,6 µg
Potássio	2mg
Sódio	0mg
Zinco	0mg
Água	0,03g

3.5.2 Características/descrição do produto acabado:

Tabela 3.8 – Características do produto acabado.

Denominação do produto	Batido de Frutos Vermelhos
Ingredientes	Leite fermentado com grãos de kefir, frutos vermelhos (Cássis, amoras, groselhas, ginja, framboesas, mirtilos) açúcar.
Características do produto	pH ± 4,60 peso líquido:
Embalagem	Garrafa com tampa
Condições de Armazenamento	Armazenamento Refrigerado (entre 4 e 6 °C)
Condições de Transporte	Armazenamento Refrigerado (entre 0 e 5 °C)
Prazo de Validade	Consumir no prazo de 2 dias
Local de venda	Grossistas e retalhistas
Recomendações	Deve ser mantido a baixa temperatura (entre 4 e 6 °C) para não alterar as suas características organolépticas e qualidade
Rotulagem	A origem, características, ingredientes, peso líquido, lote, prazo de validade, se contém alergéneos e outras informações que o produtor considere necessárias
Condições de Utilização	Pronto a consumir

3.5.3 Identificação da utilização prevista

3.5.3.1 Utilização prevista

Produto consumido sem processamento posterior.

3.5.3.2 Público-alvo

Devido à natureza deste produto, o seu público-alvo será: pessoas que possuam intolerância à lactose, podendo ser consumido por todas as faixas etárias e a todos os indivíduos que pretendam ter um estilo de vida saudável.

3.6 Fluxograma

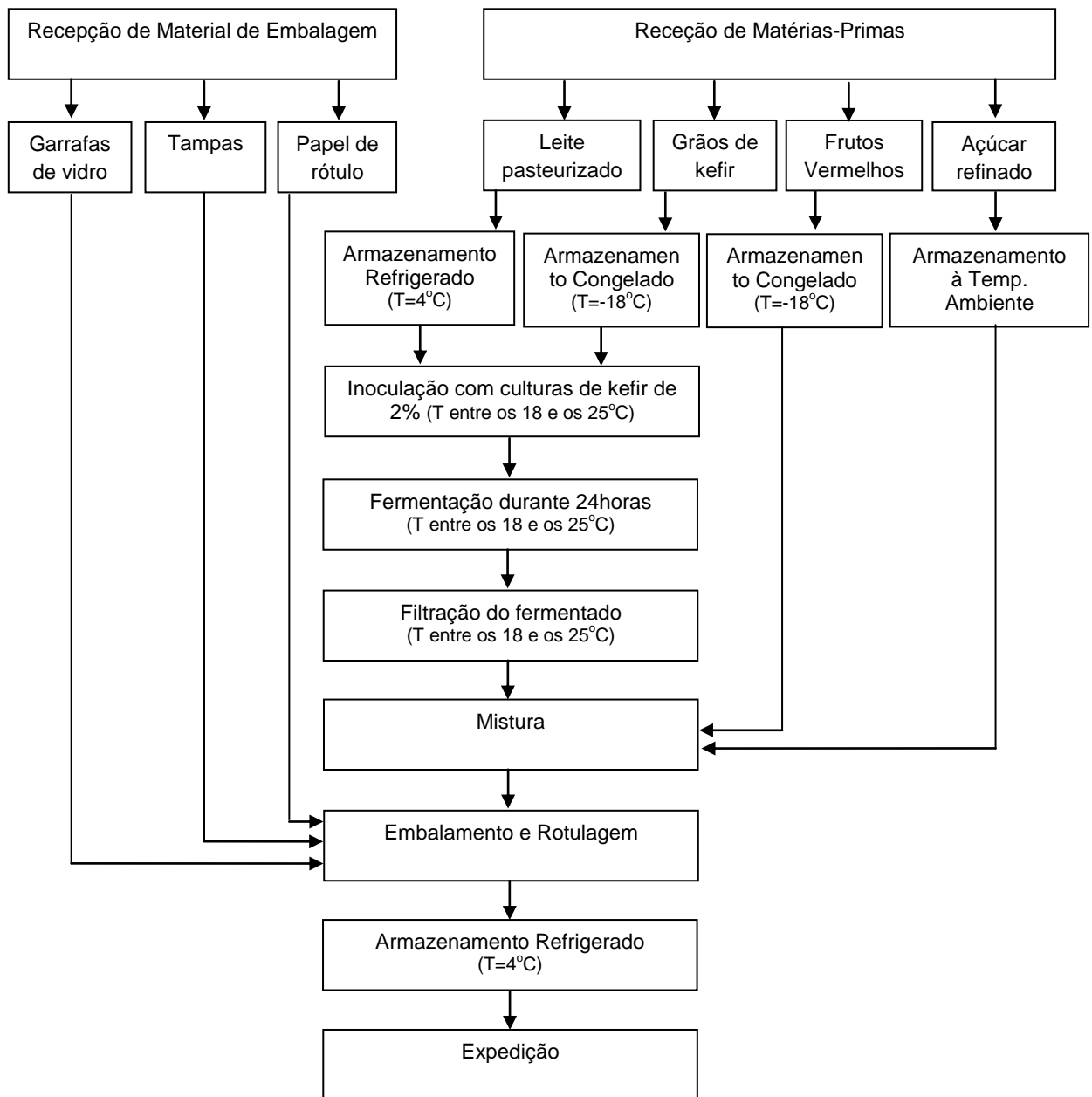


Figura 3.1 – Fluxograma do processo de produção do batido de kefir com frutos vermelhos.

3.6.1 Descrição das Etapas

3.6.1.1 Recepção do Material de Embalagem

Depois da entrada na empresa, as embalagens são colocadas no local próprio, armazenamento de embalagens, para posterior colocação no produto.

A medida de controlo nesta etapa será a visualização a cada receção de material de embalagem.

3.6.1.2 Receção de Matérias-primas

A área da fábrica destinada à receção de matérias-primas situa-se num local de fácil acesso. O terreno envolvente é amplo, para permitir o estacionamento e manobras de viaturas. O cais também é amplo, para permitir a descarga de várias viaturas em simultâneo.

Aquando da chegada das matérias-primas existem algumas medidas tomadas (Santiago, 2005):

- Analisam-se os rótulos dos produtos e avalia-se o estado das embalagens;
- Os rótulos encontram-se sempre junto aos produtos;
- Verificam-se as temperaturas dos alimentos refrigerados e congelados;
- Procedem-se ao registo de entrada de toda a matéria-prima, imediatamente após a sua receção.

A medida de controlo nesta etapa será a monitorização a cada receção de matéria-prima.

3.6.1.3 Armazenamento de matérias-primas

O armazenamento das matérias-primas obedece a alguns parâmetros:

- Local com boa ventilação e iluminação, bem como prateleiras em aço inox, de 1,80m de altura e a prateleira inferior deverá estar a cerca de 20cm do solo;
- Os alimentos são separados por câmaras – uma de refrigeração para o leite pasteurizado e uma segunda câmara congelada para os grãos de kefir e para os frutos vermelhos;
- Estes são ainda separados por categorias (zonas separadas para cada matéria-prima), devendo sempre manter o rótulo virado para a frente de modo a ser bem visível;
- Para os alimentos que não necessitam de armazenamento refrigerado, ou seja, o açúcar refinado são armazenados num local, à temperatura ambiente, com boa circulação de ar, humidade relativa controlada e iluminação;
- Os produtos recém-chegados são colocados atrás dos já existentes, de modo a que os primeiros a chegar sejam os primeiros a sair (tendo-se sempre em atenção as datas de validade dos produtos);

- Não existe sobrecarga dos equipamentos de frio, controlando-se sempre as quantidades de produto que estes possuem;
- Existe sempre o cuidado de não colocar as matérias-primas em contacto com as paredes, chão ou teto das câmaras de refrigeração e armazenamento de especiarias (Santiago, 2005).

As medidas de controlo nesta etapa serão a temperatura das câmaras de refrigeração, a humidade relativa, o estado de higiene e desinfeção das mesmas e da sala de armazenamento à temperatura ambiente.

3.6.1.4 Inoculação com Culturas de Kefir

Nesta etapa, os grãos de kefir são pesados, 2g, e divididos por frascos com 100 mL de leite meio gordo pasteurizado.

Nesta etapa, a medida de controlo é a temperatura da sala onde é realizada a inoculação.

3.6.1.5 Fermentação

Depois da inoculação, os grãos de kefir são deixados a fermentar, no leite, durante 24 horas, à temperatura ambiente, entre os 18 e os 25°C.

Nesta etapa, a medida de controlo é a temperatura da sala onde é realizada a fermentação.

3.6.1.6 Filtração

A filtração é realizada utilizando filtros adaptados para este fim, onde os grãos de kefir são separados do fermentado e este é imediatamente refrigerado para futura mistura.

Nesta etapa, a temperatura, o grau de higienização e o estado de conservação dos filtros serão as medidas de controlo desta fase de produção.

3.6.1.7 Mistura

Após a filtração, é realizada a mistura, em tanques próprios, onde é colocado o fermentado obtido nas etapas anteriores, os frutos vermelhos e o açúcar, nas seguintes proporções: 300mL de fermentado, com 25g de frutos vermelhos e 25g de açúcar.

Nesta etapa, a temperatura, o grau de higienização e o estado de conservação do equipamento de mistura serão as medidas de controlo desta fase de produção.

3.6.1.8 Embalamento e Rotulagem

Nesta fase do processo de produção, o batido de kefir obtido da etapa anterior é colocado em garrafas de vidro, são colocadas as tampas e por fim, as embalagens são rotuladas, colocadas em packs e paletizadas, tudo isto, em ambiente controlado e devidamente refrigerado.

As medidas de controlo, nesta etapa, serão a temperatura, o grau de higienização e o estado de conservação tanto do equipamento de embalamento, como dos materiais de embalagem.

3.6.1.9 Armazenamento Refrigerado

Com o armazenamento refrigerado pretende-se que o produto, depois de refrigerado e embalado, se mantenha frio a fim de manter a sua qualidade e segurança. A câmara encontra-se a uma temperatura de cerca de 4°C. Nesta câmara o produto final está pronto a ser expedido e distribuído ao consumidor.

Nesta etapa, o produto encontra-se paletizado e dentro de uma câmara frigorífica de refrigeração. As medidas de controlo nesta etapa serão a temperatura da câmara de frio, a humidade relativa, e o estado de higiene e desinfeção da mesma.

3.6.1.10 Expedição

Esta etapa é realizada a partir da câmara refrigerada para os camiões devidamente preparados para transportar produtos refrigerados. Os camiões entram no cais de expedição e carregam o produto cujas quantidades solicitadas já se encontram separadas e devidamente preparadas.

Para carregar as paletes, com o respetivo produto, até aos camiões devidamente equipados com câmaras refrigeradas é utilizado um empilhador. Na expedição, o controlo visual do produto final será a medida de controlo.

O transporte dos batidos de kefir é efetuado por camiões pertencentes aos clientes solicitadores deste produto, pelo que, a responsabilidade de assegurar a segurança do produto, a partir do momento em que este sai do cais de expedição, será deles.

3.7 Análise de Perigos e medidas preventivas

Nesta fase identificam-se os perigos físicos, químicos e biológicos em cada etapa do processo estabelecido no fluxograma, avalia-se a probabilidade de risco, a severidade

e as medidas a adotar, entre outros parâmetros que estão estabelecidos na tabela 3.10, abaixo indicada.

3.7.1 Perigos Biológicos

Os principais microrganismos a ter em conta em termos de contaminação alimentar, de uma forma geral, são a *Salmonella spp.* (associado a salmonelose), *Staphylococcus aureus* (associado a mastites), *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolítica* (Semih e Cagindi, 2003) e ainda *Micobacterium bovis* (associado a tuberculose (vacas)), *Listeria monocytogenes* (associado a listeriose), *Brucella* (associado a brucelose), Aflatoxinas, *Shigella disenteriae* e *Streptococcus* (Veiga, 2008).

Os perigos biológicos estão geralmente associados a más práticas de higiene e mau manuseamento dos produtos, assim como contaminação cruzada, principalmente pelos animais infetados (Domingues, 2008). A forma mais habitual e eficaz de eliminação é a pasteurização, destacando-se ainda o papel anti-microbiano do Kefir, nomeadamente relativamente à *Salmonella* e à *Escherichia coli* (Weschenfelder, 2009).

De forma, esquematizada, alguns dos microrganismos têm os seus limites de crescimento definidos de acordo com a Tabela 3.9 (Domingues, 2008).

Tabela 3.9 – Atividade da água, pH e temperatura de crescimento de alguns microrganismos (Domingues, 2008).

Microrganismo	Actividade da água mínima (a _w)	pH	Temperatura (°C)
<i>A. hydrophila</i>	0,970	7,2	- 0,1 – 42,0
<i>B. cereus</i>	0,930	4,3 – 9,3	4,0 – 52,0
<i>B. stearothermophilus</i>	-	5,2 – 9,2	28,0 – 72,0
<i>C. jejuni</i>	0,990	4,9 – 9,5	30,0 – 45,0
<i>C. perfringens</i>	0,945	5,0 – 9,0	10,0 – 52,0
<i>E. coli</i>	0,935	4,0 – 9,0	7,0 – 49,4
<i>Lactobacillus spp.</i>	0,930	3,8 – 7,2	5,0 – 45,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,920	4,4 – 9,4	- 0,4 – 45,0
<i>Salmonella spp.</i>	0,940	3,7 – 9,5	5,0 – 46,0
<i>Shigella spp.</i>	0,960	4,8 – 9,3	6,1 – 47,1
<i>S. aureus</i>	0,830	4,0 – 10,0	7,0 – 50,0
<i>V. cholerae</i>	0,970	5,0 – 10,0	10,0 – 43,0
<i>V. parahaemolyticus</i>	0,936	4,8 – 11,0	5,0 – 44,0
<i>V. vulnificus</i>	0,960	5,0 – 10,0	8,0 – 43,0
<i>Y. enterocolítica</i>	0,945	4,2 – 10,0	- 1,3 – 45,0

3.7.2 Perigos Químicos

A eventual presença de produtos fitossanitários é uma realidade que está bem presente em quase todos os processos produtivos e que requer especial atenção,

tornando-se fundamental a regulação da respetiva higienização do material usado ao longo do processo. A presença de Aflatoxinas, Pesticidas, Antibióticos (células somáticas que indiciam a presença de antibióticos e outros agentes patogénicos (Amaral et al, 2005)), Dioxinas, Policlorados (PCB's), e Metais Pesados (Cádmio=7mcg/Kg, Chumbo=25mcg/Kg, Mercúrio=5mcg/Kg, Arsénio, entre outros) requerem principal atenção. Alguns destes contaminantes têm origem a partir do solo e dos pastos, por consequência contaminados. Uma vez, estes contaminantes integrados na cadeia alimentar dos animais, é necessário tomar precauções para controlar o perigo que constituem para o consumidor até porque a maior parte destes compostos não é destruído pela pasteurização.

3.7.3 Perigos Físicos

A maior frequência de perigos físicos que se regista são a presença de vidros, metais, plásticos, papéis, mas também cabelos e pêlos, sendo que estes últimos acarretam menos perigos para a saúde pública. Os perigos físicos são eliminados por processos de filtração.

Análise de Perigos

Na tabela 3.10, encontram-se os perigos encontrados em cada etapa e as suas análises.

Tabela 3.10 – Identificação de Perigos e Medidas Preventivas.

Identificação de Perigos e Medidas Preventivas				TAB.001.12
Batido de Kefir com Frutos Vermelhos				Data:16/02/2012
Etapa	Matéria-prima	Tipo de Perigo	Descrição do Perigo	Medidas Preventivas
Receção de Materiais de Embalagem	Garrafas de vidro	PB1	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	BPH BPF Qualificação de fornecedores Boletim de análise
		PQ1	Compostos migratórios do vidro e detergentes, resultado de uma má lavagem das garrafas	BPH Qualificação de fornecedores
		PF1	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros soltos) Pragas mortas	BPH Qualificação de fornecedores Inspeção Visual
	Tampas	PB2	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	BPH BPF Qualificação de fornecedores Boletim de análise
		PQ2	Compostos migratórios do metal e detergentes, resultado de uma má lavagem das tampas	BPH Qualificação de fornecedores
		PF2	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	BPH Qualificação de fornecedores Inspeção Visual
Receção de matérias-primas	Leite pasteurizado	PB3	Presença de microrganismos patogénicos (<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria innocua</i>) devido a má pasteurização.[8544] Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	BPH BPF Qualificação de fornecedores Boletim de análise
		PQ3	Resíduos de desinfetantes e detergentes Resíduos de antibióticos [3115]	BPH Qualificação de fornecedores
		PF3	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	BPH Qualificação de fornecedores Inspeção Visual
	Grãos de Kefir	PB4	Contaminação por microrganismos de estirpes diferentes das que constituem os grãos de kefir	BPH BPF Qualificação de fornecedores
		PF4	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros)	BPH Qualificação de fornecedores

	Frutos vermelhos		Pragas mortas	Inspeção Visual
		PB5	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	BPH BPF Qualificação de fornecedores Boletim de análise
		PQ4	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH Qualificação de fornecedores
	Açúcar refinado	PF5	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	BPH Qualificação de fornecedores Inspeção Visual
		PB6	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34] Contaminação por <i>Salmonella</i> e bolores (mofo)	BPH BPF Qualificação de fornecedores Boletim de análise
		PQ5	Resíduos de detergentes e desinfetantes Resíduos de Ferro	BPH Qualificação de fornecedores
		PF6	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	BPH Qualificação de fornecedores Inspeção Visual
Inoculação com culturas de kefir		PB7	Desenvolvimento de microrganismos de estirpes diferentes das que constituem os grãos de kefir	BPH BPF Monitorização (controlo de Temperatura)
		PQ6	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH
		PF7	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros)	BPH BPF Inspeção Visual
Fermentação		PB8	Desenvolvimento de microrganismos de estirpes diferentes das que constituem os grãos de kefir	BPH BPF Monitorização (controlo de Temperatura)
		PQ7	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH
		PF8	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) Pragas mortas	BPH BPF Inspeção Visual Controlo de Pragas
Filtração do fermentado		PB9	Presença de microrganismos (do kefir e outros que se possam ter desenvolvido) no filtrado	BPF Monitorização (controlo de Temperatura)

		PQ8	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH
		PF9	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) Pragas mortas	BPH BPF Inspeção Visual Controlo de Pragas
Mistura		PB10	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34] Contaminação por microrganismos (do kefir e outros que se possam ter desenvolvido)	BPH BPF Monitorização (controlo de Temperatura)
		PQ9	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH
		PF10	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros)	BPH BPF Inspeção Visual
Embalamento e Rotulagem		PB11	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34] Contaminação por microrganismos (do kefir e outros que se possam ter desenvolvido)	BPH BPF Monitorização (controlo de Temperatura)
		PQ10	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH
		PF11	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros)	BPH BPF Inspeção Visual
Armazenamento Refrigerado		PB12	Proliferação da flora microbiana devido a oscilações de Temperatura	BPH BPF Boletim de análises Monitorização (controlo de Temperatura) Manutenção de equipamentos
		PQ11	Resíduos de detergentes e desinfetantes	BPH
		PF12	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) Pragas mortas	BPH BPF Inspeção Visual Controlo de Pragas
Expedição		PB13	Proliferação da flora microbiana devido a oscilações de Temperatura no cais	BPH BPF Boletim de análises Monitorização (controlo de Temperatura) Manutenção de equipamentos

Legenda:

PB – Perigo Biológico

PF – Perigo Físico

PQ – Perigo Químico

BPH – Boas Práticas de Higiene

BPF – Boas Práticas de Fabrico

Elaborado por: Marisa Mascarenhas.**Aprovado por:** Susana Bernardino.**Data:** 16/02/2012

3.8 Avaliação dos Perigos e Determinação de PCC's

Para a avaliação dos perigos e determinação dos PCCs foram utilizadas a matriz de risco e a árvore de decisão disponíveis no *Codex Alimentarius*, que se encontram nas figuras 2 e 3.

3.8.1 Matriz de Risco

Probabilidade	Alta (3)			
	Média (2)			
	Baixa (1)			
		Baixa (1)	Média (2)	Alta (3)
		Severidade		

Figura 3.2 - Mapa de severidade versus probabilidade de ocorrências - identificação de perigos identificativos (exemplo) (Codex Alimentarius, 2005).

Probabilidade de ocorrência:

- 1 – Baixa: pouco frequente;
- 2 – Média: pode acontecer;
- 3 – Alta: muito frequente.

Severidade das consequências para a saúde:

- 1 – Baixa: efeitos pouco graves/significativos;
- 2 – Média: efeitos graves;
- 3 – Alta: efeitos muito graves.

Zona cinzenta (≥ 4):

- O perigo contém um risco real e é necessário considerá-lo. Vai para a árvore de decisão.

Zona branca (< 4):

- O perigo não necessita de ser considerado, pelo menos por agora, e o risco pode ser eliminado. Não necessita de ir para a árvore de decisão.

3.8.2 Árvore de decisão:

DIAGRAMA DE PROCEDIMENTO PARA IDENTIFICAÇÃO DOS PONTOS CRÍTICOS DE CONTROLE

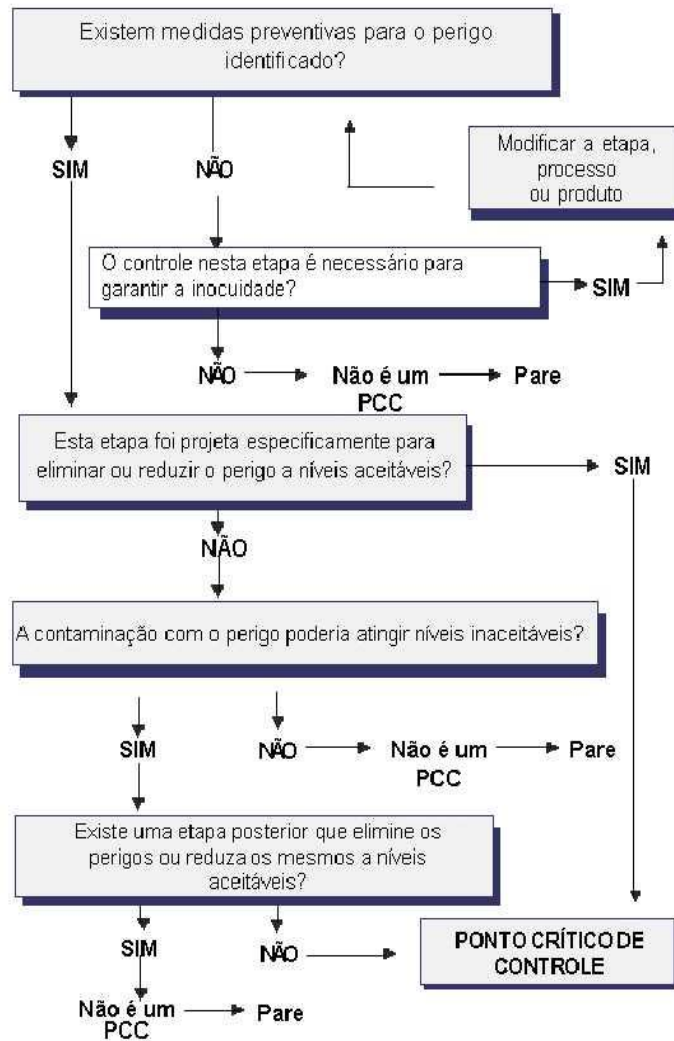


Figura 3.3 - Árvore de decisão (Codex Alimentarius, 2005)

Tabela 3.11 – Avaliação de Perigos e Determinação de PCC's.

Avaliação dos Perigos e Determinação de PCC's											TAB.002.12
Batido de Kefir com Frutos Vermelhos											Data:16/02/2012
Etapa	Tipo de Perigo	Dscrição do Perigo	Freq	Sev	Sig	Q1	Q2	Q3	Q4	PCC	Justificação
Receção de Materiais de Embalagem	PB1	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ1	Compostos migratórios do vidro e detergentes, resultado de uma má lavagem das garrafas	1	2	N	-	-	-	-	-	-
	PF1	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros soltos) Pragas mortas	2	3	S	S	N	N	-	-	-
	PB2	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ2	Compostos migratórios do metal e detergentes, resultado de uma má lavagem das tampas	1	2	N	-	-	-	-	-	-
	PF2	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	2	3	S	S	N	N	-	-	-
Receção de matérias-primas	PB3	Presença de microrganismos patogénicos (<i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Listeria innocua</i>) devido a má pasteurização.[8544] Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ3	Resíduos de desinfetantes e detergentes Resíduos de antibióticos [3115]	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF3	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PB4	Contaminação por microrganismos de estirpes diferentes das que constituem os grãos de kefir	1	3	S	S	N	S	S	-	-

	PF4	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PB5	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34]	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ4	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF5	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PB6	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34] Contaminação por <i>Salmonella</i> e bolores (mofo)	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ5	Resíduos de detergentes e desinfetantes Resíduos de Ferro	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF6	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, pedaços de cartão, vidros) Pragas mortas	1	3	S	S	N	N	-	-	-
Inoculação com culturas de kefir	PB7	Desenvolvimento de microrganismos de estirpes diferentes das que constituem os grãos de kefir	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ6	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF7	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros)	1	3	S	S	N	N	-	-	-
Fermentação	PB8	Desenvolvimento de microrganismos de estirpes diferentes das que constituem os grãos de kefir	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ7	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF8	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) Pragas mortas	1	3	S	S	N	N	-	-	-
Filtração do fermentado	PB9	Presença de microrganismos (do kefir e outros que se possam ter	1	3	S	S	N	S	S	-	-

		desenvolvido) no filtrado									
	PQ8	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF9	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) Pragas mortas	1	3	S	S	N	N	-	-	-
Mistura	PB10	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34] Contaminação por microrganismos (do kefir e outros que se possam ter desenvolvido)	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ9	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF10	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) (No final desta etapa existe um detetor de metais)	1	3	S	S	S	-	-	PCC1	O detetor de metais existente no final da mistura existe especificamente para controlar a ocorrência deste perigo.
Embalamento e Rotulagem	PB11	Contaminação por <i>Staphylococcus aureus</i> [34] Contaminação por microrganismos (do kefir e outros que se possam ter desenvolvido)	1	3	S	S	N	S	S	-	-
	PQ10	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF11	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros)	1	3	S	S	N	N	-	-	-
Armazenamento Refrigerado	PB12	Proliferação da flora microbiana devido a oscilações de Temperatura	1	3	S	S	N	S	N	PCC2	Esta etapa foi projetada para eliminar ou reduzir o perigo para níveis aceitáveis uma vez que existe para aumentar o período de vida útil do produto prevenindo e retardando o crescimento microbiano.
	PQ11	Resíduos de detergentes e desinfetantes	1	3	S	S	N	N	-	-	-
	PF12	Presença de corpos estranhos (pedras,	1	3	S	S	N	N	-	-	-

		poeiras, vidros) Pragas mortas									
Expedição	PB13	Proliferação da flora microbiana devido a oscilações de Temperatura no cais	1	3	S	S	N	N	-	-	-

Legenda:

Freg.- Frequência do perigo (na análise da matriz de risco)

Sev.- Severidade do perigo (na análise da matriz de risco)

Sig.-Significância do perigo (na análise da matriz de risco)

Q1- Pergunta nº 1 da árvore de decisão

Q2- Pergunta nº 2 da árvore de decisão

Q3- Pergunta nº 3 da árvore de decisão

Q4- Pergunta nº 4 da árvore de decisão

PCC- ponto crítico de controlo

Elaborado por: Marisa Mascarenhas.

Aprovado por: Susana Bernardino.

Data: 16/02/2012

* **PCC (Ponto Crítico de Controlo)** - etapa na qual pode ser aplicada uma medida de controlo e é essencial para prevenir ou eliminar um perigo para a segurança alimentar ou reduzi-lo para um nível aceitável [7].

Tabela 3.12 – Plano HACCP.

Plano HACCP										TAB.003.12
Batido de Kefir com Frutos Vermelhos										Data:16/02/2012
Etapa	Perigo	PCC	Parâmetro de Controlo	Limite Crítico	Monitorização			Ações Corretivas		Registo
					Método	Frequência	Responsável	Método	Responsável	
Mistura	Presença de corpos estranhos (pedras, poeiras, vidros) (No final desta etapa existe um detetor de metais)	PCC1 (PF10)	Detetor de Metais Inspeção visual	Ausência em cada produto	Inspeção visual; Manutenção, inspeção e confirmação do funcionamento do detetor de metais	Inspeção visual: diariamente; Manutenção do detetor de metais: semanal; Confirmação do funcionamento do detetor: de 30 em 30 minutos	Chefe de produção	Retirada de corpo estranho (metal); caso seja em grandes quantidades, eliminar o produto	Chefe de produção	Check-list diário de inspeção visual e da confirmação do funcionamento e registo mensal no plano de manutenção
Armazenamento Refrigerado	Proliferação da flora microbiana devido a oscilações de Temperatura	PCC2 (PB12)	Temperatura e tempo do armazenamento congelado; Higienização e respetivos procedimentos.	50 ufc/g - 500 ufc/g [36]	Medição da temperatura da câmara; Análises microbiológicas a produto	Medição da temperatura da câmara: diariamente; Análises microbiológicas: mensalmente	Líder da Equipa de Segurança Alimentar	Melhoria da higiene na produção; Prevenção da recontaminação; Seleção de matérias Primas [36]	Líder da Equipa de Segurança Alimentar	Registo de temperaturas; Boletim de análise

39

Elaborado por: Marisa Mascarenhas.

Aprovado por: Susana Bernardino.

Data: 16/02/2012

3.9 Fluxograma com PCC's

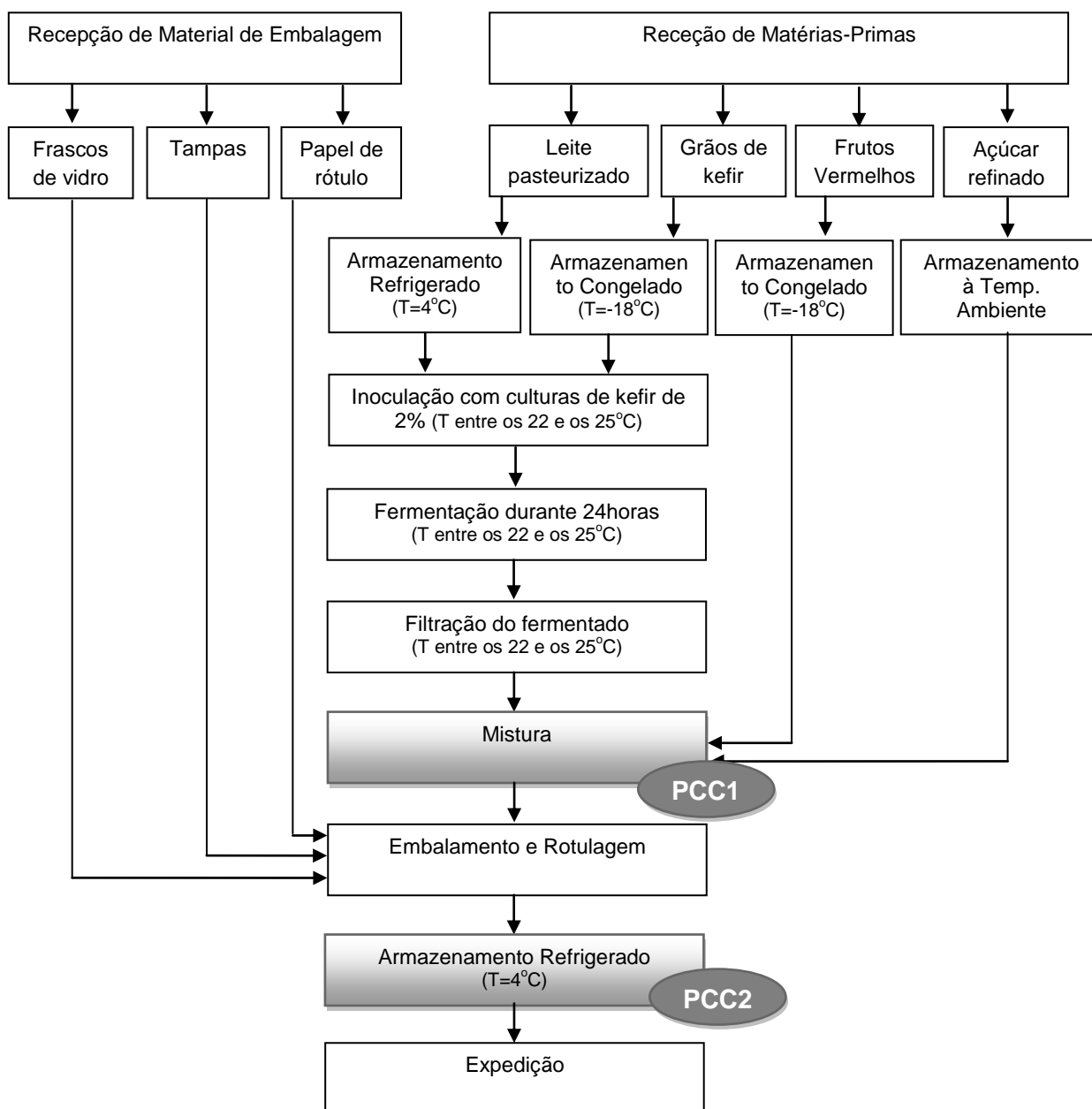


Figura 3.4 – Fluxograma com PCC's do processo de produção do batido de kefir com frutos vermelhos.

3.10 Sistema de Rastreabilidade

Segundo a Norma NP EN ISO 22000, a organização deve estabelecer e aplicar um sistema de rastreabilidade que permita a identificação dos lotes de produto e a sua relação com os lotes de matérias-primas e os registos de processamento e entrega (NP EN ISO 22000:2005).

O sistema de rastreabilidade deve permitir identificar os materiais recebidos dos fornecedores diretos, assim como a rota inicial de distribuição do produto acabado (NP EN ISO 22000:2005).

Os registos de rastreabilidade devem ser mantidos, durante um período definido, para a avaliação do sistema, para permitir o tratamento de produtos potencialmente não seguros e na eventualidade de um procedimento de retirada. Os registos devem estar de acordo com os requisitos estatutários e regulamentares e com os requisitos do cliente e podem, por exemplo, ser baseados na identificação do lote de produto acabado (NP EN ISO 22000:2005).

Um sistema de rastreabilidade é uma ferramenta de gestão de risco para ser usada na resolução de um problema de segurança alimentar, não sendo por si só uma medida de segurança alimentar. Define-se como um procedimento que permite seguir e localizar os produtos, desde a sua produção ao longo da cadeia de comercialização, mediante o registo, identificação e transmissão de informação.

No domínio da rastreabilidade podemos encontrar, entre outros, os seguintes conceitos:

3.10.1 Rastreabilidade a Montante

A capacidade detida pela empresa de conhecer a origem do produto em qualquer ponto do seu processo de produção, manipulação, transformação e expedição. Este tipo de rastreabilidade realizada através do lote, data de durabilidade ou qualquer outra forma de identificação do produto destina-se a detetar o que aconteceu antes de um operador económico se tornar responsável por um produto. A rastreabilidade a montante permitirá, a partir de um produto intermédio ou final, obter de forma ágil a informação relevante associada ao dito produto, até chegar à origem das matérias-primas através da ficha de receção com o peso, o lote e a data de chegada das matérias-primas (Ministério da Agricultura)

3.10.2 Rastreabilidade a Jusante

A capacidade de conhecer o destino de um produto. Este tipo de rastreabilidade identifica-se nos procedimentos e nas ferramentas utilizadas para detetar o que

aconteceu depois da transferência dos produtos do operador para um terceiro, permitindo saber a quem foi distribuído cada produto. Para o efeito, deve ter-se em conta: o nome, direção dos clientes, as mercadorias distribuídas e a data da sua saída do estabelecimento, ou seja, a ficha de controlo de expedição (Ministério da Agricultura).

3.10.3 Rastreabilidade do produto

Designa a sequência nas várias fases do produto e destina-se a pesquisar as causas de um problema de segurança, a montante se o incidente ocorreu com os fornecedores e a jusante se o incidente ocorrer após a produção. Permite localizar os produtos, determinando os destinos e as origens, podendo proceder ao seu bloqueio ou retirada e recolha caso seja necessário (Ministério da Agricultura).

Quando procedam às operações de bloqueio/retirada e de recolha de géneros alimentícios os operadores do sector alimentar devem transmitir, aos outros operadores e às autoridades competentes, as seguintes informações (Tabela 13):

Tabela 3.13 - Informação que operadores e autoridades devem possuir (Ministério da Agricultura).

Informação	Outros Operadores	Autoridades
Nome e morada da empresa	X	X
Nome do produto (denominação de venda e marca comercial)	X	X
Origem	X	X
Nome e morada do(s) fornecedor(es)	-	X
Nome e morada do(s) cliente(s)	-	X
Detalhes do produto (ex: identificação de lote ou data de durabilidade ou outro código)	X	X
Razões do bloqueio/recolha	X	X
Atuação pretendida	X	-
Ação realizada	-	X
Responsável pela ordem	X	X
Data	X	X
Dados para contacto (telemóvel, telefone e e-mail)	X	X
Dados alternativos de contacto (telemóvel, telefone e e-mail)	X	X

3.10.4 Rastreabilidade interna

Permite vincular os produtos que entram numa empresa aos que saem. É necessário ter em conta as divisões, troca ou misturas de lotes ou agrupamentos, assim como o número de pontos nos quais é necessário estabelecer registos ou ligações com o sistema de autocontrolo já estabelecido (Ministério da Agricultura).

4. Metodologia

4.1 Preparação das amostras

As amostras de kefir (12h, 24h, 48, e 72h) foram preparadas, em triplicado, da seguinte forma: em doze frascos de vidro foram colocados 100 mililitros de leite meio-gordo (Grosso) e 2 gramas de grãos de kefir (anexo 8.1.1, figura 8.1.1). Os grãos de kefir foram incubados à temperatura ambiente e foi realizada uma monitorização da temperatura, esta situou-se num intervalo de 18-25°C (anexo 8.1.1, figura 8.1.2). Após 12 horas de fermentação, retiraram-se, de três frascos, os grãos de kefir e filtrou-se o fermentado resultante. As três primeiras amostras (K12h) foram congeladas. Repetiu-se o mesmo procedimento para as amostras de leite fermentado com 24, 48 e 72 horas de fermentação.

O leite analisado, meio-gordo, foi comprado (Grosso) bem como o iogurte líquido, natural açucarado (Continente).

Para todas as amostras foram realizadas, em triplicado, as seguintes análises químicas: determinação do pH, determinação da acidez, determinação da matéria-gorda, determinação das proteínas, determinação da lactose, determinação dos açúcares totais, determinação das cinzas e determinação dos ácidos gordos. Esta última determinação (ácidos gordos), foi realizada a amostras diferentes, ou seja, foram apenas analisados o leite, o iogurte, o kefir de 24h (após filtração e depois de uma semana no frigorífico) e ainda o kefir de 24h com frutos vermelhos (Adélie) (após filtração e colocação dos frutos e também depois de uma semana no frigorífico).

4.2 Determinação do pH

Esta determinação foi realizada utilizando um potenciómetro (Crison, pH-meter basic 20) e foram retiradas três leituras de cada amostra de modo a obter resultados mais coerentes (anexo 8.1.2, figura 8.1.3).

4.3 Determinação da Acidez

Esta análise foi realizada de acordo com a Norma Portuguesa 470 de 1983 que se destina a leites e leites compostos. Segundo esta norma (que se encontra em anexo,

anexo 8.2) entende-se por acidez do leite o volume de solução alcalina normal, expresso em mililitros (ml), necessário para neutralizar 1 litro de leite. No processo realizado ocorre uma neutralização dos ácidos livres contidos no leite, pro solução alcalina titulada.

Na determinação da acidez mediu-se com uma pipeta de precisão 10 ml de leite, iogurte, ou kefir (de 12, 24, 48 ou 72 horas) adicionaram-se seis gotas da solução alcoólica de fenolftaleína (Panreac) e titulou-se com solução de hidróxido de sódio 0,1 N (Panreac), contida na bureta de precisão até viragem do indicador. A acidez do leite, expressa em mL de solução alcalina normal por L, é:

$$\text{Acidez (mL/L)} = 10 \times V$$

V – Volume da solução de hidróxido de sódio 0,1 N, gasto na titulação (mL).

4.4 Determinação do teor de matéria gorda

Esta determinação foi baseada na Norma Portuguesa 468 de 1990 (anexo 8.3), processo de referência para determinar o teor de matéria gorda em leite gordo, meio gordo e magro e leites compostos. Segundo a mesma, entende-se por matéria gorda o conjunto das substâncias extraídas por solventes orgânicos e determinadas, neste caso, segundo a técnica Röse-Gottlieb. Este processo, de forma resumida, trata-se da extração da matéria gorda por solventes apropriados, evaporação dos solventes e pesagem do resíduo obtido.

Numa ampola de decantação, introduziu-se 10 ml da amostra (leite, iogurte, kefir de 12, 24, 48 ou 72 horas), rigorosamente pesados. Adicionou-se 2 ml de amónia a 25% (Panreac), agitou-se durante 30 segundos, juntou-se 10 ml de álcool a 95 % (Panreac) e agitou-se novamente. Adicionou-se 25 ml de éter dietílico (Panreac), rolhou-se e agitou-se energeticamente durante 30 segundos. De seguida colocou-se 25 ml de éter de petróleo (Panreac) e procedeu-se como anteriormente. Deixou-se a ampola de decantação em repouso durante 30 minutos. Após o tempo de repouso, decantou-se a camada etérea para um balão de 250 ml tarado, previamente seco a 100-105°C. Procedeu-se a mais duas extrações da fase aquosa nas mesmas condições, recolhendo as fases etéreas no mesmo balão. De seguida evaporou-se o éter num evaporador rotativo (Fisatom). Por fim, secou-se o balão em estufa (Binder) (anexo 8.1.3, figura 8.1.4) a uma temperatura entre 100 e 105°C durante cerca de 24 horas, arrefeceu-se em exsiccador (anexo 8.1.3, figura 8.1.5) e registou-se o peso obtido. O teor de matéria gorda

é obtido através da subtração entre o peso inicial do balão e o peso final, a dividir pela massa de amostra pesada inicialmente.

4.5 Determinação do Teor de Proteína Bruta

A Norma utilizada para a determinação em causa foi Norma Portuguesa 1986 de 1992 segundo a qual entende-se por teor de proteína bruta o resultado que se obtém multiplicando pelo fator 6,38 o teor de azoto, doseado segundo a técnica de Kjeldahl. Esta encontra-se no anexo 8.4.

O procedimento seguido foi o seguinte, resumidamente: pesou-se aproximadamente 2 gramas de amostra e, num tubo de digestão, colocou-se a toma da amostra, duas pastilhas de catalisador (selénio e cobre) e 25 ml de ácido sulfúrico concentrado, 95 a 97% (Sigma). Preparou-se dois tubos para o ensaio em branco (apenas com as 2 pastilhas e os 25 ml de ácido sulfúrico). Programou-se o digestor (Foss, Digestor 2006) para 220°C e em seguida colocaram-se os tubos no digestor e ligou-se a torneira da água. Passados 30 minutos programou-se o digestor para 400°C e após 90 minutos desligou-se o digestor e deixou-se a torneira da água aberta até ao arrefecimento dos tubos (cerca de 60 minutos). Ligou-se o destilador (Foss, Kjeltex TM 2100) que se encontra no anexo 8.1.4, figura 8.1.6, e após o seu aquecimento, adicionou-se, a cada tubo 80 ml de água destilada. De seguida colocou-se os tubos no destilador e carregou-se no botão para se adicionar 10 mL de NaOH a 40%. No Erlenmeyer colocou-se 30 ml de solução de ácido bórico a 4% com indicador (Panreac). Após a destilação realizou-se uma titulação com uma solução de ácido clorídrico (HCL) 0,1M (Panreac) como titulante. O ponto de viragem foi atingido quando a solução verde mudou para azul acinzentado. O teor de proteína bruta é dado pela seguinte fórmula:

$$\text{Proteína (\%)} = \frac{0,14 \times (V_1 - V_0)}{m} \times 6,38$$

Onde:

V₁ – Volume da solução de HCL 0,1M gasto na titulação do ensaio com a amostra (ml);

V₀ – Volume da solução de HCL 0,1M gasto na titulação do ensaio em branco (ml);

m – massa da toma da amostra (g).

4.6 Determinação do Teor de Lactose

De acordo com a Norma Portuguesa 675 de 1986, anexo 8.5, utilizada nesta determinação, entende-se por teor de lactose de um leite ou derivado, a massa, expressa em percentagem, das substâncias doseadas segundo o método descrito nesta norma.

De uma forma resumida, mediu-se 25 ml de amostra e pesou-se rigorosamente. Colocou-se num balão volumétrico de 250 ml e adicionou-se 2,5ml de solução de ferrocianeto de potássio a 15% (Labsolve) e 2,5 ml de solução de sulfato de zinco a 30% (Merck). Perfez-se o volume com água destilada, agitou-se e filtrou-se. Mediu-se, para um gobelé de 400 ml, 25 ml de solução de sulfato de cobre a 7% (Panreac), 25 ml de solução alcalina tartárica (Panreac) e 50 ml do filtrado obtido anteriormente. Colocou-se o gobelé com um vidro de relógio sobre uma placa de aquecimento (Velp), anexo 8.1.5, figura 8.1.8, e aqueceu-se de modo a que o líquido entrasse em ebulição decorridos 4 minutos e manteve-se durante 2 minutos. Terminada a ebulição, deixou-se repousar o precipitado e filtrou-se o líquido ainda quente, com o auxílio de uma bomba de vácuo e frasco de kitassato, através do cadinho de fundo filtrante, G4 (porosidade de 5 a 15 mm) previamente pesado. Lavou-se o gobelé e o precipitado com água aquecida a 60°C, em seguida com 10 ml de álcool a 95% (Panreac) e 10 ml de éter dietílico (Panreac). Secaram-se os cadinhos filtrantes em estufa a 102°C, durante 30 minutos, arrefeceu-se em exsicador e pesou-se. Para o cálculo do teor de lactose, expresso em percentagem, em lactose hidratada, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Lactose (\%)} = 50 \times \frac{m_1}{V \times m}$$

Onde:

m_1 – massa de lactose, que no quadro que se encontra no anexo 8.5, corresponde à massa de óxido cuproso obtido na determinação (mg);

m – massa da toma da amostra (g);

V – Volume do filtrado medido para a determinação (ml).

4.7 Determinação do Teor de Açúcares Totais

Para esta determinação foi utilizada a Norma Portuguesa 704 de 1994 segundo a qual, açúcares totais são o total de açúcares redutores (monossacáridos, alguns dissacáridos e trissacáridos, com grupos aldeídos ou cetónicos ativos que lhes dão poder redutor), expresso em açúcar invertido, após hidrólise nas condições descritas na norma, anexo 8.6.

O procedimento seguido, concisamente, foi o seguinte: pesou-se 20 g de amostra, colocou-se num balão volumétrico de 200 ml e adicionou-se 12,5 ml de solução de Carrez I (10,6 g de ferrocianeto de potássio (Labsolve) em 100 ml de água destilada) e 12,5 ml de solução de Carrez II (21,9 g de acetato de zinco (Merck) e 3 ml de ácido acético glacial (Scharlau) em 100 ml de água destilada). Perfez-se o volume com água destilada, agitou-se e filtrou-se. Para um balão de 100 ml mediu-se 50 ml do filtrado obtido e 3,5 ml de ácido clorídrico a 37% (Panreac). Agitou-se e colocou-se em banho (anexo 8.1.6, figura 8.9) (Julabo) a 70°C durante 5 minutos. De seguida arrefeceu-se e neutralizou-se com solução aquosa de hidróxido de sódio a 30% (Panreac) em presença de fenolftaleína (Panreac) (anexo 8.1.6, figura 8.1.10). Adicionou-se ácido clorídrico diluído (1+9) (Panreac) até o meio estar ligeiramente acidificado, agitou-se e perfez-se o volume. Mediu-se, para um gobelé de 400 ml, 25 ml de solução de sulfato de cobre a 7% (Panreac), 25 ml de solução alcalina tartárica (Panreac) e 50 ml do filtrado obtido anteriormente. Colocou-se o gobelé com um vidro de relógio sobre uma placa de aquecimento (Velp Scientific) e aqueceu-se de modo a que o líquido entrasse em ebulição decorridos 4 minutos e manteve-se durante 2 minutos. Terminada a ebulição, deixou-se repousar o precipitado e filtrou-se o líquido ainda quente, com o auxílio de uma bomba de vácuo e frasco de kitassato, através do cadinho de fundo filtrante previamente pesado. Lavou-se o gobelé e o precipitado com água aquecida a 60°C, em seguida com 10 ml de álcool a 95% (Panreac) e 10 ml de éter dietílico (Panreac). Secaram-se os cadinhos filtrantes (G4) em estufa a 102°C, durante 30 minutos, arrefeceu-se em exsiccador e pesou-se. Para o cálculo do teor de açúcares totais, expresso em percentagem, em lactose hidratada, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Açúcares (\%)} = 40 \times \frac{m_i}{V \times m}$$

Totais

Onde:

m_i – massa de açúcar invertido, que no quadro que se encontra no anexo 8.6, corresponde à massa m_1 , em miligramas de óxido cuproso obtido na determinação (mg);

m – massa da toma da amostra (g);

V – Volume do filtrado medido após defecação e inversão(ml).

4.8 Determinação da Cinza Total

A cinza total foi determinada de acordo com a Norma Portuguesa 477 de 1983, que se encontra no anexo 8.7, sendo que a cinza total trata-se do resíduo mineral obtido por incineração segundo o processo em baixo resumido.

Mediu-se e pesou-se 25 ml de amostra para um cadinho, previamente seco e pesado, adicionou-se algumas gotas de ácido acético glacial a 99,8% (Scharlau) e evaporou-se no banho (Julabo), apresentado no anexo 8.1.6, figura 8.1.9, até à secura. Carbonizou-se, lentamente, o resíduo à chama, apresentada no anexo 8.1.7, figura 8.1.11, e calcinou-se na mufla (Nabertherm) a uma temperatura de 450°C durante 5 horas. Deixou-se arrefecer em exsiccador e pesou-se. Para a obtenção da cinza total realizou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{m_3 - m_2}{m_1} \times 100$$

Onde:

m_3 – massa final (cadinho + amostra calcinada);

m_2 - massa cadinho inicial;

m_1 – massa da toma da amostra.

4.9 Determinação dos Ácidos Gordos

Para a realização deste processo começou-se por realizar uma extração da matéria gorda. Foi utilizado o procedimento descrito em 4.4, anexo 8.3 para a determinação do teor de matéria gorda.

Depois do processo de extração da matéria gorda realizou-se uma metilação, cujo procedimento seguido teve como referência Lepage and Roy (1986) e Cohen *et al* (1988). Após evaporação adicionou-se 5 ml de uma mistura de cloreto de acetilo:metanol (1:19) (Acros Organics e Fisher Scientific) e agitou-se energicamente. Colocou-se o líquido resultante em tubos de ensaio que foram de seguida colocados em banho-maria a 80°C durante 1 hora, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Adicionou-se 1 ml de água mili-Q e 2 ml de n-heptano (Scharlau) e agitou-se durante 1 minuto no vortex (Velp Scientific). Centrifugou-se (anexo 8.1.8, figura 8.1.12) (Eppendorf) durante 5 minutos a 1500g, recolheu-se a fase orgânica e colocou-se no Cromatógrafo Gasoso Capilar (Finnigan TRACE GC Ultra), equipado com injetor automático AS 3000 (Thermo Electron Corporation) e munido de uma coluna Trace TR- FAME com 30m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de filme, anexo 8.1.8, figura 8.13, para obtenção dos cromatogramas. As temperaturas do injetor e do detetor mantiveram-se nos 250°C e 260°C, respetivamente. Utilizou-se o hélio como gás de arraste a um caudal de 1,5 mL/min. O ar e o hidrogénio foram fornecidos ao detetor a caudais de 350 mL/min e 35 mL/min, respetivamente. Para a análise das amostras o programa das temperaturas foi ajustado da seguinte forma: 60°C durante 1 min; aumento de temperatura até 150°C a

15°C/min; manutenção 150°C por 1 min; aumento para 220°C a uma taxa de 5°C/ min; e um patamar final a 220°C durante 20 min.

4.10 Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada através de duas provas, afetiva e de aceitação. No primeiro caso, a prova foi realizada com 10 provadores e foi-lhes pedido que provassem duas amostras codificadas, uma tratava-se de um iogurte com frutos vermelhos comercial (Continente) e a outra amostra tratava-se de um batido de kefir com frutos vermelhos. O batido foi preparado da seguinte forma: colocou-se num liquidificador (Moulinex) 300 ml de kefir (filtrado resultante) e juntou-se 25 g de frutos vermelhos congelados (Adélie) e 25g de açúcar (sidul) (anexo 8.1.9, figuras 8.1.14, 8.1.15, 8.1.16) .

Na preparação da prova afetiva, colocou-se em tabuleiros, um por provador, dois copos contendo as amostras codificadas, duas colheres, um copo com água, uma bolacha e um guardanapo (anexo 8.1.9, figura 8.1.17), acompanhou-se os provadoras até às cabines de prova individuais e entregaram-se os tabuleiros e uma folha de prova para preencherem. Na folha de prova (anexo 8.8) encontravam-se os códigos das amostras e era pedido que os provadores escolhessem a amostra mais agradável relativamente a vários parâmetros, nomeadamente cor, aparência e odor (antes da degustação), doce, ácido e textura na boca (durante a degustação) e flavour residual /persistência de sabor (após a degustação). Por fim pediu-se que, em termos globais, escolhessem a amostra preferida.

A prova de aceitação foi realizada apenas com uma amostra, simplesmente foi provado o batido de kefir com frutos vermelhos, preparado da mesma forma que na prova descrita anteriormente, no entanto foi realizada com 51 provadores. Foram escolhidos provadores de ambos os sexos e com idades compreendidas entre os 18 e os 60 anos. Os tabuleiros distribuídos continham apenas um copo com amostra, uma colher, um copo com água, uma bolacha e um guardanapo. Na folha de prova (anexo 8.9) apresentada aos provadores foi-lhes pedido que provassem a amostra fornecida e que, numa escala de 1 a 5 (em que 1 correspondia a “nada agradável” e 5 correspondia a “extremamente agradável”), a caracterizassem de acordo com cinco parâmetros, particularmente o odor, a cor, textura, sabor e flavour residual/ persistência de sabor. No final, colocou-se uma questão, caso o produto existisse no mercado, se o provador o compraria.

5. Discussão de Resultados

Os resultados obtidos nas diferentes análises químicas realizadas encontram-se discriminados na tabela 5.1 em baixo apresentada.

Tabela 5.1 - Resultados obtidos nas diferentes análises químicas, onde K1, K2 e K3 corresponde às três repetições para cada amostra, Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h e Kefir72h correspondem às médias das três repetições e, por fim, DP corresponde ao desvio padrão associado a cada média.

T (h)	Amostra	Parâmetros Analisados						
		pH	Acidez (mL/L)	Gordura (%)	Proteína (%)	Lactose	Açúcares Totais	Cinzas
12	K1	5,74	105	2,41	3,48	4,38	2,88	0,43
	K2	6,03	81	2,01	3,47	4,36	2,87	0,82
	K3	5,82	96	2,54	3,39	4,40	2,89	0,16
	Kefir12h	5,86	94	2,32	3,45	4,38	2,88	0,47
	DP	0,15	12,12	0,28	0,05	0,02	0,01	0,33
24	K1	4,60	243	1,82	3,37	3,90	2,46	0,89
	K2	4,58	261	1,58	3,65	3,93	2,42	0,86
	K3	4,63	247,5	1,6	3,66	3,88	2,41	0,82
	Kefir24h	4,60	250	1,67	3,56	3,90	2,43	0,86
	DP	0,03	9,37	0,13	0,16	0,03	0,03	0,04
48	K1	4,22	300	1,86	3,86	3,57	1,98	0,93
	K2	4,30	309	1,8	3,46	3,59	1,95	0,93
	K3	4,29	324	1,82	3,59	3,56	1,99	0,21
	Kefir48h	4,27	311	1,83	3,64	3,57	1,97	0,69
	DP	0,04	12,12	0,03	0,20	0,02	0,02	0,42
72	K1	4,28	352,5	1,78	3,66	3,42	1,73	1,34
	K2	4,18	361,5	1,76	3,53	3,43	1,7	1,1
	K3	4,03	372	1,8	3,54	3,45	1,74	1,26
	Kefir72h	4,16	362	1,78	3,58	3,43	1,72	1,23
	DP	0,13	9,76	0,02	0,07	0,02	0,02	0,12
Leite	L1	6,62	17	2,45	3,24	4,86	3,07	0,53
	L2	6,62	17,5	2,83	3,25	4,83	3,1	0,52
	L3	6,62	17	2,89	3,22	4,81	3,09	0,54
	Leite	6,62	17,2	2,72	3,24	4,83	3,09	0,53
	DP	0	0,29	0,24	0,02	0,03	0,02	0,01
Iogurte	I1	4,21	270	2,48	2,37	4,08	10,62	1,06
	I2	4,23	273	2,44	2,29	4,06	10,58	1,08
	I3	4,24	265,5	2,4	2,39	4,05	10,61	1,07
	Iogurte	4,23	269,5	2,44	2,35	4,06	10,6	1,07
	DP	0,02	3,78	0,04	0,05	0,02	0,02	0,01

Com o objetivo de averiguar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado), para os parâmetros em análise (pH, Acidez (mL/L), Gordura (%), Proteína (%), Lactose (%), Açúcares Totais (%) e Cinzas (%)) foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) (anexo 8.10, tabela 8.10.4) ou o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (anexo 8.10, tabela 8.10.2), dependendo da violação ou não dos pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias (anexo 8.10, tabela 8.10.1). Sempre que os resultados foram estatisticamente significativos, as respectivas comparações múltiplas foram realizadas (proporcionando a comparação, em média, de cada amostra contra todas as outras) (Zar, 2010). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados através do software IBM SPSS Statistics 19.0. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de significância (α) de 0,05.

5.1. Determinação do pH

Quando comparadas as 6 amostras, os resultados indicaram a existência de diferenças estatisticamente significativas (Teste de Kruskal-Wallis, $\chi^2_{(5)} = 15,47$, p value < 0.05). Mais concretamente (anexo 8.10, tabela 8.10.3), conclui-se que apenas não são detetadas diferenças quando comparadas as amostras de Kefir72h com Kefir24h, com Kefir48h e com iogurte líquido natural açucarado, assim como, quando comparadas as amostras de Kefir48h com iogurte líquido natural açucarado.

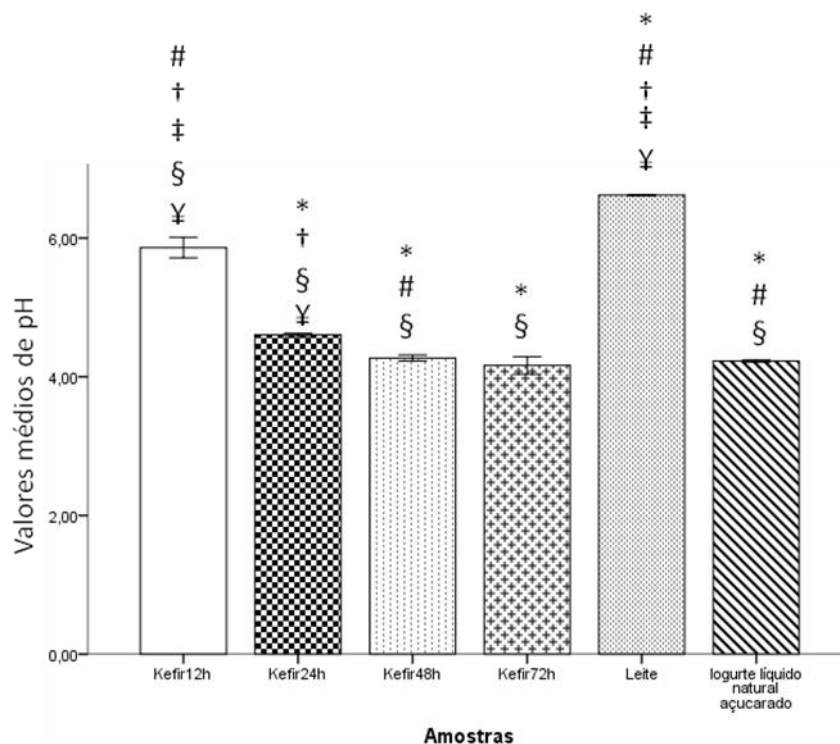


Figura 5.1 - Comparação dos valores médios de pH, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Adicionalmente é ainda possível concluir que o Kefir12h apresentou um valor médio de pH de 5,86, superior ao Kefir24h (4,60), ao Kefir48h (4,27), ao Kefir72h (4,16) e ao iogurte comercial (4,23). O pH do Kefir12h apenas se revelou inferior ao pH do leite (6,62). Relativamente ao Kefir24h, o pH apresentou-se inferior ao do leite, e superior ao do Kefir48h, assim como ao do iogurte. O Kefir48h revelou-se inferior às amostras Kefir12h, Kefir24h e leite. No caso do Kefir72h, o valor de pH foi mais baixo quando comparado com as amostras de Kefir12h e de leite. Para o leite, os valores referentes ao pH evidenciaram-se superiores quando comparados com as restantes amostras. Por fim, entre o iogurte comercial, o Kefir12h, o Kefir24h e o leite, o iogurte é o que apresenta valor de pH inferior.

Em termos gerais, verificou-se que existe uma diminuição de pH acentuada entre as 12 e as 24 horas de fermentação, de 5,86 passou para 4,60, não sendo significativa passadas 48 ou 72 horas (4,27 e 4,16, respetivamente). Esta diminuição do pH deve-se ao facto das bactérias, ácido-lácticas por exemplo, degradarem a lactose e produzirem ácido láctico, como já foi referido anteriormente. O pH do Kefir24h revelou-se mais

próximo do pH do iogurte (4,23) do que do pH do leite (6,62), o que seria de esperar, dado que, sendo um leite fermentado, apresenta características mais aproximadas ao iogurte. O leite apresentou o pH mais neutro.

Nas três repetições da determinação do pH para cada amostra de kefir, tabela 5.1, alguns valores mostraram-se algo discrepantes. Isto pode dever-se ao facto de os inóculos não serem exatamente iguais, o que implica nas características finais do kefir.

5.2. Determinação da Acidez

De acordo com o teste da homogeneidade de variâncias (anexo 8.10, tabela 8.10.1) verificou-se que, através do p value obtido, 0,176 ($> 0,05$), o pressuposto da homogeneidade de variâncias foi cumprido, e por isso realizou-se uma interpretação através do Teste ANOVA (anexo 8.10, tabela 8.10.4).

Com este teste, denotou-se que, mais uma vez, quando comparadas as 6 amostras, existiram diferenças estatisticamente significativas, uma vez que o p value foi de 0,000 ($< 0,05$). Com isto, realizou-se, novamente o teste de comparações múltiplas, Teste Post Hoc (anexo 8.10, tabela 8.10.5).

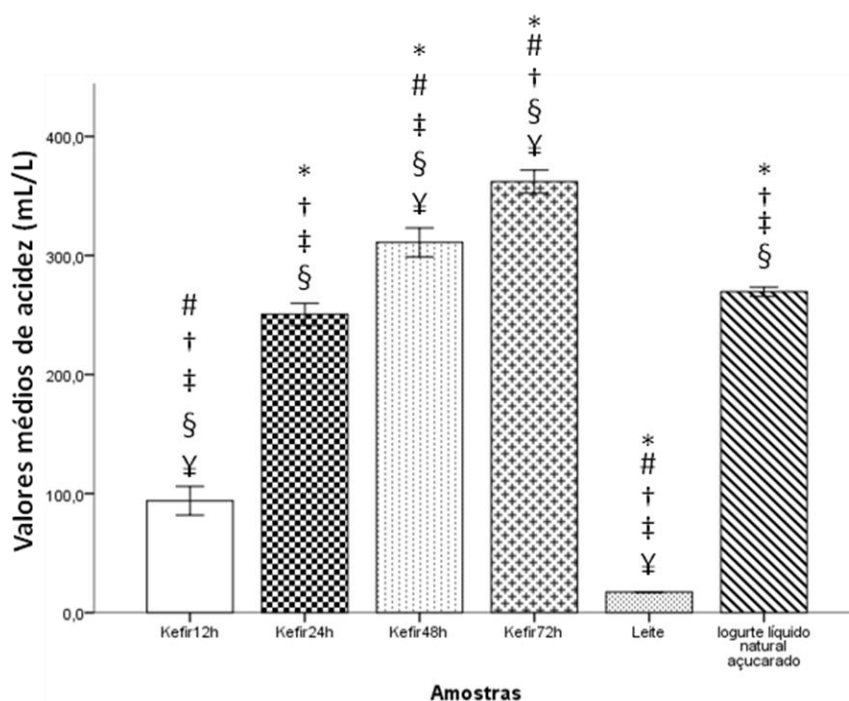


Figura 5.2 - Comparação dos valores médios de acidez, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Pela análise da figura acima apresentada, figura 5.2, verificou-se que existiram diferenças estatisticamente significativas entre o Kefir12h, o Kefir48h, o Kefir72h e o leite. Não foram detetadas diferenças estatisticamente significativas entre o Kefir24h e o iogurte.

Pelos resultados obtidos, é possível afirmar que a acidez aumentou ao longo da fermentação, facto este, que prova que as bactérias e as leveduras, presentes nos grãos de kefir, realizaram uma fermentação gradual ao longo do tempo, sendo apenas um pouco mais acentuada entre as 12 e as 24 horas de fermentação, 94 mL/L e 250,5 mL/L, respetivamente. O leite foi a amostra que apresentou acidez mais reduzida, apenas 17,17 mL/L. Este resultado é aceite dadas as características químicas e organoléticas do leite. Das 4 amostras de kefir, a que apresentou valor de acidez mais aproximado ao do iogurte (269,5 mL/L) foi o Kefir24h (250 mL/L). No caso do Kefir48h e do Kefir72h, os valores de acidez obtidos, 311 e 362 mL/L, foram bastante elevados, o que afetou o sabor e o odor, tornando-os desagradáveis.

5.3 Determinação do teor de matéria gorda

A análise estatística do teor de matéria gorda foi realizada da mesma forma que na determinação do pH. Neste caso também não foi cumprido o pressuposto da homogeneidade de variâncias, anexo 8.10, tabela 8.10.1), pelo que se realizou uma interpretação através do Teste Kruskal-wallis (anexo 8.10, tabela 8.10.2). De seguida, foi realizado o Teste Post Hoc, de acordo com os mesmos parâmetros, em cima descritos (anexo 8.10, tabela 8.10.3).

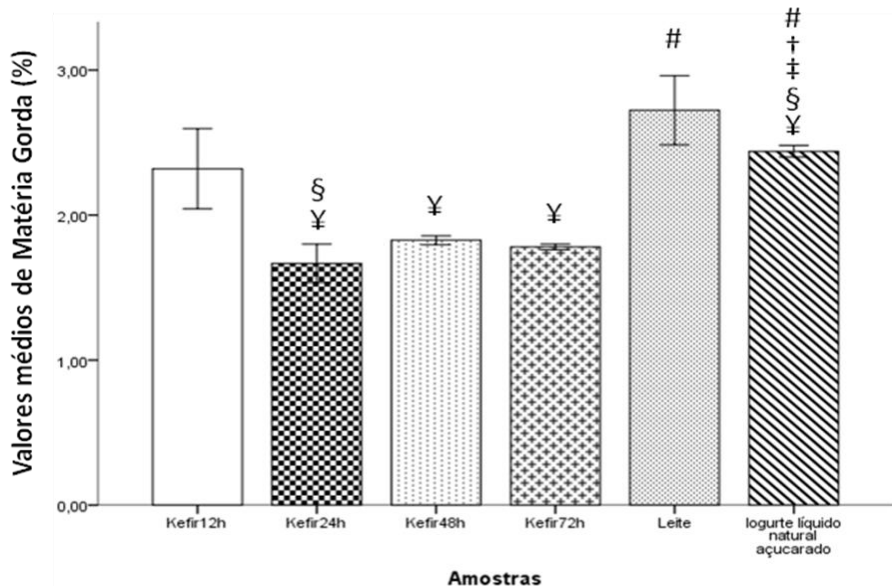


Figura 5.3 - Comparação dos valores médios de matéria gorda (Gordura), quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Segundo os resultados obtidos pelo Teste Post Hoc, figura 5.3, verificou-se que, o Kefir12h não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado com as restantes 5 amostras; o Kefir24h apenas apresentou diferenças estatisticamente significativas com o leite e o iogurte; existiram diferenças estatisticamente significativas entre o Kefir48h e o iogurte; entre o Kefir72h e o iogurte também se detetaram diferenças, ou seja, o iogurte foi o que apresentou diferenças estatisticamente significativas com mais amostras (Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h e o leite).

Ao analisar os resultados obtidos, denotou-se que o leite apresentou o teor de matéria gorda mais elevado, 2,72%. Isto deve-se ao facto de, nas determinações, ter sido utilizado leite meio-gordo. O teor de gordura do Kefir12h (2,32%) foi o que mais se aproximou do teor do iogurte (2,44%). A amostra que apresentou teor de gordura mais baixo foi o Kefir24h, 1,67%, o que demonstra que o kefir com 24 horas de fermentação é o mais saudável. Tendo em conta os desvios padrão do kefir48h (1,83%), Kefir72h (1,78%) e do kefir 24h é possível afirmar que os teores de gordura são bastante semelhantes.

5.4 Determinação do Teor de Proteína Bruta

Para a determinação do teor de proteína, a análise estatística foi realizada da mesma forma que o pH e a matéria gorda. Depois de se verificar que o pressuposto da homogeneidade de variâncias não foi cumprido (anexo 8.10, tabela 8.10.1), realizou-se a interpretação através do Teste Kruskal-wallis (anexo 8.10, tabela 8.10.2), sendo depois realizado o Teste Post Hoc, de acordo com os mesmos parâmetros, descritos anteriormente (anexo 8.10, tabela 8.10.3).

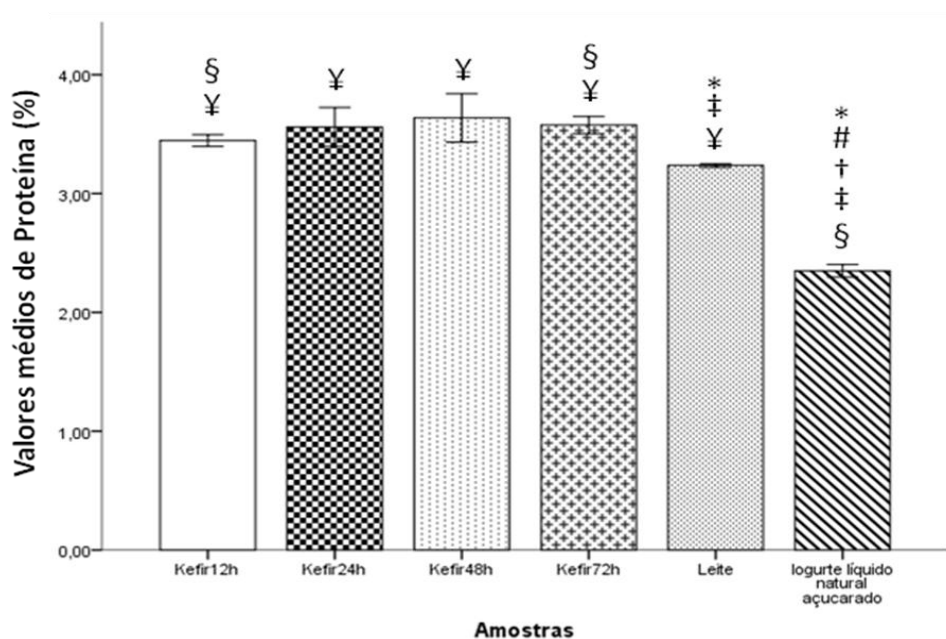


Figura 5.4 - Comparação dos valores médios de proteína, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Pela análise dos resultados obtidos na determinação do teor de proteína bruta, figura 5.4, através do teste Post-Hoc, verificou-se que o Kefir12h apenas apresentou diferenças estatisticamente significativas com o leite e o iogurte, não tendo sido detetadas diferenças entre este, o Kefir24h, Kefir48h e Kefir72h; o Kefir24h apenas apresentou diferenças estatisticamente significativas com o iogurte, assim como o Kefir48h que também só apresentou diferenças com o iogurte. No caso do teor de proteína no Kefir72h foram detetadas diferenças entre este, o leite e o iogurte; o leite apresentou diferenças estatisticamente significativas com o Kefir12h, o Kefir72h e o

iogurte. Por último e como já nomeado acima existiram diferenças estatisticamente significativas entre o teor de proteína do iogurte e as restantes 5 amostras.

Tendo em conta os resultados obtidos, observou-se que o iogurte apresentou o teor de proteína bruta mais reduzido (2,35%), seguindo-se o leite, com 3,24 % de proteína bruta. As restantes amostras, Kefir12h (3,45%), Kefir24h (3,56%), Kefir48h (3,64%) e Kefir72h (3,58%) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre eles, sendo os valores obtidos muito próximos entre si, pelo que esta variação não é expressiva.

Este método determina o teor de azoto total, pelo que, como o kefir fermentou o leite, as proteínas são digeridas, mas os átomos de azoto mantêm-se, por isso os resultados obtidos foram os esperados. No caso do iogurte, este pode ter sido fermentado a partir de um leite com menos proteína, daí o seu teor de proteína.

5.5 Determinação do Teor de Lactose

A análise estatística correspondente a esta determinação foi realizada da mesma forma que na determinação da acidez e seguindo os mesmos parâmetros. O teste da homogeneidade de variâncias (anexo 8.10, tabela 8.10.1) demonstrou que pressuposto da homogeneidade das variâncias foi cumprido ($p \text{ value}=0,890 > 0,05$), e por conseguinte o teste utilizado foi o teste ANOVA (anexo 8.10, tabela 8.10.4). A hipótese nula (H_0) foi, novamente, rejeitada, existiram diferenças estatisticamente significativas, uma vez que o $p \text{ value}$ foi de 0,000 ($<0,05$). Com isto, realizou-se, novamente o teste de comparações múltiplas, Teste Post Hoc (anexo 8.10, tabela 8.10.5).

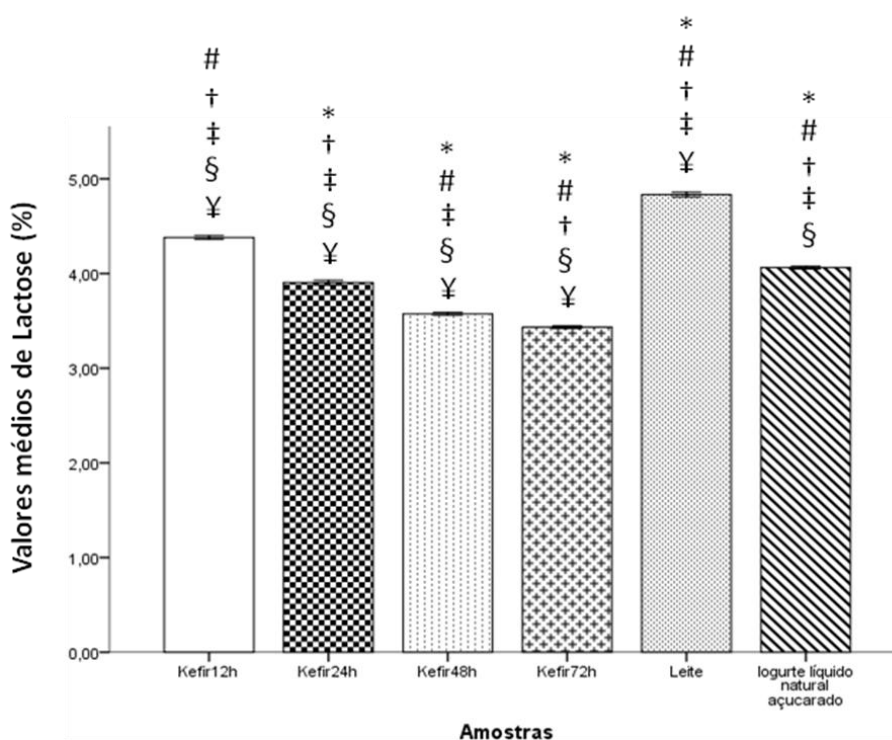


Figura 5.5 - Comparação dos valores médios de lactose, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Verificou-se, pela análise dos resultados obtidos para o teor de lactose, figura 5.5, que existiram diferenças estatisticamente significativas entre todas as amostras.

De acordo com os resultados denotou-se que o Kefir72h apresentou o teor de lactose mais baixo (3,43%) e o leite apresentou o teor de lactose mais elevado (4,83%). Verificou-se que, ao longo do tempo de fermentação, o teor de lactose foi diminuindo, o Kefir12h apresentou 4,38% de lactose, o Kefir24h apresentou 3,90%, o Kefir48h 3,57% e o Kefir72h 3,43%. Este facto, demonstra que ao longo da fermentação a lactose foi sendo consumida e degradada pelas bactérias. O iogurte (4,06%), apesar de possuir menos lactose do que o leite (4,83%), possui mais do que o Kefir24h (3,90%), sendo o kefir o mais aconselhável a pessoas intolerantes à lactose.

5.6 Determinação do Teor de Açúcares Totais

Tal como na determinação da acidez e do teor de lactose, o teor de açúcares totais, foi analisado estatisticamente através do teste da homogeneidade de variâncias

(anexo 8.10, tabela 8.10.1) e mais uma vez, o pressuposto da homogeneidade das variâncias foi cumprido ($p \text{ value} = 0,476 > 0,05$) e o teste utilizado foi o teste ANOVA (anexo 8.10, tabela 8.10.4). A hipótese nula (H_0) foi, novamente, rejeitada, existiram diferenças estatisticamente significativas, uma vez que o $p \text{ value}$ foi de 0,000 ($< 0,05$). Com isto, realizou-se, novamente o teste de comparações múltiplas, Teste Post Hoc (anexo 8.10, tabela 8.10.5).

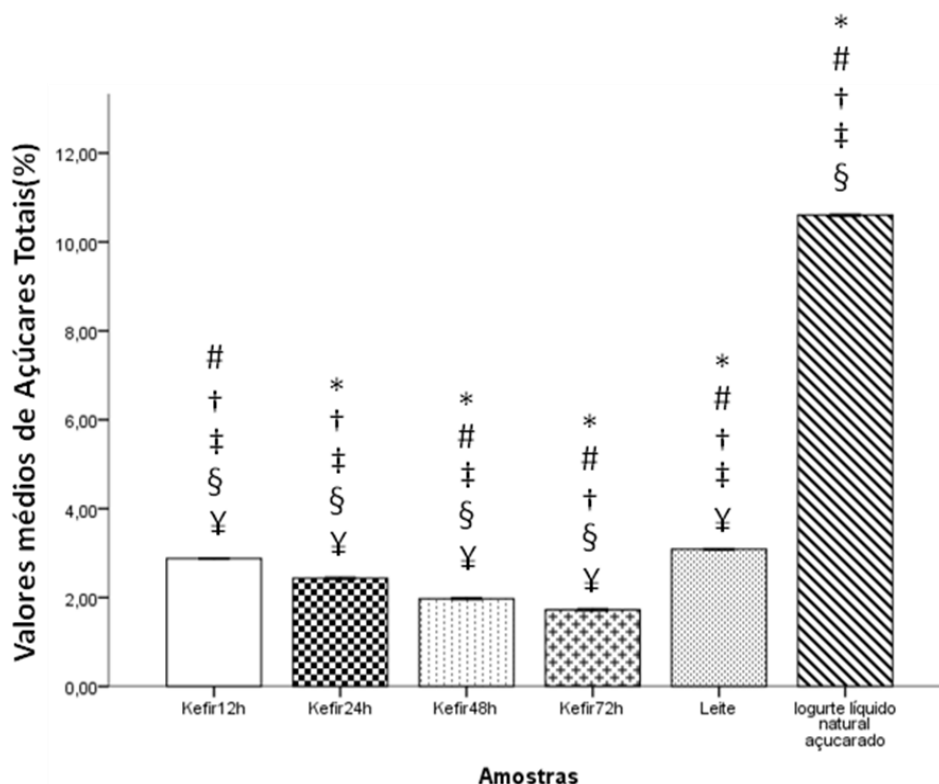


Figura 5.6 - Comparação dos valores médios de açúcares totais, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Pelos resultados obtidos através do teste Post Hoc (figura 5.6), denotou-se que, entre todas as amostras existiram diferenças estatisticamente significativas.

O iogurte, pelas suas características, iogurte natural açucarado, possui uma quantidade de açúcares totais bastante elevada, cerca de 10,60 %, que corresponde ao teor de açúcares totais presente no rótulo da embalagem.

Verificou-se que, tal como para a lactose, o teor de açúcares diminuiu ao longo da fermentação, sendo que, o Kefir12h apresentou 2,88%, o Kefir24h 2,43%, o Kefir48h 1,97% e o Kefir72h 1,72%. Esta diminuição é esperada e pode ser explicada pelo facto das bactérias consumirem o açúcar do leite ao efetuarem a fermentação. O leite obteve um teor de açúcares totais de 3,09%, valor próximo do teor do Kefir12h (2,88%), ou seja, nas primeiras 12 horas de fermentação não existiu um consumo de açúcares muito acentuado.

5.7 Determinação da Cinza Total

A análise estatística utilizada nesta determinação foi a mesma que para o pH, a matéria gorda e proteína bruta. Depois de verificado que o pressuposto da homogeneidade de variâncias não foi cumprido (anexo 8.10, tabela 8.10.1), realizou-se a interpretação através do Teste Kruskal-wallis (anexo 8.10, tabela 8.10.2), sendo depois realizado o Teste Post Hoc, de acordo com os mesmos parâmetros, descritos anteriormente (anexo 8.10, tabela 8.10.2)

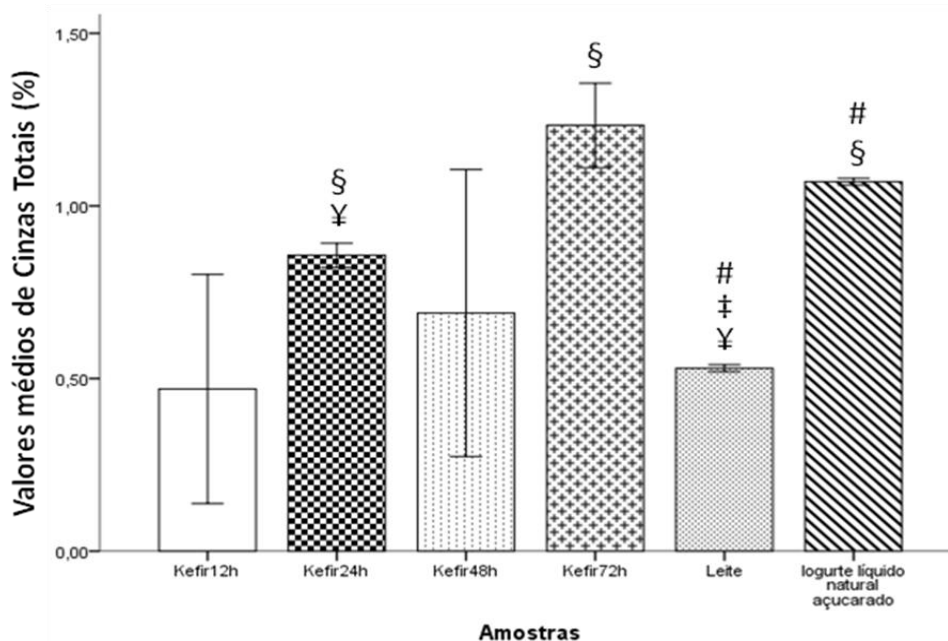


Figura 5.7 - Comparação dos valores médios de cinzas totais, quando comparadas as amostras Kefir12h, Kefir24h, Kefir48h, Kefir72h, leite e iogurte líquido natural açucarado. Os resultados referem-se à média de três experiências independentes realizadas em triplicado. As colunas representam os valores médios de pH. As linhas verticais representam a média \pm Desvio-Padrão (DP); detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$) quando comparadas as amostras com Kefir12h (*), com Kefir24h (#), com Kefir48h (†), com Kefir72h (‡), com leite (§) e com iogurte líquido natural açucarado (¥).

Ao analisar os resultados obtidos, figura 5.7, observou-se que o Kefir12h não apresentou diferenças estatisticamente significativas com as restantes amostras; ocorreu o mesmo com o Kefir48h, que também não apresentou diferenças. O Kefir24h apresentou diferenças estatisticamente significativas com o leite e o iogurte; foram detetadas diferenças entre o Kefir72h e o leite. O leite demonstrou possuir diferenças estatisticamente significativas com o Kefir24h, o Kefir72h e o iogurte. Por último, o iogurte apresentou diferenças estatisticamente significativas com o Kefir24h e o leite.

Os resultados obtidos nesta determinação apresentam algumas inconsistências, o Kefir12h apresentou o valor mais baixo de cinzas (0,47%), seguindo-se o leite, com 0,53%, o Kefir48h obteve 0,69%, o Kefir24h 0,86%, o iogurte obteve 1,07 % e o Kefir72h apresentou o teor de cinzas mais elevado, 1,23%. Estas discrepâncias podem ser justificadas pelo facto de durante a evaporação na mufla, ter ocorrido perda de massa em algumas das amostras.

5.8 Determinação dos Ácidos Gordos

Nesta determinação, foram analisadas 6 amostras, o leite, o iogurte, o kefir fermentado durante 24 horas, o kefir fermentado durante 24 horas guardado durante uma semana no frigorífico, o batido de kefir (fermentado durante 24h) com frutos vermelhos e o batido de kefir (fermentado durante 24 horas) com frutos vermelhos guardado no frigorífico durante uma semana.

Através da cromatografia gasosa, obtiveram-se os cromatogramas, referente às análises das amostras, apresentados nas figuras abaixo apresentadas (figuras 5.8, 5.9, 5.10, 5.11, 5.12, 5.13).

RT: 3.18 - 22.39

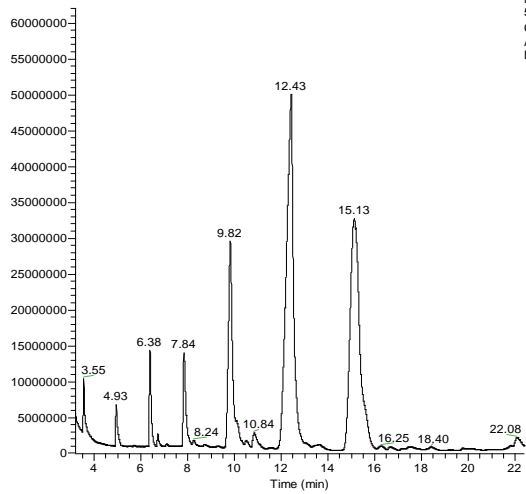


Figura 5.8 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do leite.

NL: 5.01E7
Channel 1
Analog
Leite2

RT: 3.24 - 18.85

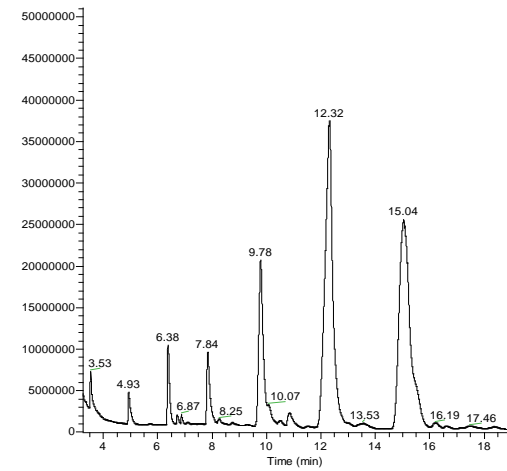


Figura 5.9 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do iogurte.

NL: 3.75E7
Channel 1
Analog
Iogurte

RT: 3.30 - 20.63

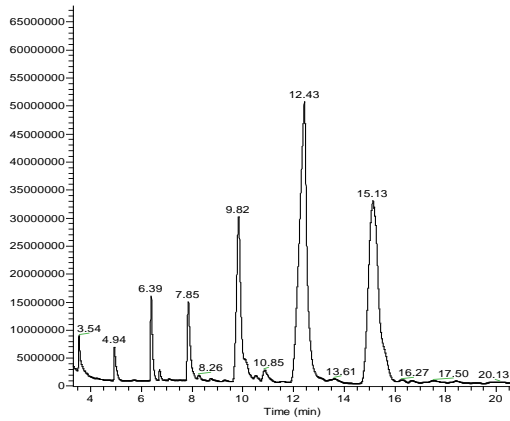


Figura 5.10 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h.

NL: 5.08E7
Channel 1
Analog
Kefir1

RT: 0.32 - 20.94

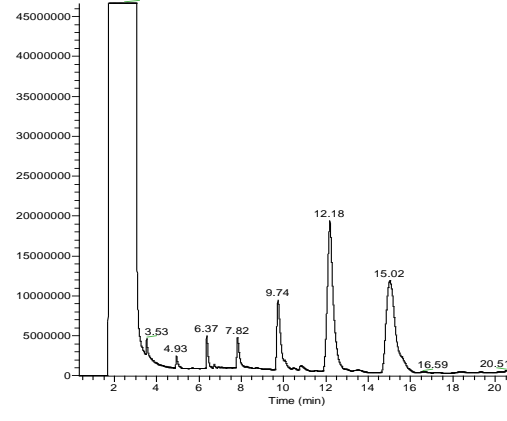


Figura 5.11 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h com frutos vermelhos..

NL: 1.39E8
Channel 1
Analog
KcF24h

RT: 0.00 - 22.00

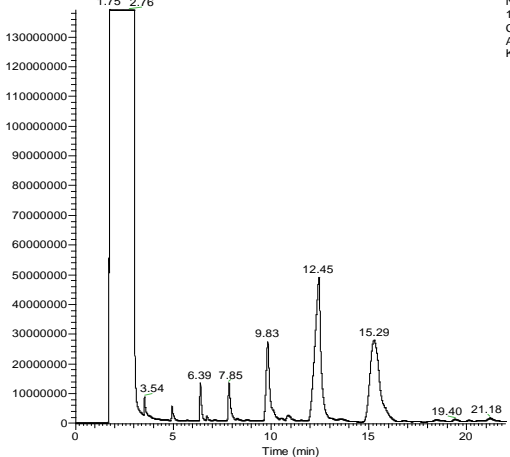


Figura 5.12 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h com uma semana.

NL: 1.39E8
Channel 1
Analog
K1semana

RT: 0.00 - 22.00

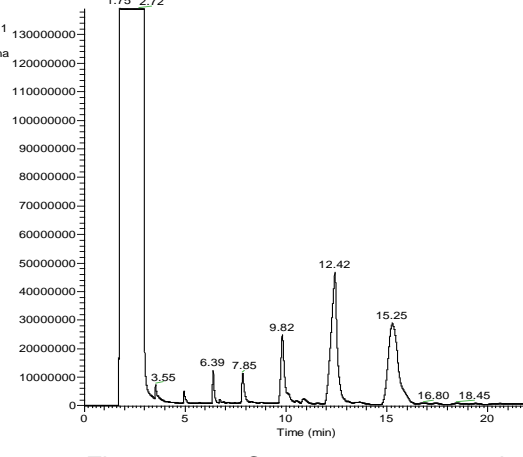


Figura 5.13 - Cromatograma associado à determinação dos ácidos gordos do Kefir24h com frutos vermelhos com uma semana.

NL: 1.39E8
Channel 1
Analog
KCF1semana

Com os cromatogramas, e com o auxílio dos padrões certificados PUFA-3, Menhaden Oil da Supelco Analytical, cuja composição é conhecida, identificou-se os ácidos gordos presentes nas amostras, através do tempo de retenção dos picos na coluna. Obteve-se a tabela 5.2 que demonstra as percentagens de cada ácido gordo em cada amostra.

Tabela 5.2- Percentagem de ácidos gordos encontrados em cada uma das amostras.

Ácido Gordo	Leite	Iogurte	Kefir 24h	Kefir com frutos vermelhos	Kefir 24h com uma semana	Kefir com frutos vermelhos com uma semana
Ácido Caproico	1,65	1,54	1,53	0,85	0,87	3,72
Ácido Caprílico	1,50	1,45	1,43	1,07	0,99	3,28
Ácido Cáprico	3,20	3,17	3,33	2,53	3,05	8,44
Ácido Láurico	4,30	3,99	4,46	3,33	3,96	7,94
Ácido Mirístico	11,89	14,49	15,41	9,51	11,22	16,95
Ácido Miristoleico	0,43	-	-	-	-	-
Ácido Pentadecanóico	0,98	1,44	1,18	1,01	1,15	1,45
Ácido Palmítico	44,27	41,74	41,83	39,59	40,02	34,13
Ácido Palmitoleico	0,66	0,82	0,57	0,54	0,09	0,47
Ácido Esteárico/Ácido Oleico	28,91	28,43	28,25	36,7	37,11	21,29
Ácido Linoleico	0,51	0,86	0,58	3,14	-	-
Ácido Linolénico	0,20	0,46	0,28	-	0,16	0,33
Ácido Estearidónico	0,23	-	0,23	0,32	0,18	0,32
Ácido Eicosenóico	0,23	0,72	-	0,24	-	0,24
Ácido Araquidónico	0,26	0,35	0,35	0,38	0,36	-
Ácido Docosahexaenóico	0,10	-	-	-	-	-

Pela análise da tabela 5.2 verificou-se que, no que diz respeito ao ácido caproico o leite, o iogurte e o kefir fermentado durante 24 horas apresentaram percentagens semelhantes, enquanto que o kefir com frutos vermelhos e o kefir 24h guardado uma semana no frigorífico apresentaram, ambos, percentagens mais baixas. O Kefir com frutos vermelhos guardado no frigorífico durante uma semana apresentou a percentagem mais elevada, cerca de o quádruplo da percentagem inicial (kefir com frutos vermelhos). Em relação ao ácido caprílico, verificou-se a mesma situação que para o ácido caproico.

No caso do ácido cáprico verificou-se que o leite, o iogurte, o kefir24h e o kefir24h com uma semana apresentaram percentagens aproximadas, o kefir com frutos vermelhos apresentou a percentagem mais reduzida e, mais uma vez, o kefir com frutos vermelhos com uma semana apresentou a percentagem mais elevada de ácido cáprico.

Verificou-se uma percentagem mais elevada de ácido láurico e mirístico no kefir com frutos vermelhos com uma semana, e, em ambos os casos, o kefir com frutos vermelhos “fresco” apresentou a percentagem mais baixa.

O leite foi a única amostra que possuiu ácido miristoleico e docosahexaenico, mesmo que em percentagens muito reduzidas.

No que diz respeito ao ácido pentadecanico, o iogurte e o kefir com frutos vermelhos com uma semana apresentaram percentagens semelhantes, sendo que, estas foram as mais elevadas. O leite apresentou a percentagem mais reduzida deste ácido.

Relativamente ao ácido palmítico verificou-se que, em primeiro lugar, este foi o ácido gordo presente em maior quantidade em todas as amostras, sendo que, o leite apresentou uma percentagem bastante elevada (quase 50%), seguindo-se o iogurte e o kefir, que possuíram percentagens semelhantes; o kefir com frutos vermelhos e o kefir24h com uma semana apresentaram percentagens aproximadas e, por fim, o kefir com frutos vermelhos com uma semana apresentou a percentagem de ácido palmítico mais reduzida.

No que diz respeito ao ácido palmitoleico, verificou-se que todas as amostras apresentaram uma percentagem inferior a 1%, sendo que, o iogurte com frutos vermelhos com uma semana apresentou uma percentagem residual.

Na identificação dos picos, verificou-se que num dos casos, um pico poderia ser correspondente a dois ácidos gordos, neste caso, esteárico ou oleico. Neste caso, este ácido gordo apareceu em todas as amostras em elevadas quantidades, no entanto a que apresentou a percentagem mais reduzida foi o kefir com frutos vermelhos com uma semana.

Quanto à percentagem de ácido linoleico verificou-se que nem o kefir24h com uma semana nem o kefir com frutos vermelhos com uma semana apresentaram este ácido; o leite, o iogurte e o kefir24h apresentaram percentagens baixas e o kefir com frutos vermelhos possuiu a percentagem mais elevada.

Relativamente ao ácido linolénico, verificou-se que o kefir com frutos vermelhos não possui este ácido gordo e as restantes amostras apresentaram percentagens de ácido gordo bastante reduzidas, todas inferiores a 0,5%.

O iogurte não apresentou ácido estearidónico, enquanto que as restantes amostras possuíram percentagens muito reduzidas, abaixo dos 0,4%.

No caso do ácido eicosenóico verificou-se que o iogurte apresentou a percentagem mais elevada, o leite, o kefir com frutos vermelhos e o kefir com frutos vermelhos com uma semana, apresentaram valores semelhantes; o kefir24h e o kefir24h com uma semana não apresentaram ácido eicosenóico.

No que diz respeito ao ácido araquidónico verificou-se que o kefir com frutos vermelhos com uma semana não apresentou este ácido, o leite apresentou uma percentagem bastante reduzida e o iogurte, o kefir24h “fresco” e com uma semana e ainda o kefir com frutos vermelhos apresentaram percentagens semelhantes.

Em termos gerais, existiu um aumento significativo dos ácidos gordos caproico, caprílico, cáprico, láurico e mirístico no kefir com frutos vermelhos com uma semana quando comparado com o kefir com frutos vermelhos inicial ou com as restantes amostras. O ácido palmítico foi o que apareceu em maiores percentagens em todas as amostras, seguido do ácido esteárico e oleico, depois o ácido mirístico seguido do ácido láurico, do ácido cáprico, caprílico e caproico. Os restantes ácidos gordos, encontram-se presentes em todas as amostras em percentagens inferiores a 1%, ou em alguns casos, estão mesmo ausentes.

5.9 Análise Sensorial

Os resultados obtidos na análise sensorial de comparação, entre o batido de kefir com frutos vermelhos e o iogurte com frutos vermelhos comercial, encontram-se demonstrados na tabela 5.3, abaixo apresentada.

Tabela 5.3 - Resultados obtidos na prova sensorial de comparação, onde 1 significa que o provador preferiu o batido de kefir com frutos vermelhos e 2 significa que o provador preferiu o iogurte com frutos vermelhos comercial.

Sujeito	Cor	Aparência	Odor	Doce	Ácido	Textura na Boca	Flavour Residual	Preferência
1	1	1	2	2	1	2	1	2
2	1	1	2	2	1	1	2	2
3	1	1	2	2	1	2	1	2
4	1	1	2	1	1	1	2	1
5	1	1	2	2	1	2	2	2
6	1	1	2	2	1	1	2	2
7	1	1	2	2	2	2	2	2
8	1	2	2	1	1	2	1	2
9	1	1	2	2	1	2	2	2
10	1	1	2	1	2	2	2	2

Analisando a tabela 5.3 verificou-se que, em termos de cor, todos os 10 provadores preferiram o kefir, no caso da aparência apenas um provador, provador número 8, preferiu o iogurte, sendo que os restantes 9 preferiram o kefir. No que diz respeito ao odor, todos os provadores preferiram o iogurte; em termos de doçura, 7 provadores preferiram o iogurte, os restantes 3 preferiram o kefir; no caso do parâmetro acidez, 8 dos 10 provadores escolheram o kefir, mas, neste caso, os provadores terão indicado qual das duas amostras seria a mais ácida e não qual preferiam, tendo em conta as restantes escolhas. No que diz respeito à textura na boca, apenas 3 provadores preferiram o kefir, enquanto que os restantes preferiram o iogurte; no caso do flavour residual, ou seja, a persistência de sabor que fica na boca após deglutição da amostra, 3 provadores preferiram o kefir e 7 preferiram o iogurte. Por fim, foi pedido aos provadores que, em termos globais, escolhessem uma das amostras como a preferida e, neste caso, 9 em 10 provadores preferiram o iogurte.

Através desta análise sensorial verificou-se que, quando se compara estas duas amostras, o kefir fica a perder, e isto pode dever-se ao facto de, o ser humano consumir, desde criança, iogurtes e por isso estar habituado a este sabor. Uma vez que o kefir possui um sabor e odor tão característicos e de teor ácido, muitos indivíduos não apreciam este produto, ou apenas preferem o iogurte.

Os resultados obtidos na análise sensorial afetiva de aceitação, encontram-se demonstrados na tabela 5.4, abaixo apresentada.

Tabela 5.4- Resultados obtidos na prova sensorial de aceitação, onde está apresentado o número de provadores que deram cada classificação a cada parâmetro.

Classificação	Parâmetros					Aceitação (Compraria)	
	Odor	Cor	Textura	Sabor	Flavour	Sim	Não
1	1	0	0	0	0	47	4
2	17	0	3	4	1		
3	17	8	15	12	20		
4	9	18	17	19	23		
5	7	25	16	16	7		

Através da análise dos resultados obtidos, tabela 5.4, verificou-se que, em termos de odor, a classificação mais atribuída foi 2 e 3 (ambas atribuídas por 17 provadores), sendo que apenas 1 provador atribuiu a pontuação 1; já no caso da cor, nenhum provador atribuiu as pontuações 1 e 2 e a pontuação mais atribuída foi 5 (escolhida por 25 provadores). No que diz respeito à textura, nenhum provador atribuiu a classificação de 1 e a pontuação mais atribuída para este parâmetro foi 4; no caso do sabor e do flavour, sucedeu o mesmo que no parâmetro anterior, nenhum provador atribuiu a classificação de 1 e a classificação escolhida por mais provadores foi 4. Por último, e quando perguntado aos provadores se comprariam o produto, caso este existisse no mercado, 47 afirmaram que comprariam e apenas 4 não comprariam.

De acordo com estes resultados denotou-se que, ao contrário da análise sensorial anterior, esta análise mostrou-se favorável e o produto foi bastante aceite pelos provadores.

Com os resultados obtidos na prova sensorial de aceitação realizou-se uma análise de correspondências múltipla (ACM). O diagrama (Figura 5.14) evidencia as configurações que refletem a existência de grupos de indivíduos que se posicionam, no âmbito da aceitação, da seguinte forma:

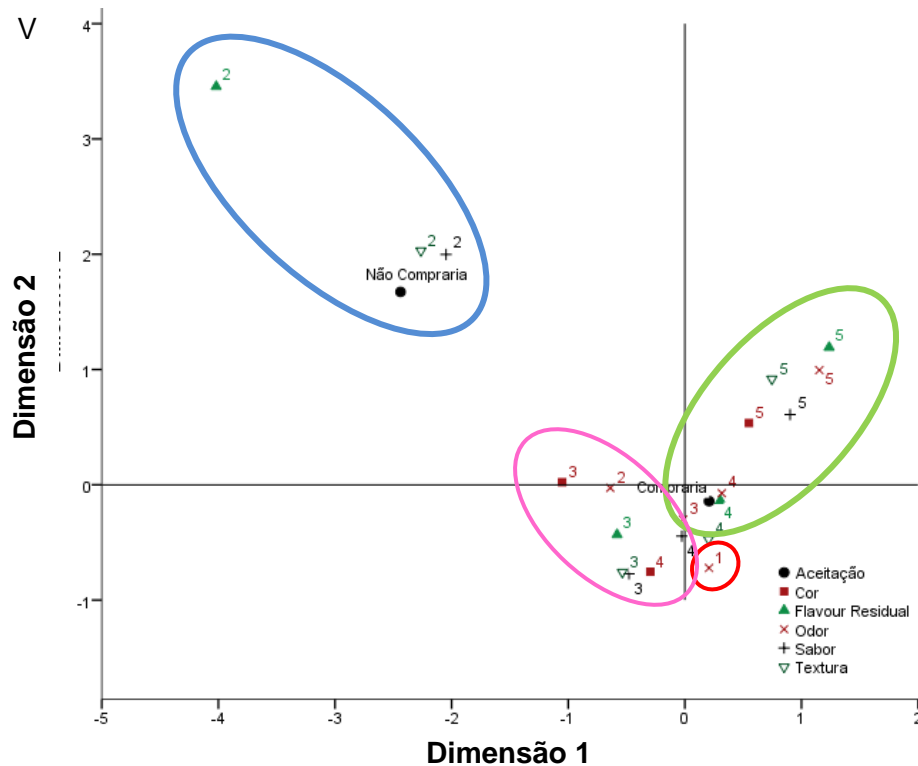


Figura 5.14- Diagrama resultante da ACM para os diferentes parâmetros e classificação atribuída.

Pela análise da figura 5.14 verificou-se que, os provadores que classificam “flavour”, “textura” e “sabor” com 2, círculo a azul, estão claramente associados à intenção de não comprar. Por sua vez, os indivíduos que classificam todos os parâmetros com 5, círculo a verde, estão claramente associados à intenção de comprar; os indivíduos que classificam os parâmetros com 4, o mesmo círculo a verde, também se mostram favoráveis à possibilidade de poder comprar o produto. Verifica-se ainda que mesmo uma classificação de 1 para o “odor”, círculo a vermelho, não exclui a vontade do provador comprar. Os provadores que muito embora mostrem alguma renitência quanto à opinião favorável sobre alguns dos parâmetros, ainda assim, consideram comprar o produto, círculo a rosa.

Dada a pouca representatividade de algumas classificações realizadas pelos inquiridos, as classificações 1 e 2, tal como 4 e 5 foram agrupadas. Desta forma foi possível demonstrar de forma mais vincada os padrões e perfis observados (Figura 5.15).

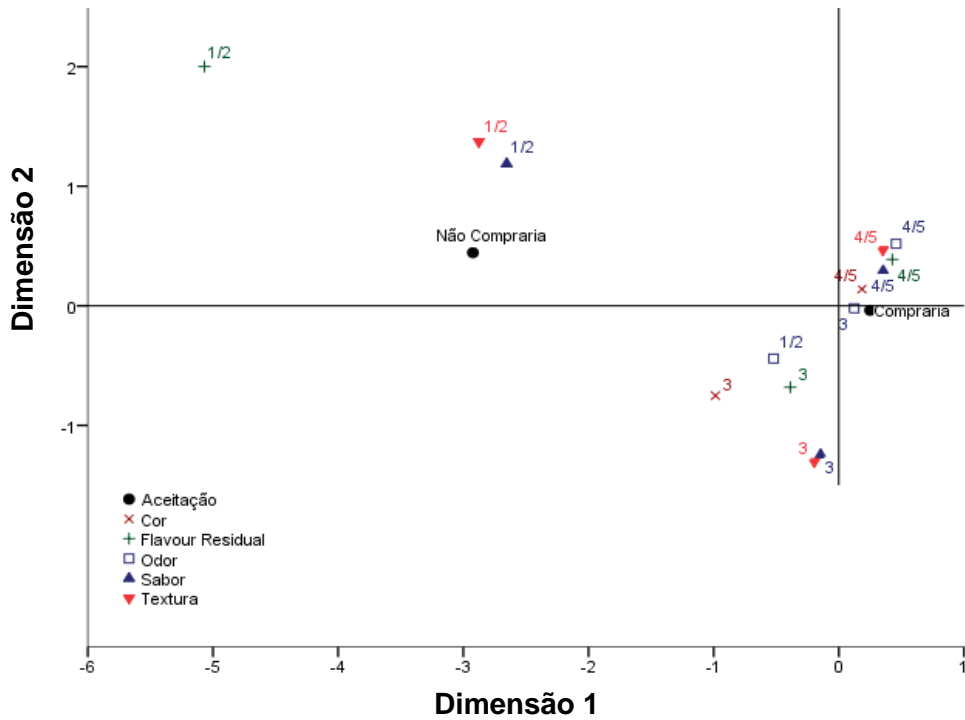


Figura 5.15- Diagrama resultante da ACM para as classificações agrupadas como 1+2, 3 e 4+5.

Em simultâneo, foi realizada uma análise fatorial (Figura 5.16).

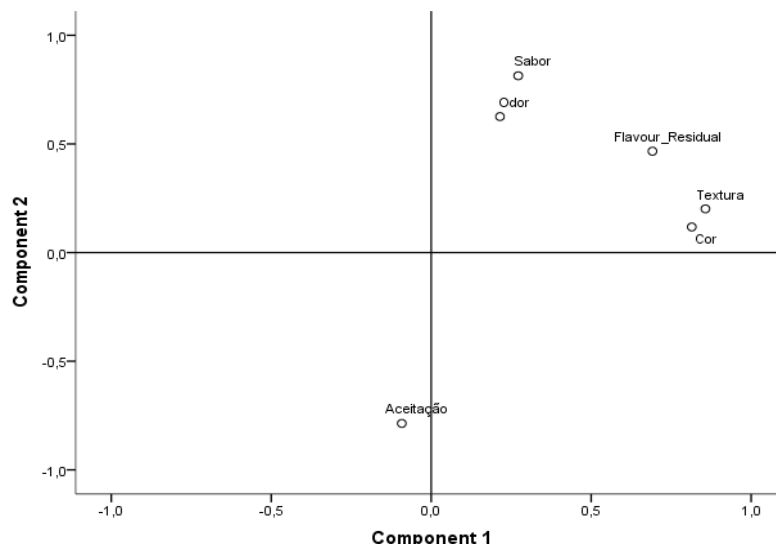


Figura 5.16- Análise fatorial dos parâmetros analisados na prova sensorial de aceitação.

A figura 5.16 evidencia configurações que demonstram que a intenção de compra está claramente em oposição às classificações, ou seja, de uma forma geral embora a classificação seja realizada num determinado sentido, a vontade de comprar/não comprar acaba por aparecer dissociada (basicamente, os inquiridos até podem não ter gostado, mas ter na mesma vontade de comprar).

Mais uma vez, agrupou-se as classificações em 1+2, 3 e 4+5, uma vez que algumas classificações atribuídas pelos provadores, apresentam pouca representatividade, não sendo muito claros. Este processo encontra-se apresentado na figura 5.17, em baixo apresentado.

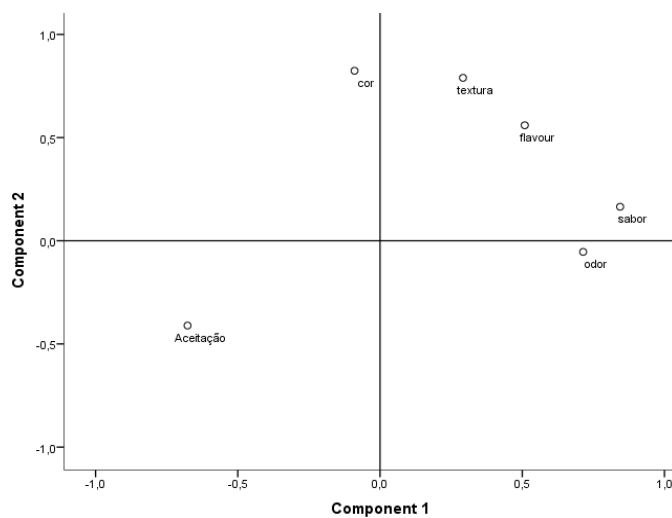


Figura 5.17- Agrupamento das classificações em 1+2, 3 e 4+5 na análise fatorial.

6. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos ao longo desta dissertação denotou-se que o kefir fermentado durante 24 horas parece ser o mais indicado para o consumo. Tendo em conta o valor de pH obtido no kefir com 24 horas e os valores das restantes amostras verificou-se que passadas 48 horas ou 72 horas o pH diminuiu muito pouco, quase estabilizando, sendo o Kefir24h (4,60) o que mais se aproximou do iogurte (4,23), em termos de pH. Também em termos de acidez, o Kefir24h demonstrou ser o mais indicado para consumo, pois é o que mais se aproxima da acidez do iogurte e além disso, valores mais elevados de acidez, do que a apresentada pelo Kefir24h (250 mL/L) tornam-se desagradáveis em termos de sabor, uma vez que, alguns provadores demonstraram-se algo desagradados com a acidez do kefir, tendo em conta que o leite apresentou uma acidez de apenas 17,17 mL/L.

No que diz respeito ao teor de matéria gorda encontrada nas amostras verificou-se que o Kefir24h apresentou o valor mais baixo (1,67% de matéria gorda). Ao longo das fermentações, não se verificou grande alteração no teor de matéria gorda, o que leva a crer que a fermentação não afeta o teor de matéria gorda do kefir, esta mantém-se (aproximadamente, e tendo em conta os erros associados a esta determinação) ao longo de 72 horas de fermentação. O mesmo aconteceu, no caso da proteína bruta, onde, o seu teor se manteve, ao longo da fermentação, o que também demonstra que o teor de proteína bruta não é afetado pela fermentação realizada pelos grãos de kefir. Neste caso, as amostras de kefir (Kefir12h (3,45%), Kefir24h (3,56%), Kefir48h (3,64%) e Kefir72h (3,58%)) demonstraram todas teores de proteínas superiores ao teor do iogurte (2,35%).

O teor de lactose, obtido foi o esperado, isto é, diminuiu ao longo da fermentação e apresentou-se mais elevado no leite e no iogurte. Apesar de o teor de lactose mais baixo que se obteve ter sido o do Kefir72h (como esperado), o Kefir24h continua a ser o mais indicado, pois, mais uma vez, o Kefir72h é desagradável para os consumidores tanto ao nível do sabor, como ao nível de odor ou mesmo aspeto. Com os resultados de teor de lactose é possível afirmar que este produto é apropriado para pessoas intolerantes à lactose, uma vez que esta diminuiu, em relação ao teor de lactose do leite.

No que concerne ao teor de açúcares totais verificou-se que este diminuiu ao longo da fermentação, facto este também esperado, uma vez que as bactérias degradaram os açúcares para ocorrer a fermentação. O teor obtido para o iogurte, apesar de elevado, também foi o esperado tendo em conta que se tratou de um iogurte natural açucarado.

Verificou-se que, e tendo em conta os erros associados à determinação, ao método utilizado, os resultados obtidos para o teor de cinza não foram coerentes. No entanto, de acordo com os resultados obtidos, o Kefir 12h apresentou o teor de cinzas mais baixo e o Kefir72h apresentou o valor mais elevado. O Kefir24h apresentou um valor intermédio sendo mais elevado do que o do leite e mais baixo do que o do iogurte. Tendo em conta que quanto menor for o teor de cinzas, melhor será o alimento, neste caso o melhor seria o Kefir 12h.

De acordo com os resultados obtidos na determinação dos ácidos gordos, verificou-se que os ácidos gordos que apareceram em maior quantidade, em todas as amostras, foram o ácido palmítico, o que seria de esperar uma vez que este está presente no leite, o ácido esteárico ou o ácido oleico (uma vez que, é difícil, de acordo com os picos obtidos nos cromatogramas, perceber, com certeza, que se trata de um ou de outro; segue-se o ácido mirístico, o ácido láurico, o ácido cáprico, o caproico e o caprílico; os restantes ácidos gordos aparecem em quantidades abaixo de 1%. Tendo em conta os resultados obtidos e comparando as amostras, é possível afirmar que o conteúdo em ácidos gordos do Kefir 24h (filtrado e de seguida feita a análise) foi bastante parecido ao conteúdo do iogurte, sendo que o Kefir24h conservado no frio durante uma semana, apresentou, em termos gerais uma diminuição dos ácidos gordos, com a exceção do ácido esteárico/oleico, que aumentou. Isto demonstra que ao longo do tempo, o kefir, conservado no frio, foi perdendo as suas propriedades. Relativamente ao kefir24h com frutos vermelhos (preparado no dia) apresentou uma % de ácidos gordos menor do que o Kefir24h simples (preparado no dia). No entanto, verificou-se o oposto, no que diz respeito ao kefir24h com frutos vermelhos conservado no frio durante uma semana. Neste caso, verificou-se, no geral, um aumento dos ácidos gordos, com exceção do ácido palmítico e do ácido esteárico/oleico, que diminuiu neste caso. Com isto conclui-se que os frutos vermelhos ajudaram na conservação do kefir, aumentando o conteúdo de ácidos gordos, ao longo de uma semana. No entanto, nem o kefir24h nem o kefir24h com frutos vermelhos, ambos com 1 semana, se apresentaram próprios para consumo, ocorrendo a sua degradação e consequentes odor e sabor desagradáveis.

De acordo com os resultados obtidos na análise sensorial realizada para o novo produto, batido de kefir com frutos vermelhos, conclui-se que ao comparar o produto com um iogurte com frutos vermelhos comercial, apesar dos indivíduos preferirem o aspeto do kefir, em termos gerais, preferiram o iogurte, e afirmaram que o odor se apresentou bastante desagradável e que era ácido demais.

Posto isto, realizou-se uma outra prova, de aceitação, e de acordo com os resultados obtidos, de 51 provadores, 47 comprariam o produto e apenas 4 se recusariam. Com estes resultados, é possível concluir que, quando se comparou um produto comercial (bastante doce e artificial) com um produto caseiro, com um sabor característico e ácido, os provadores, escolhem, como seria de esperar, o mais doce. No entanto, provado individualmente e sem comparação, os indivíduos mostraram-se agradados com o kefir com frutos vermelhos. Mesmo não gostando do odor ou flavour residual, os provadores, em termos gerais comprariam. Tendo em conta os resultados que se obtiveram na prova de aceitação conclui-se que este produto foi bastante aceite pelos provadores, tendo alguns deles dado sugestões como, alteração do odor, consistência, ou utilização deste produto para barrar no pão ou bolachas, em vez de iogurte para beber.

Assim, e tendo em conta, todos os resultados, conclui-se que, em termos gerais, o kefir fermentado durante 24 horas demonstrou ser o mais indicado para todos os consumidores, principalmente os intolerantes à lactose.

O novo produto criado foi aceite pelos provadores, no entanto, será necessário aprofundar este tema, no que diz respeito à sua conservação e odor.

7. Referências Bibliográficas

- Amaral, F.R., Carvalho, L.B., Brito, J.R.F., Silva, N. 2005. *Qualidade do leite de búfalas: contagem de células somáticas*. Escola de Veterinária-UFMG. Belo Horizonte, Minas Gerais
- Baptista P, Pinheiro G, Alves P. 2003. *Sistemas de Gestão de Segurança Alimentar*, 1ª Edição, Forvisão – Consultoria em formação integrada. Guimarães, Portugal.
- Canôa J. 2008. Requisitos para a implementação do HACCP. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária pp. 8 – 71.
- Carvalho C, Costa H. 2009. *Marketing-Mix - Kefir Ómega Plus*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Codex Alimentarius. *Higiene dos Alimentos*. Pp4-62.
- Codex Alimentarius. 2005. *Código de Práticas de Higiene Para a Carne*. Pp. 4-28
- Decreto de Lei n.º 113/2006 de 12 de Junho. Diário da República nº 113/2006 - I Série-A. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas.
- Domingues, J. 2008. *Sistema HACCP: Implementação do Sistema de Autocontrolo num Catering de Aviação*. Universidade Técnica de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária (UTL-FMV)
- Fontán M, Martínez S, Frnco I, Carballo J. 2005. *Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture*. Faculdade de Ciências de Orense, Universidade de Vigo. *International Dairy Journal* 16 (2006) 762–767.
- Güzel-Seydim Z, Seydim A, Greene A, Bodine A. 1999. *Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation*. Universidade de Clemson. *Journal of Food Composition and Analysis* 13(2000) 35-43.
- Harta O, Iconomopoulou M, Bekatorou A, Nigam P, Kontominas M, Koutinas A. 2003. *Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter*. Universidade de Patras e Universidade de Ioannina, Grécia, Universidade de Ulster, Reino Unido. *Food Chemistry* 88 (2004) 237–242.

- Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibáñez F. 2004. *Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage*. Universidade Pública de Navarra, Campus de Arrosad. *Food Chemistry* 90 (2005) 613–620.
- Kuskoski E, Asuero A, Morales M, Fett R. 2005. *Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianina*. Faculdade de Farmácia, Universidade de Sevilha e Universidade Federal de Santa Catarina. *Ciência Rural* (2006), v.36, n.4.
- Lönnerdal B. 1997. *Effects of Milk and Milk Components on Calcium, Magnesium, and Trace Element Absorption During Infancy*. Departamento de Nutrição, Universidade da California, Davis, USA. *Physiol Rev* (Julho 1997) 643-69.
- Mainville I, Robert N, Lee B, Farnworth E. 2005. *Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir*. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Alimentos, *Agriculture and Agri-Food Canada*. *Systematic and Applied Microbiology* 29 (2006) 59–68.
- Mattar R, Mazo D. 2010. *Intolerância à Lactose: Mudança de Paradigmas com a Biologia Molecular*. Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Ver Assoc Med Bras* 2010. 56(2):230:6.
- Ministério da Agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas. Gabinete de planeamento e políticas. Rastreabilidade - Instrumento de gestão do risco.
- NP EN ISO 22000:2005. *Sistemas de gestão da segurança alimentar. Requisitos para qualquer organização que opere na cadeia alimentar*. Setembro 2005. Instituto Português da Qualidade.
- Piermaria J, Pinotti A, Garcia M, Abraham A. 2007. *Films based on kefir, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization*. Faculdade de Ciências Exatas, Argentina. *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 684–690.
- Plessas S, Alexopoulos A, Voidarou C, Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. 2010. *Microbial ecology and quality assurance in food fermentation systems. The case of kefir grains application*. Faculdade de Desenvolvimento da Agricultura, Grécia. *Molecular Biology, Genetics and Biotechnology, Anaerobe* (2011) 1-3.
- Poças M, Moreira R. 2003. *Segurança Alimentar e Embalagem*. pp. 27

Regulamento (CE) N.º 852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004, relativo à higiene dos géneros alimentícios.

Santiago J. 2005. *Higiene, Segurança e Qualidade Alimentar, Receção da Matéria Prima*. Manual de Boas Práticas nas IPSS.

Semih e Cagindi. 2003. *Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects*. Pakistan. Journal of Nutrition 2 (2): 54-59.

SPG – Sociedade Portuguesa de Gastrenterologia, Jornal Português de Gastrenterologia

Terra F. 2007. *Teor de Lactose em Leites Fermentados por Grãos de Kefir*. Universidade de Brasília.

Veiga, A. 2008. Perigos Biológicos Associados a alguns Grupos de Alimentos Consumidos em Portugal.

Weschenfelder S. 2009. Caracterização de kefir tradicional quanto á composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-Escherichia coli. Porto Alegre.

Witthuhn R, Schoeman T, Britz T. 2004. *Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation*. Universidade de Stellenbosch, África do Sul. *International Dairy Journal* 15 (2005) 383–389.

Zajšek K, Goršek A. 2009. *Mathematical modelling of ethanol production by mixed kefir grains yeast population as a function of temperature variations*. Universidade de Maribor, Faculdade de Química e Engenharia Química, Eslovénia. *Biochemical Engineering Journal* 49 (2010) 7–12.

Zajšek K, Goršek A. 2009. *Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora*. Universidade de Maribor, Faculdade de Química e Engenharia Química, Eslovénia. *Food and Bioproducts Processing* 88 (2010) 55–60

Zar JH. 2010. NJ: Pearson Prentice-Hall. Upper Saddle River. 2010. vol. 5th Edition.

8. Anexos

8.1 Anexo 1 - Metodologia

8.1.1 Preparação das amostras



Figura 8.1.1 - Grãos de kefir antes de divididos pelos frascos.



Figura 8.1.2 - Grãos de kefir e leite, durante a fermentação.

8.1.2 Determinação do pH



Figura 8.1.3 - Potenciômetro utilizado para a determinação do pH (Crison, pH-meter basic 20).

8.1.3 Determinação do teor de matéria gorda



Figura 8.1.4 - Estufa utilizada em várias determinações (Binder).



Figura 8.1.5 - Exsiccador com balões a arrefecer.

8.1.4 Determinação do Teor de Proteína Bruta



Figura 8.1.6 - Destilador (Foss, Kjeltec TM 2100).



Figura 8.1.7- Antes da destilação (à esquerda) e após a destilação (à direita).

8.1.5 Determinação do Teor de Lactose



Figura 8.1.8 - Placa de aquecimento (Velp).

8.1.6 Determinação do Teor de Açúcares Totais



Figura 8.1.9 - Banho utilizado para esta e outras determinações (Julabo).



Figura 8.1.10 - Determinação da Proteína Bruta.

8.1.7 Determinação da Cinza Total



Figura 8.1.11 - Bico de Bunsen.

8.1.8 Determinação dos Ácidos Gordos



Figura 8.1.12 – Centrifuga (Eppendorf).



Figura 8.1.13 - Cromatografo Gasoso Capilar (Finnigan TRACE GC Ultra)

8.1.9 Análise Sensorial



Figuras 8.1.14, 8.1.15 e 8.1.16 - Preparação do kefir com frutos vermelhos.





Figura 8.1.17 - Tabuleiro distribuído a cada provador. O copo da esquerda contém o batido de kefir com frutos vermelhos, o copo do centro contém água e o copo da direita contém o iogurte comercial de frutos vermelhos.

8.2 Anexo 2 – Determinação da Acidez

ORIGINAL

CDU 637.123:541.132.3

NORMA PORTUGUESA	LEITES Determinação da acidez	NP-470 1983
Laits. Détermination de l'acidité.		
<p>1 - OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO</p> <p>A presente Norma destina-se a fixar o processo para determinar a acidez do leite e dos leites compostos, assim como dos leites de cabra e de ovelha.</p> <p>2 - REFERÊNCIAS</p> <p>NP-402 - Leite. Colheita das amostras. NP-403 - Leite. Preparação das amostras para análise.</p> <p>3 - DEFINIÇÃO</p> <p>Entende-se por acidez dum leite o volume de solução alcalina normal, expresso em centímetros cúbicos, necessário para neutralizar 1 dm³ de leite.</p> <p>4 - RESUMO DO PROCESSO</p> <p>Neutralização dos ácidos livres contidos no leite, por solução alcalina titulada.</p> <p>5 - REAGENTES</p> <p>A água utilizada deve ser destilada ou desmineralizada, isenta de dióxido de carbono por ebulição durante 10 minutos e arrefecida, tapada, antes da sua utilização.</p> <p>5.1 - Solução alcoólica de fenolftaleína a 0,2g em 100cm³ de álcool etílico a 95% (V/V) previamente neutralizado.</p> <p>5.2 - Solução de hidróxido de sódio 0,1N.</p>		
DR, IIIª Serie, Nº 236 de 1983-10-13	 INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA SERVIÇOS DE DOCUMENTAÇÃO	 (Continua)
REPRODUÇÃO PROIBIDA		CT-32

DIRECÇÃO - GERAL DA QUALIDADE (DGO) - Rua José Estêvão, 83-A - 1199 Lisboa Codex

0,2129g
4,0984g

Edição Dez. 1983

6 - APARELHOS E UTENSÍLIOS

6.1 - Agitador magnético.

6.2 - Bureta de precisão graduada em décimos de centímetro cúbico.

6.3 - Copo de precipitação de 50cm³ (NP-183).

6.4 - Frasco de Erlenmeyer de 100cm³ (NP-183).

6.5 - Pipetas de precisão de 10cm³ (NP-183).

6.6 - Potenciômetro com eléctrodo de vidro e um eléctrodo de referência apropriado calibrado por meio de soluções tampão de pH 6 e pH 9 com precisão de $\pm 0,01$.

7 - COLHEITA DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-402.

8 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-403.

9 - TÉCNICA

9.1 - DETERMINAÇÃO

9.1.1 - Para o frasco de Erlenmeyer, mede-se com a pipeta de precisão 10cm³ de leite. Adicionam-se seis gotas da solução alcoólica de fenolftaleína e titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N, contida na bureta de precisão até viragem do indicador.

9.1.2 - No caso de dificuldade de observação da viragem do indicador, procede-se do seguinte modo:

Mede-se com pipeta de precisão 20cm³ de leite para o copo de precipitação. Introduzem-se os eléctrodos do potenciômetro no leite e titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,1N, contida na bureta de precisão, até que o pH medido pelo potenciômetro atinja o valor de 8,3. Durante a titulação, o leite deve ser agitado constantemente por meio de agitador magnético.

(Continua)

NP-470, p. 3 de 3

10 - RESULTADOS

10.1 - CÁLCULO

Sendo:

V o volume, expresso em centímetros cúbicos, da solução de hidróxido de sódio 0,1N, gasto na titulação,

a acidez do leite, expressa em centímetros cúbicos de solução alcalina normal por decímetro cúbico, é:

10.1.1 - Segundo a técnica descrita em 9.1.1 - $10 V$

10.1.2 - Segundo a técnica descrita em 9.1.2 - $5 V$

10.2 - APRESENTAÇÃO

Os resultados apresentam-se com aproximação às unidades.

11 - BIBLIOGRAFIA

ISO 6091- 1980 - Lait sec. Détermination d'acidité titrable. (Méthode de référence).

DIRECÇÃO-GERAL DA QUALIDADE (DGG) - Rua José Estevão, 88-A - 1199 Lisboa Codex



8.3 Anexo 3 – Determinação do Teor de Matéria Gorda

NORMA PORTUGUESA

NP 468

1990

Leites

Determinação do teor da matéria gorda. Técnica de Röse-Gottlieb. Processo de referência

Laits

Détermination de la teneur en matière grasse. Technique de Röse-Gottlieb. Méthode de référence

Milks

Determination of fat content. Röse-Gottlieb method. Reference method

CDU

637.1:543.2

Descritores

Leite; ensaios; determinação do teor de gordura; método de Röse-Gottlieb; definições; especificações do processo; reagentes em solução; equipamento de laboratório

Correspondência

ISO 1211 (1984), harmonizada

Homologação

Diário da República, III Série, N.º 260, de 1990-11-10

Elaborado por

CT32 (IPQ)

Edição

Janeiro de 1991

© IPQ reprodução proibida

Instituto Português da Qualidade

Rua C 3 Avenida dos Três Vales
2825 MONTE DA CAPARICA
Tel: (01) 29481100
Fax: (01) 29481101

22

NP 468

1990

p. 3 de 10

1. Objectivo e campo de aplicação

A presente Norma destina-se a fixar o processo de referência para determinar o teor de matéria gorda do leite gordo, parcialmente desnatado e desnatado assim como dos leites de cabra e ovelha homogeneizados ou não, e do leite composto.

2. Referências

NP 402

Leite. Colheita das amostras

NP 403

Leites. Preparação das amostras para análise

3. Definição

Para os fins da presente Norma, entende-se por matéria gorda, o conjunto das substâncias extraídas por solventes orgânicos e determinadas ponderalmente segundo a técnica de Röse-Gottlieb.

4. Resumo do processo

Extracção da matéria gorda por solventes apropriados, evaporação dos solventes e pesagem do resíduo obtido.

5. Reagentes

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica. A água utilizada deve ser destilada ou de pureza equivalente.

5.1. Álcool etílico a 96 ± 2 % (V/V)

5.2. Éter etílico, isento de peróxidos e de resíduo

NOTA 1: Verifica-se se o éter etílico contém peróxidos, adicionando a 10 cm³ de éter etílico, contido numa pequena proveta munida de rolha de vidro e previamente limpa com um pouco deste solvente, 1 cm³ de uma solução a 10 % (m/V) de iodeto de potássio preparada recentemente. Agita-se e deixa-se em repouso durante 1 min. Não deve aparecer coloração amarela em qualquer das duas camadas.

NOTA 2: O éter etílico pode tornar-se e manter-se isento de peróxidos por adição de folhas de zinco previamente imersas durante 1 min numa solução contendo 10 g de sulfato de cobre (Cu SO₄ 5H₂ O) e 2 cm³ de ácido sulfúrico por dm³ e depois lavadas com água. Para 1 dm³ de éter adiciona-se uma folha de zinco com cerca de 80 cm², cortada em tiras suficientemente longas para atingir, pelo menos, metade da altura do recipiente.

O éter etílico só deverá ser utilizado pelo menos três dias após a adição da folha de zinco tratada.

5.3. Éter de petróleo, isento de resíduo, com ponto de ebulição entre 30 e 60° C.

5.4. Hidróxido de amónio a 25 % (m/m) ($\rho_{20} = 0,910$ g/cm³).

5.5. Mistura em partes iguais de éter etílico (5.2) e de éter de petróleo (5.3), preparada pouco tempo antes da utilização.

5.6. Solução de vermelho «Congo» a 1 % (m/V).

6. Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório e nomeadamente:

6.1. Aparelho de extracção, tipo Mojonier, munido de rolha de vidro esmerilhado, de cortiça de boa qualidade ou de outros dispositivos de vedação inalteráveis

23

NP 468

1990

p. 4 de 10

pelos solventes utilizados (fig. 1).

NOTA: As rolhas de cortiça devem ser tratadas pelo éter etílico, depois pelo éter de petróleo e em seguida imersas em água, no mínimo a 60° C, pelo menos durante 20 min. Deixam-se permanecer na água durante o arrefecimento para que estejam saturadas no momento da utilização.

6.2. Balança sensível a 0,0001 g.

6.3. Balão de fundo plano e colo esmerilado de 250 cm³.

6.4. Banho de água com aquecimento eléctrico e termóstato regulável para 60 a 70° C.

6.5. Centrífuga de motor anti-deflagrante, regulável para 500 a 600 r.p.m.

6.6. Estufa de secagem, regulável para 102 ± 2° C.

6.7. Provetas de 5, 10 e 25 cm³ graduadas em centímetros cúbicos.

7. Colheita das amostras

Veja-se a NP 402

8. Preparação da amostra

Veja-se a NP 403

9. Técnica

9.1. Ensaio em branco

Efectua-se, em paralelo com a determinação, um ensaio em branco com 10 cm³ de água, utilizando o mesmo tipo de aparelho de extracção, os mesmos reagentes, nas mesmas proporções e o mesmo modo operativo (9.2).

Se o resultado do ensaio em branco for superior a 0,5 mg, os reagentes devem ser verificados.

9.2. Determinação

Pesa-se directa ou indirectamente, com aproximação ao 0,001 g, para o aparelho de extracção (6.1), uma toma de 10 cm³ de leite. Adiciona-se 2 cm³ de hidróxido de amónio e mistura-se. Adiciona-se 10 cm³ de álcool etílico, rolha-se e mistura-se com cuidado.

Adiciona-se 25 cm³ de éter etílico, rolha-se o aparelho de extracção com rolha molhada e agita-se energeticamente durante 1 min, invertendo-o várias vezes.

Arrefece-se, se necessário, sob água corrente para evitar a formação de emulsões.

Retira-se a rolha com cuidado, adiciona-se 25 cm³ de éter de petróleo, utilizando os primeiros cm³ para lavar a rolha e o interior do colo do aparelho. Rolha-se e agita-se suavemente durante 30 s, invertendo o tubo.

Deixa-se em repouso até separação nítida das camadas etérea e aquosa ¹⁾.

Pode acelerar-se a separação perfeita dos líquidos utilizando a centrífuga.

Retira-se a rolha do aparelho e lava-se com alguns cm³ da mistura de solventes.

Transfere-se a camada superior para o balão de 250 cm³ previamente seco em estufa e tarado depois de arrefecido.

Adiciona-se 5 cm³ de álcool etílico ao conteúdo do aparelho e procede-se a mais

¹⁾ Para facilitar a visibilidade da linha de separação entre as camadas etérea e aquosa pode adicionar-se duas gotas de uma solução de vermelho «Congo» (5.6) ou de outro corante hidrossolúvel que não altere os resultados.

24

NP 468

1990

p. 5 de 10

duas extracções como anteriormente mas usando apenas 15 cm³ de éter etílico e 15 cm³ de éter de petróleo. No caso de leite magro não é necessário efectuar a terceira extracção.

Destila-se a maior parte da mistura etérea, evapora-se a restante em banho de água e seca-se em estufa por períodos sucessivos de uma hora até que duas pesagens sucessivas não difiram mais de 0,5 mg ou haja ligeiro aumento de massa.

Neste último caso considera-se nos cálculos o valor da pesagem a que corresponde a menor massa.

Adiciona-se 15 a 20 cm³ de éter de petróleo para verificar se a matéria extraída é totalmente solúvel. Para isso aquece-se ligeiramente o balão e agita-se com cuidado. Se a matéria extraída não for totalmente solúvel no éter de petróleo, extrai-se completamente a matéria gorda contida no balão por sucessivas lavagens com éter de petróleo quente, deixando depositar a matéria não solúvel antes de cada decantação.

Repete-se três vezes esta operação utilizando o éter de petróleo para lavar o interior do colo do balão. Lava-se em seguida o exterior do colo do balão com a mistura de solventes. Seca-se o balão, por períodos sucessivos de uma hora, em estufa, até que duas pesagens sucessivas não difiram mais de 0,5 mg ou haja ligeiro aumento de massa. Neste último caso considera-se nos cálculos o valor de pesagem a que corresponde a menor massa.

10. Resultados

10.1. Cálculo

Sendo:

A o balão que contém as extracções da matéria gorda;
B o balão utilizado no ensaio em branco;
m₀ a massa, em gramas, da toma de leite;
m₁ a massa, em gramas, do balão A e da matéria extraída, após secagem;
m₂ a massa, em gramas, do balão A após secagem, ou, em caso de matérias não solúveis, do balão A e das matérias não solúveis, após secagem;
m₃ a massa, em gramas, do balão B e de alguma matéria extraída, após secagem;
m₄ a massa, em gramas, do balão B, após secagem ou, em caso de matérias não solúveis, do balão B e das matérias não solúveis, após secagem,
o teor de matéria gorda, expresso em percentagem em massa, do leite é:

$$\frac{(m_1 - m_2) - (m_3 - m_4)}{m_0} \times 100$$

Toma-se como resultado a média aritmética de duas determinações sobre a mesma amostra que obedecem às condições de repetibilidade (10.3).

10.2. Apresentação

Os resultados apresentam-se com aproximação às centésimas.

10.3. Repetibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente sobre a mesma amostra e pelo mesmo analista não deve exceder os valores seguintes:
- para o leite com o teor de matéria gorda superior ou igual a 0,5 % (m/m): 0,02 g de matéria gorda por 100 g de produto.

25

NP 468

1990

p. 6 de 10

- para o leite com o teor de matéria gorda inferior a 0,5% (m/m): 0,01 g de matéria gorda por 100 g de produto.

10.4. Reprodutibilidade

A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas em dois laboratórios diferentes, sobre a mesma amostra, não deve exceder os valores seguintes:

- para o leite com o teor de matéria gorda superior a 0,3% (m/m): 0,04 g de matéria gorda por 100 g de produto.

- para o leite com o teor de matéria gorda inferior a 0,3% (m/m): 0,02 g de matéria gorda por 100 g de produto.

11. Referência à normalização internacional

Esta Norma baseia-se na Norma Internacional ISO 1211 (1984) «Lait. Détermination de la teneur en matière grasse. Méthode gravimétrique (Méthode de référence)», à qual é equivalente.

26

8.4 Anexo 4 – Determinação do Teor de Proteína Bruta

NORMA PORTUGUESA		12/10/2010 NP 1986 1991
Leites Determinação do teor de proteína bruta. Técnica de Kjeldahl		
Laits Détermination de la teneur en protéine brute. Technique de Kjeldahl		
Milks Determination of protein content. Kjeldahl technique		
CDU 637.127:543		
Descritores Leite; determinação de teores; proteínas; método de Kjeldahl; especificação do processo		
Correspondência		
Homologação Diário da República, III Série, N.º 142, de 1991-06-24		
Elaborado por CT32 (IQA)		Edição Novembro de 1991
		© IPQ reprodução proibida
Instituto Português da Qualidade		Rua CA Avenida dos Três Vales 2825 MONTE DA CAPARICA Tel: (01) 294 81 00 Fax: (01) 294 81 01

1. Objectivo e campo de aplicação

A presente Norma destina-se a fixar o método para o cálculo do teor de proteína bruta dos leites em natureza, de vaca, ovelha e cabra, inteiros, parcialmente desnatados e desnatados a partir do seu teor de azoto determinado segundo a técnica de Kjeldahl.

2. Referência

NP 402(1966)

Leite. Colheita das amostras.

3. Definição

Para os fins da presente Norma entende-se por teor de proteína bruta o resultado que se obtém multiplicando pelo factor 6,38 o teor de azoto, doseado segundo a técnica de Kjeldahl¹⁾.

4. Resumo do processo

Mineralização do azoto pelo ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalisador; alcalinização dos produtos da reacção; destilação e titulação do amoníaco libertado para obtenção do teor de azoto. Cálculo da proteína bruta multiplicando o teor de azoto pelo factor 6,38.

5. Reagentes

Todos os reagentes devem ser pró-análise.

A água utilizada deve ser destilada ou de pureza equivalente.

5.1. Ácido sulfúrico ($\rho_{20} = 1,84 \text{ g/cm}^3$).

5.2. Mistura catalisadora:

Sulfato de cobre ($\text{Cu SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) - 3 g

Óxido de titânio - 3 g

Ácido esteárico - 1 g

Sulfato de potássio - 93 g

5.3. Papel vermelho de tornesol.

5.4. Sacarose isenta de azoto.

5.5. Triptofano, fenacetina, cloreto ou dicloreto de lisina.

5.6. Solução de ácido bórico, a 4% (m/V).

(A dissolução do ácido bórico deve ser feita com água quente.)

5.7. Solução de ácido clorídrico 0,1 N, ou de ácido sulfúrico 0,1 N.

5.8. Solução de hidróxido de sódio a 47% (m/m) - 704 g NaOH/dm³ ou uma solução menos concentrada, por exemplo: 40% (m/m) - 572 g NaOH/dm³ ou 30% (m/m) - 399 g NaOH/dm³.

5.9. Solução de indicador do pH

Dissolver 0,01 g de vermelho de metilo, 0,02 g de azul de bromotimol e 0,06 g de verde de bromocresol em 100 cm³ de álcool etílico a 95% (V/V).

A solução deve conservar-se em frasco escuro e lugar fresco.

Ácido bórico = 4,0343 g.

¹⁾ Esta técnica pode ser executada em equipamento semiautomático.

NP 1986

1991

p. 4 de 6

6. Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório, nomeadamente:

- 6.1.** Aparelho de destilação por vapor ou aparelho de destilação corrente em vidro borossilicatado com adaptação perfeitamente estanque para balões de Kjeldahl e refrigerante.
- 6.2.** Balança sensível ao décimo de miligrama.
- 6.3.** Balões de Kjeldahl, de 500 a 800 cm³ de capacidade, munidos, se necessário, de uma rolha de vidro piriforme adaptada ao colo ou simples funil de vidro.
- 6.4.** Banho de água, regulável para 30-40° C.
- 6.5.** Bureta, de 50 cm³ graduada em décimos.
- 6.6.** Dispositivo de aquecimento uniforme, no qual os balões de Kjeldahl possam ser aquecidos em posição inclinada (aproximadamente 45°), que não aqueça os balões acima do nível do seu conteúdo e munido de dispositivo colectador de vapores.
- 6.7.** Frascos de Erlenmeyer, de 200 cm³.
- 6.8.** Potenciómetro.
- 6.9.** Provetas, de 50 cm³ e de 200 cm³, graduadas em décimos.
- 6.10.** Regularizador de ebulição, como, por exemplo, pequenos pedaços de porcelana, pedra-pomes, pérolas de vidro ou outros apropriados.

7. Colheita da amostra

Veja-se a NP 402.

8. Preparação da amostra

Aquece-se a amostra a $20 \pm 2^\circ \text{C}$ e agita-se cuidadosamente. Se não se obtiver uma dispersão homogénea da matéria gorda, aquece-se lentamente a amostra a 40°C , agita-se suavemente e arrefece-se a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

9. Técnica

9.1. Determinação

Devem efectuar-se duas determinações paralelas.

9.1.1. Mineralização

Introduzem-se em balão de Kjeldahl o regularizador de ebulição, 5 g da mistura catalisadora e 5 g de leite, pesados com a precisão de $\pm 0,001 \text{ g}$. Adicionam-se em seguida, cuidadosamente, 25 cm³ de ácido sulfúrico concentrado ou 30 cm³ no caso de leites com teor de matéria gorda maior que 5% (m/m). Mistura-se suavemente e coloca-se o balão em posição inclinada sobre o dispositivo de aquecimento. De início aquece-se moderadamente de modo que os fumos negros não atinjam o colo do balão.

Após o aparecimento de abundantes fumos brancos, aquece-se fortemente, agitando de vez em quando, até que o líquido esteja completamente límpido.

Prolonga-se a ebulição, mas moderada, durante pelo menos 1h 30 min.

Deve ter-se em atenção o seguinte:

- a) o tempo necessário para que o conteúdo do balão fique completamente límpido não deve ultrapassar 1 h. O tempo de mineralização total não deve ser inferior a 2 h 30 min. Se for necessário mais de 1 h para a obtenção de limpidez, o tempo total de mineralização deve incluir esse acréscimo;

b) Se o volume residual de ácido sulfúrico for menor que 15 cm^3 (aproximadamente) no final da mineralização, pode ter havido perda de azoto devido a sobreaquecimento. Para o evitar pode recorrer-se à colocação de anéis metálicos na parte inferior do balão, de modo que o foco calorífico apenas contacte a zona do balão abaixo do nível do conteúdo líquido.

9.1.2. Destilação

Deixa-se arrefecer o conteúdo do balão à temperatura ambiente e adicionam-se 300 cm^3 de água, lavando cuidadosamente o colo do balão. Mistura-se o conteúdo, cuidadosamente, assegurando a dissolução total dos cristais entretanto formados. Deixa-se arrefecer. Para um frasco de Erlenmeyer medem-se, por proveta, 50 cm^3 de solução de ácido bórico, juntam-se 4 gotas de solução do indicador, misturam-se e coloca-se o balão sob o refrigerante do aparelho de destilação, de tal maneira que a extremidade da alonga mergulhe na solução de ácido bórico. Medem-se por proveta 80 cm^3 de soda cáustica para o balão de Kjeldahl, mantendo durante esta operação o balão inclinado, de tal maneira que a soda escorra ao longo da parede e os líquidos não se misturem. O volume total de água e hidróxido de sódio deve ser 370 cm^3 , de modo a permitir a recolha de aproximadamente 150 cm^3 do destilado antes do

início da fervura irregular. Por exemplo se são adicionados 85 cm^3 de hidróxido de sódio a 40% (m/m) ou 125 cm^3 de hidróxido de sódio a 30% (m/m), o volume de água adicionado deve ser aproximadamente de 285 cm^3 ou 245 cm^3 de modo que o volume final não exceda $2/3$ da capacidade total do balão. Liga-se imediatamente o balão de Kjeldahl ao refrigerante e aquece-se até à ebulição, evitando a formação de espuma. Regula-se depois o aquecimento de tal maneira que a ebulição dure, pelo menos, 30 min. Quando já foram recolhidos 100 a 125 cm^3 do destilado, baixa-se o balão de Erlenmeyer até que a extremidade da alonga esteja aproximadamente 40 mm acima da marca de 200 cm^3 . Continua-se a destilação até ao início da fervura irregular.

A destilação do amoníaco terminará quando o papel vermelho de tornesol humedecido com água mude de cor com o líquido proveniente da extremidade da alonga.

Pára-se então imediatamente o aquecimento.

Se a destilação se considera incompleta, efectua-se nova determinação. Se está completa, desliga-se o aquecimento e lava-se a extremidade da alonga e as suas paredes interiores com água, recebendo os líquidos de lavagem no balão de recolha do destilado. Este ensaio deve efectuar-se em ambiente isento de amoníaco.

Titula-se o destilado com solução de ácido 0,1 N (5,7.) até que o pH seja $4,6 \pm 0,1$ medido por potenciômetro.

9.2. Ensaio em branco

Efectua-se um ensaio em branco, utilizando 5 cm^3 de água destilada em vez de leite e procedendo-se como em 9.1.

9.3. Ensaio de controlo

Deve testar-se periodicamente a fiabilidade da técnica do seguinte modo:

Para a mineralização, usam-se 0,20 g de triptofano, 0,35 g de fenacetina ou 0,20 g de cloreto de lisina.

Devem recuperar-se pelo menos 98 a 99% de azoto.

Para a destilação, usam-se 0,15 g de oxalato ou sulfato de amónio juntamente com 0,1 g de sacarose.

Devem recuperar-se entre 99 a 100% de azoto.

NP 1986

1991

p. 6 de 6

Resultados diferentes indicam falhas na técnica e/ou concentração imprecisa da solução de ácido (5.7.).

10. Resultados

10.1 Cálculo

Sendo:

V_1 o volume, em centímetros cúbicos, da solução de ácido 0,1 N (5.7.) gasto na titulação do ensaio com leite;

V_0 o volume, em centímetros cúbicos, da solução de ácido 0,1 N (5.7.) gasto no ensaio em branco;

m a massa, em gramas, da toma do leite,

o teor de azoto total do leite, expresso em percentagem, é:

$$\frac{0,14 \times (V_1 - V_0)}{m}$$

O teor de proteína bruta obtém-se multiplicando a percentagem de azoto pelo factor 6,38.

10.2. Apresentação

Os resultados apresentam-se com aproximação às milésimas para o azoto e com aproximação às centésimas para a proteína bruta.

10.3. Repetibilidade

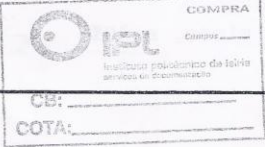

A diferença entre os resultados de duas determinações paralelas, efectuadas pelo mesmo analista, não deve exceder 0,007 g de azoto por 100 g de leite.

11. Bibliografia

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists - 14ª edição, Washington, William Horwitz, 1984.

ISO 1871(1975) Agricultural food products. General directions for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method.

8.5 Anexo 5 – Determinação do Teor de Lactose

CDU 637.143		ORIGINAL
NORMA PORTUGUESA	LEITES E LEITES EM PÓ Determinação do teor de lactose	NP - 675 1986
Laits et laits secs. Détermination de la teneur en lactose		
<p>1 - OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO</p> <p>A presente Norma destina-se a fixar o processo para determinar a lactose do leite, do leite em pó, do leite de ovelha e de cabra e do leite de ovelha e de cabra, em pó.</p> <p>2 - REFERÊNCIAS</p> <p>NP- 402 - Leite. Colheita de amostras NP- 403 - Leite. Preparação das amostras para análise NP-1085 - Leite em pó. Colheita de amostras.</p> <p>3 - DEFINIÇÃO</p> <p>Entende-se por teor de lactose de um leite ou de um leite em pó a massa, expressa em percentagem (m/m), das substâncias doseadas segundo o método a seguir descrito.</p> <p>4 - RESUMO DO PROCESSO</p> <p>Diluição em água de uma determinada massa de leite ou de um determinado volume de leite em pó reconstituído, seguida de defecação e determinação dos açúcares redutores pelo método gravimétrico, segundo o processo de Munson e Walker. Os resultados exprimem-se em lactose hidratada.</p> <p>5 - REAGENTES</p> <p>Todos os reagentes utilizados devem ser pró-análise.</p> <p>A água utilizada deve ser destilada ou de pureza equivalente.</p>		
DIRECÇÃO-GERAL DA QUALIDADE (DGG) Rua José Estêvão, 83-A • 1199 Lisboa Codex	 <p>COMPRÁ Valor: _____ CB: _____ COTA: _____</p>	 <p>CT 32</p>
DR III Série nº 123. de 1986 - 05 - 30	REPRODUÇÃO PROIBIDA	Edição Jun. 1986

NP-675, p. 2 de 8

5.1 - **Álcool etílico a 95% (V/V).** 140cmL

→ 5.2 - **Éter etílico isento de peróxidos e de resíduo.** (H₂) 140cmL

NOTAS:

1 - Verifica-se se o éter etílico contém peróxidos, adicionando a 10cm³ do éter, contidos numa pequena proveta munida de uma toalha de vidro e previamente limpa com um pouco deste solvente, 1cm³ de uma solução a 10% de iodeto de potássio preparada recentemente. Agita-se e deixa-se em repouso durante 1 min. Não deve aparecer coloração amarela em qualquer das duas camadas.

2 - O éter etílico pode tornar-se e manter-se isento de peróxidos por adição de folhas de zinco húmidas, imersas previamente durante 1 min numa solução ácida diluída contendo 10g de sulfato de cobre (Cu SO₄.5H₂O e 2cm³ de ácido sulfúrico concentrado a 98% (m/m), por dm³, e lavadas depois com água. Para 1000cm³ de éter adiciona-se uma folha de cerca de 80cm² de superfície, cortada em tiras suficientemente longas para atingir, pelo menos, metade da altura do recipiente. O éter etílico só deverá ser utilizado pelo menos 3 dias após a adição da folha de zinco tratada.

→ 5.3 - **Papel sensibilizado pelo tornesol.**

5.4 - **Solução alcalina tartárica** 350 mL

Num balão graduado de 1000cm³ (6.3) dissolvem-se, em água destilada, 350g de sal de Seignett ou de Rochelle (C₄O₆H₄KNa.4H₂O) e 100g de hidróxido de sódio isento de carbonatos. Completa-se o volume com água destilada, deixa-se em repouso durante 2 dias em frasco rolhado e filtra-se.

5.5 - **Solução de sulfato de cobre** 350 mL

Num balão graduado de 1000cm³ dissolvem-se, em água destilada, 70g de sulfato de cobre cristalizado (Cu SO₄.5H₂O). Completa-se o volume e filtra-se, se necessário.

5.6 - **Solução de ferrocianeto de potássio, a 15%.** 35 mL

5.7 - **Solução de sulfato de zinco, a 30%.** 35 mL

6 - APARELHOS E UTENSÍLIOS

Material de uso corrente em laboratório e nomeadamente:

- 6.1 - Balança, sensível a 0,1mg.
- 6.2 - Balões de precisão de 100cm³ e 500cm³.
- 6.3 - Balões marcados de 1000cm³.
- 6.4 - Cadinhos de fundo filtrante, com cerca de 35cm³ de capacidade e uma porosidade de 5 a 8 μm.
- 6.5 - Cápsula de porcelana ou de vidro de 50cm³.
- 6.6 - Estufa de secagem regulável para a temperatura de 102±2°C.
- 6.7 - Exsiccador munido de substância exsicante recentemente activada, com indicador de humidade.
- 6.8 - Filtro de papel de porosidade média, com dimensão correspondente ao funil utilizado.
- 6.9 - Frasco de Kitassato com rolha furada para adaptação dos cadinhos de fundo filtrante.
- 6.10 - Pipetas de precisão de 25cm³.
- 6.11 - Trompa de água.

7 - COLHEITA DE AMOSTRAS

Vejam-se NP-402 e NP-1085.

8 - PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- 8.1 - LEITE E LEITES DE OVELHA E DE CABRA

Veja-se NP-403.

NP-675, p. 4 de 8

8.2 - LEITES EM PÓ

Transfere-se a amostra para um frasco de rolha esmerilhada, limpo e seco em estufa, de capacidade aproximadamente dupla do volume da amostra. Homogeneiza-se o conteúdo, agitando e invertendo o frasco depois de convenientemente rolhado.

9 - TÉCNICA

9.1 - PREPARAÇÃO DO CADINHO FILTRANTE

Lava-se o cadinho filtrante com ácido nítrico diluído, passa-se cuidadosamente com água quente até eliminar todo o ácido, depois com 10cm^3 de álcool (5.1) e finalmente com 10cm^3 de éter (5.2).

Seca-se em estufa a $102 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 30 min, arrefece-se em exsiccador e pesa-se.

9.2 - DEFECAÇÃO

Medem-se, com pipeta de precisão, 25cm^3 de leite (8.1) para uma cápsula de 50cm^3 seca e tarada, pesa-se e transfere-se para balão de precisão de 500cm^3 (6.2) lavando com 400cm^3 , aproximadamente, de água. Adicionam-se $2,5\text{cm}^3$ de solução de ferrocianeto de potássio (5.6) e $2,5\text{cm}^3$ de solução de sulfato de zinco (5.7). Perfaz-se o volume com água, agita-se e filtra-se.

Numa cápsula de 50cm^3 seca e tarada pesam-se 10g de leite em pó e transferem-se para balão de precisão de 100cm^3 , lavando com cerca de 80cm^3 de água. Preenche-se o volume com água, agita-se e medem-se, com pipeta de precisão, 25cm^3 de líquido para em balão de precisão de 500cm^3 . Adicionam-se cerca de 400cm^3 de água e ainda $2,5\text{cm}^3$ de solução de ferrocianeto de potássio (5.6) e $2,5\text{cm}^3$ de solução de sulfato de zinco (5.7). Perfaz-se o volume com água destilada, agita-se e filtra-se.

9.3 - DETERMINAÇÃO

Para copo de precipitação de 400cm^3 , medem-se por pipetas de precisão 25cm^3 de solução de sulfato de cobre (5.5), 25cm^3 de solução alcalina tartárica (5.4) e um volume V do filtrado obtido em 9.2, igual ou inferior a 50cm^3 , de modo que não haja subsequente redução de todo o cobre.

Coloca-se o copo coberto com vidro de relógio sobre rede metálica e aquece-se de modo que o líquido entre em ebulição decorridos 4 min, com tolerância de ± 5 s. A ebulição mantém-se durante 2 min.

Para o aquecimento, cuja duração total é, portanto, de 6 min \pm 5 s, não deve aumentar ou diminuir a intensidade do foco calorífico. Este deve ser regulado previamente procedendo a ensaios com copos de precipitação de 400cm³ contendo 100cm³ de água e tapados com vidros de relógio.

→ Pesas os cadinhos filtrantes

Terminada a ebulição, deixa-se repousar o precipitado e filtra-se o líquido ainda quente, com auxílio de trompa e frasco de Kitassato, através do cadinho de fundo filtrante preparado como se indica em 9.1. Lava-se o copo e o precipitado de óxido cupreo so com água aquecida a 60°C, em seguida com 10cm³ de álcool (5.1) e finalmente com 10cm³ de éter (5.2), ambos medidos por proveta.

Seca-se o cadinho em estufa a 102 \pm 2°C, durante 30 min, arrefece-se em exsiccador e pesa-se.

10 - RESULTADOS

10.1 - CÁLCULO

Sendo:

m a massa, em gramas, dos 25cm³ de leite (8.1);

V o volume, em centímetros cúbicos, do filtrado, medido para a determinação;

m₁ a massa, em miligramas, de lactose, que no quadro anexo corresponde à massa de óxido cuproso obtido na determinação,

o teor de lactose, expresso em percentagem, em lactose hidratada, é:

10.1.1 - Leite e leites de ovelha e de cabra

$$50 \times \frac{m_1}{V \times m}$$

NP-675, p. 6 de 8

10.1.2 - Leite em pó

$$200 \times \frac{m_1}{V \times m}$$

10.2 - APRESENTAÇÃO

Os resultados apresentam-se arredondados às décimas.

11 - BIBLIOGRAFIA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, **Official Methods of Analysis**, 13 th edition, Washington DC 20 044, 1980.

QUADRO

MASSAS EXPRESSAS EM MILIGRAMAS

Oxido cuproso- OCu_2	Lactose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{H}_2\text{O}$	Oxido cuproso- OCu_2	Lactose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{H}_2\text{O}$	Oxido cuproso- OCu_2	Lactose $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} + \text{H}_2\text{O}$
50	32.3	122	81.7	194	131.3
52	33.7	124	83.1	196	132.7
54	35.1	126	84.5	198	134.1
56	36.4	128	85.8	200	135.4
58	37.8	130	87.2	202	136.8
60	39.2	132	88.6	204	138.2
62	40.5	134	90.0	206	139.6
64	41.9	136	91.3	208	141.0
66	43.3	138	92.7	210	142.3
68	44.7	140	94.1	212	143.7
70	46.0	142	95.5	214	145.1
72	47.4	144	96.8	216	146.5
74	48.8	146	98.2	218	147.9
76	50.1	148	99.6	220	149.3
78	51.5	150	101.0	222	150.7
80	52.9	152	102.3	224	152.0
82	54.2	154	103.7	226	153.4
84	55.6	156	105.1	228	154.8
86	57.0	158	106.5	230	156.2
88	58.4	160	107.9	232	157.6
90	59.7	162	109.2	234	159.0
92	61.1	164	110.6	236	160.3
94	62.5	166	112.0	238	161.7
96	63.8	168	113.4	240	163.1
98	65.2	170	114.8	242	164.5
100	66.6	172	116.1	244	165.9
102	68.0	174	117.5	246	167.3
104	69.3	176	118.9	248	168.7
106	70.7	178	120.3	250	170.1
108	72.1	180	121.6	252	171.5
110	73.5	182	123.1	254	172.8
112	74.8	184	124.3	256	174.2
114	76.2	186	125.8	258	175.6
116	77.6	188	127.2	260	177.0
118	79.0	190	128.5	262	178.4
120	80.3	192	129.9	264	179.8

DIRECÇÃO-GERAL DA QUALIDADE (DGO) Rua José Estêvão, 83-A • 1199 Lisboa Codex



NP-675, p. 8 de 8

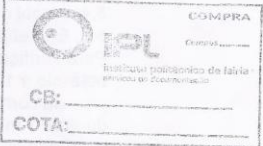

QUADRO (cont.)

MASSAS EXPRESSAS EM MILIGRAMAS

Oxido cuproso-OCu ₂	Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + H ₂ O	Oxido cuproso-OCu ₂	Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + H ₂ O	Oxido cuproso-OCu ₂	Lactose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ + H ₂ O
266	181.2	342	234.1	418	287.4
268	182.6	344	235.5	420	288.8
270	184.0	346	236.9	422	290.2
272	185.3	348	238.3	424	291.6
274	186.7	350	239.7	426	293.0
276	188.1	352	241.1	428	294.4
278	189.5	354	242.5	430	295.8
280	190.9	356	243.9	432	297.2
282	192.3	358	245.3	434	298.6
284	193.7	360	246.7	436	300.0
286	195.1	362	248.1	438	301.4
288	196.5	364	249.5	440	302.8
290	197.8	366	250.9	442	304.2
292	199.2	368	252.3	444	305.6
294	200.6	370	253.7	446	307.0
296	202.0	372	255.1	448	308.4
298	203.4	374	256.5	450	309.9
300	204.8	376	257.9	452	311.3
302	206.2	378	259.3	454	312.7
304	207.6	380	260.7	456	314.1
306	209.0	382	262.1	458	315.5
308	210.4	384	263.5	460	316.9
310	211.8	386	264.9	462	318.3
312	213.2	388	266.5	464	319.7
314	214.6	390	267.7	466	321.1
316	216.0	392	269.1	468	322.5
318	217.3	394	270.5	470	323.9
320	218.7	396	271.9	472	325.3
322	220.1	398	273.3	474	326.8
324	221.5	400	274.7	476	328.2
326	222.9	402	276.1	478	329.6
328	224.3	404	277.5	480	331.0
330	225.7	406	278.9	482	332.4
332	227.1	408	280.3	484	333.8
334	228.5	410	281.7	486	335.2
336	229.9	412	283.2	488	336.6
338	231.3	414	284.6	490	338.0
340	232.7	416	286.0		

DIRECÇÃO GERAL DA QUALIDADE (DGO) Rua José Estevão, 83-A • 1199 Lisboa Codex

8.6 Anexo 6 – Determinação do Teor de Açúcares Totais

<h1>NORMA PORTUGUESA</h1>	NP 704 1994	ORIGINAL
 iogurte e outros leites fermentados Determinação do teor de açúcares totais. Técnica de Munson e Walker		
Yogourt et autres laits fermentés Détermination des teneurs en sucres totaux. Technique de Munson et Walker		
Yogurt and other fermented milks Determination of total sugar content. Munson and Walker Technique		
 CDU 637.3		
Descritores Lacticínios; produtos alimentares; iogurte; determinação de teores; açúcar; definições; amostras para ensaio		
Correspondência		
Homologação Diário da República, III Série, nº 231, de 1994-10-06		
		
A presente Norma resultou da revisão da NP 704 (1984)		
Elaborado por CT32 (IPQ)		2ª Edição Janeiro de 1996
		
IPQ reprodução proibida		
Instituto Português da Qualidade Ministério da Indústria e Energia		Rua C à Avenida dos Três Vales 2825 MONTE DA CAPARICA Tel: (01) 294 81 00

NP 704

1994

p. 3 de 6

1. Objectivo e campo de aplicação

A presente Norma destina-se a fixar a técnica para determinar os açúcares totais do iogurte, do iogurte aromatizado e de outros leites fermentados aromatizados ou não.

2. Referências

NP 697

Iogurte. Colheita de amostras para análise.

NP 4146

Leite e produtos lácteos. Métodos de colheita de amostras.

3. Definições

Para os fins da presente Norma, entende-se por:

3.1. Açúcares redutores: os monossacarídeos, bem como alguns dissacarídeos e trissacarídeos, com grupos aldeídicos ou cetónicos activos que lhes dão poder redutor nas condições do método a seguir descrito.

3.2. Açúcares totais: o total de Açúcares redutores, expresso em açúcar invertido, após hidrólise nas condições da técnica a seguir descrita.

3.3. Açúcar invertido: mistura equimolecular de glucose e de frutose, resultante da hidrólise da sacarose.

4. Resumo do processo

Diluição em água de uma determinada massa de iogurte ou de iogurte aromatizado, de outros leites fermentados aromatizados ou não, seguida de defecação, inversão e determinação dos Açúcares redutores pelo método gravimétrico, segundo a técnica de Munson e Walker. A totalidade dos Açúcares assim determinada é expressa em percentagem (m/m) de açúcar invertido.

5. Reagentes

Água destilada, ou de pureza equivalente.

Todos os reagentes devem ser de qualidade analítica.

✓ 5.1. Ácido clorídrico ($\rho_{20}=1,125 \text{ g/cm}^3$) ou ($\rho_{20}=1,119 \text{ g/cm}^3$)

✓ 5.2. Ácido clorídrico diluído (1+9).

→ 5.3. Ácido nítrico diluído a 10% (V/V).

5.4. Álcool etílico a 95 + 2% (V/V).

5.5. Éter etílico isento de peróxidos e de resíduo

Para verificar se o éter etílico contém peróxidos, adiciona-se 1 cm^3 de uma solução de iodeto de potássio a 10% (m/V), de preparação recente, a 10 cm^3 de éter etílico contido numa pequena proveta com rolha de vidro, previamente passada por éter etílico. Agita-se e deixa-se em repouso durante 1 min, não devendo aparecer coloração amarela em qualquer das duas camadas, decorrido aquele tempo.

O éter etílico pode tomar-se e manter-se isento de peróxidos por adição de uma folha de zinco, previamente imersa durante 1 min numa solução contendo 10g de sulfato de cobre ($\text{Cu So}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 2 cm^3 de ácido sulfúrico concentrado [98% (m/m)] por dm^3 e depois lavada em água. Para 1 dm^3 de éter, adiciona-se uma folha com cerca de 80 cm^2 de superfície, cortada em tiras suficientemente longas para atingir, pelo menos, metade da altura do recipiente. O éter etílico só deverá ser utilizado pelo menos três dias após a adição da folha de zinco tratada.

5.6. Soluções de Carrez

✓ 5.6.1. Solução I - Dissolvem-se 10,6 g de ferrocianeto de potássio [$\text{K}_4 \text{ Fe (CN)}_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] em água e dilui-se até 100 cm^3 .

✓ 5.6.2. Solução II - Dissolvem-se 21,9 g de acetato de zinco, [$\text{Zn (CH}_3 \text{ COO)}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] em água, adicionam-se 3 cm^3 de ácido acético glacial e dilui-se até 100 cm^3 .

✓ 5.7. Solução de fenolftaleína a 0,1% (m/V) em etanol a 50% (V/V).

1/5/L

NP 704

1994

p. 4 de 6

5.8. Solução alcalina tartárica

Em balão de precisão de 1000 cm³, dissolvem-se em água 350 g de tartarato duplo de sódio e potássio [KNa C₄O₆·4H₂O] e 100 g de hidróxido de sódio isento de carbonatos. Completa-se o volume e deixa-se em repouso dois dias, em frasco rolhado. Filtra-se.

5.9. Solução aquosa de sulfato de cobre (II)

Em balão de precisão de 1000 cm³, dissolvem-se em água 70 g de sulfato de cobre cristalizado (CuSO₄·5H₂O). Completa-se o volume e filtra-se, se necessário.

→5.10. Solução aquosa de hidróxido de sódio a 30% (m/V).

6. Aparelhos e utensílios

Material corrente de laboratório e nomeadamente:

- 6.1. Aparelho homogeneizador.
- 6.2. Balança sensível ao décimo de miligrama.
- 6.3. Balões de precisão, de 100, 200 e 1000 cm³
- 6.4. Banho de água com aquecimento eléctrico e termostato regulável para temperaturas de 69 ± 1°C.
- 6.5. Cadinhos de fundo filtrante G4 ou equivalente.
- 6.6. Conta-segundos.
- 6.7. Copos de precipitação de 400 cm³, de forma alta.
- 6.8. Estufa de secagem regulável para 101 ± 2°C.
- 6.9. Exsicador com substância excicante activada com indicador de humidade.
- 6.10. Foco calorífico: bico de Bunsen ou, de preferência, uma placa eléctrica.
- 6.11. Frasco de Kitasato, com rolha funda furada para adaptação dos cadinhos de fundo filtrante.
- 6.12. Pipetas de precisão de 25 e 50 cm³.
- 6.13. Provetas de 5 e 10 cm³, graduadas em décimos.
- 6.14. Trompa de água ou outro sistema de vácuo.
- 6.15. Vidros de relógio.

7. Colheita de amostras

Veja-se a NP 697 e NP 4146

8. Preparação das amostras

8.1. Iogurte e outros leites fermentados, naturais e aromatizados.

Em frasco de Erlenmeyer, agita-se a amostra até se obter mistura homogénea.

Se o produto se encontra espesso, mergulha-se o frasco, durante 20 min, em banho de água entre 30 e 35°C e, se contiver gordura separada, entre 38 e 40°C.

Retira-se o frasco do banho, enxuga-se e agita-se de novo.

8.2. Iogurte e outros leites fermentados aromatizados com pedaços de fruta.

Procede-se como em 8.1. até retirar o frasco do banho e homogeneiza-se (6.1.).

9. Técnica

9.1. Preparação do cadinho filtrante

Lava-se o cadinho filtrante com ácido nítrico (5.3.), passa-se cuidadosamente com água quente até eliminar todo o ácido e por último com 10 cm³ de álcool (5.4.). Seca-se em estufa (6.8.) durante 30 min, arrefece-se em excicador e pesa-se (m₀).

9.2. Defecação

Pesam-se, com precisão de 0,0001 g, cerca de 20 g de iogurte (m), que se transferem para um balão de precisão de 200 cm³, lavando com cerca de 50 cm³ de água.

Adicionam-se 12,5 cm³ de solução Carrez I e 12,5 cm³ de solução Carrez II. Agita-se. Deixa-se em repouso cerca de 20 min.

Perfaz-se o volume de 200 cm³ com água, agita-se e filtra-se.

→ Ligar banho 69/70°C
→ Trocar "água"
→ Trocar exsecador.

NP 704

1994

p. 5 de 6

9.3. Inversão

Para balão de precisão de 100 cm³, medem-se por pipeta de precisão, 50 cm³ do filtrado (9.2.) e 5 cm³ do ácido clorídrico ($\rho_{20}=1,125 \text{ g/cm}^3$) ou 3,5 cm³ de ácido clorídrico ($\rho_{20}=1,19 \text{ g/cm}^3$)

Agita-se e coloca-se em banho de água a 69 + 1°C durante, exactamente, 5 min. Retira-se do banho, arrefece-se de imediato e neutraliza-se com solução aquosa de hidróxido de sódio (5.10.) em presença da fenolftaleína (5.7.) *Diluir.*

Adiciona-se o ácido clorídrico (5.2.) até o meio ficar ligeiramente acidificado. Agita-se e perfaz-se o volume de 100 cm³ com água. Cada cm³ desta solução corresponde a 0,025 g da amostra.

9.4. Determinação

Para um copo de precipitação (6.7.) medem-se, por pipetas de precisão, 25 cm³ da solução de sulfato de cobre (5.9.), 25 cm³ da solução alcalina tartárica (5.8.) e um volume V da solução obtida em (9.3.), igual ou inferior a 50 cm³, de modo a que não haja subsequente redução de todo o cobre. Se necessário, adiciona-se a água de modo a que o volume total de líquido no copo seja 100 cm³.

Coloca-se o copo, coberto com um vidro de relógio, sobre o foco calorífico (6.10.) e aquece-se de modo a que o líquido entre em ebulição decorridos 4 min + 5s. A ebulição mantém-se durante 2 min.

Durante o tempo total do aquecimento (6 min + 5s), não se deve aumentar nem diminuir a intensidade do foco calorífico. Esta deve ser regulada previamente, procedendo a ensaios utilizando 100 cm³ de água.

Terminada a ebulição, deixa-se repousar o precipitado e filtra-se o líquido ainda quente, com o auxílio de vácuo (6.11. e 6.14.) através de um cadinho de fundo filtrante, preparado segundo (9.1.). Lava-se o copo e o precipitado de óxido cuproso com água aquecida a 60°C, arrastando completamente o precipitado para o cadinho. Em seguida, lava-se o precipitado com 10 cm³ de álcool (5.4.) e com 10 cm³ de éter (5.5.). Seca-se o cadinho em estufa (6.8.), durante 30 min, arrefece-se em exsecador e pesa-se (m_2). A massa de óxido cuproso (m_1) corresponde a $m_2 - m_0$.

10. Resultados

10.1. Cálculo

Sendo:

V o volume, em centímetros cúbicos, do filtrado medido após defecação e inversão (9.4.);

m_i a massa, em miligramas, de açúcar invertido que, no quadro, corresponde à massa m_1 , em miligramas de óxido cuproso obtido na determinação;

m a massa, em gramas, da toma para análise,

o teor de Açúcares totais, expresso em percentagem em massa, de açúcar invertido na massa de iogurte é calculado pela expressão:

$$40 \times \frac{m_i}{V \times m}$$

10.2. Apresentação

Os resultados apresentam-se arredondados às décimas.

11. Bibliografia

— Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 13th edition, Washington, 1990.

NP 704

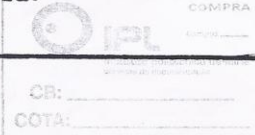

1994

p. 6 de 6

Quadro
Valores das massas m_1 e m_i , expressos em miligramas

Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido	Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido	Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido	Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido	Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido	Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido	Óxido cuproso Cu ₂ O	Açúcar invertido
m_1	m_i	m_1	m_i	m_1	m_i	m_1	m_i	m_1	m_i	m_1	m_i	m_1	m_i
50	22,3	124	56,1	198	91,1	272	127,4	346	165,1	420	204,6		
52	23,2	126	57,0	200	92,0	274	128,4	348	166,2	422	205,7		
54	24,1	128	58,0	202	93,0	276	129,4	350	167,2	424	206,7		
56	25,0	130	58,9	204	94,0	278	130,4	352	168,3	426	207,8		
58	25,9	132	59,8	206	94,9	280	131,4	354	169,3	428	208,9		
60	26,8	134	60,8	208	95,9	282	132,4	356	170,4	430	210,0		
62	27,7	136	61,7	210	96,9	284	133,4	358	171,4	432	211,1		
64	28,6	138	62,6	212	97,8	286	134,4	360	172,5	434	212,2		
66	29,5	140	63,6	214	98,8	288	135,4	362	173,5	436	213,3		
68	30,4	142	64,5	216	99,8	290	136,4	364	174,6	438	214,4		
70	31,3	144	65,4	218	100,8	292	137,4	366	175,5	440	215,5		
72	32,3	146	66,4	220	101,7	294	138,4	368	176,7	442	216,6		
74	33,2	148	67,3	222	102,7	296	139,4	370	177,7	444	217,8		
76	34,1	150	68,3	224	103,7	298	140,5	372	178,8	446	218,9		
78	35,0	152	69,2	226	104,6	300	141,5	374	179,8	448	220,0		
80	35,9	154	70,1	228	105,6	302	142,5	376	180,9	450	221,1		
82	36,8	156	71,1	230	106,6	304	143,5	378	182,0	452	222,2		
84	37,7	158	72,0	232	107,6	306	144,5	380	183,0	454	223,3		
86	38,6	160	73,0	234	108,6	308	145,5	382	184,1	456	224,4		
88	39,5	162	73,9	236	109,5	310	146,6	384	185,2	458	225,5		
90	40,4	164	74,9	238	110,5	312	147,6	386	186,2	460	226,7		
92	41,4	166	75,8	240	111,5	314	148,6	388	187,3	462	227,8		
94	42,3	168	76,8	242	112,5	316	149,6	390	188,4	464	228,9		
96	43,2	170	77,7	244	113,5	318	150,7	392	189,4	466	230,0		
98	44,1	172	78,7	246	114,5	320	151,7	394	190,5	468	231,2		
100	45,0	174	79,6	248	115,4	322	152,7	396	191,6	470	232,3		
102	46,0	176	80,6	250	116,4	324	153,7	398	192,7	472	233,4		
104	46,9	178	81,5	252	117,4	326	154,8	400	193,7	474	234,5		
106	47,8	180	82,5	254	118,4	328	155,8	402	194,8	476	235,7		
108	48,7	182	83,4	256	119,4	330	156,8	404	195,9	478	236,8		
110	49,6	184	84,4	258	120,4	332	157,9	406	197,0	480	237,9		
112	50,6	186	85,3	260	121,4	334	158,9	408	198,1	482	239,1		
114	51,5	188	86,3	262	122,4	336	159,9	410	199,1	484	240,2		
116	52,4	190	87,2	264	123,4	338	161,0	412	200,2	486	241,2		
118	53,3	192	88,2	266	124,4	340	162,0	414	201,3	488	242,5		
120	54,3	194	89,2	268	125,4	342	163,1	416	202,4	490	243,6		
122	55,2	196	90,1	270	126,4	344	164,1	418	203,5	-	-		

8.7 Anexo 7 – Determinação da Cinza Total

CDU 637.1:543.2		ORIGINAL
NORMA PORTUGUESA	LEITES Determinação da cinza total	NP-477 1983
Laits. Détermination de la cendre totale.		
<p>1 - OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO</p> <p>A presente Norma destina-se a fixar o processo para determinar a cinza total do leite e dos leites compostos, assim como dos leites de ovelha e de cabra.</p> <p>2 - REFERÊNCIAS</p> <p>NP-402 - Leite. Colheita das amostras.</p> <p>NP-403 - Leite. Preparação das amostras para análise.</p> <p>3 - DEFINIÇÃO</p> <p>Para os fins da presente Norma, entende-se por cinza total dum leite, o resíduo mineral obtido por incineração segundo o processo a seguir descrito.</p> <p>4 - RESUMO DO PROCESSO</p> <p>Evaporação do leite à secura. Calcinação do resíduo a 450°C e respectiva pesagem.</p> <p>5 - REAGENTE</p> <p>Ácido acético glacial.</p> <p>6 - APARELHOS E UTENSÍLIOS</p> <p>6.1 - Balança sensível ao 0,1mg.</p> <p>6.2 - Banho-maria.</p>		
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">DIRECÇÃO - GERAL DA QUALIDADE (DGG) - Rua José Estevão, 83-A - 1198 Lisboa Codex</p>		(Continua)
DR, IIIª Série, Nº 236 de 1983-10-13	 CB: _____ COTA: _____	
REPRODUÇÃO PROIBIDA		

6.3 - Cápsula de platina ou outra apropriada de, pelo menos, 25cm³.

6.4 - Copo de precipitação.

6.5 - Estufa de secagem, regulável para $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

6.6 - Exsicador com substância exsicante activada e com indicador de humidade.

6.7 - Funil.

6.8 - Mufla com pirómetro.

6.9 - Pipeta de 25cm³.

7 - COLHEITA DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-402.

8 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Veja-se a NP-403.

9 - TÉCNICA

Para cápsula tarada após calcinação e arrefecimento em exsicador, medem-se 25cm³ de leite.

Pesa-se com a precisão de 1mg e evapora-se, no banho-maria, até à secura, depois de prévia adição de algumas gotas de ácido acético, para impedir a formação de uma película à superfície do leite.

Carboniza-se, lentamente, o resíduo à chama e calcina-se em mufla a temperatura que não exceda a do rubro sombrio (450^o).

Após a calcinação, deixa-se arrefecer em exsicador e pesa-se.

(Continua)

NP-477, p. 3 de 3

10 - RESULTADOS

10.1 - CÁLCULO

Sendo:

m_1 - a massa da toma dos 25cm³ de leite, expressa em gramas;

m_2 - a massa da cinza, expressa em gramas,

a cinza total do leite expressa em percentagem é:

$$\frac{m_2}{m_1} \times 100$$

10.2 - APRESENTAÇÃO

Os resultados apresentam-se com aproximação às décimas.

11 - REPETIBILIDADE


A diferença entre os resultados de duas determinações efectuadas simultaneamente, sobre a mesma amostra e pelo mesmo operador não deve exceder 0,01g por 100g de leite.

12 - BIBLIOGRAFIA

NF V 04-208 (1979) Lait. Détermination des cendres.



8.8 Anexo 8 – Folha da prova afetiva

	<p>Mestrado Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar</p> <p>Tese: Avaliação da Qualidade Físico-Química e Sensorial em Produtos derivados de Kefir</p>
	<p>Marisa Mascarenhas</p> <p style="text-align: center;">Folha de Prova</p>

Nome: _____

Data: ____/____/____

Prova Afetiva

Por favor, prove as amostras fornecidas e coloque um X na que, para si, é mais agradável no que diz respeito a cada parâmetro. Entre cada amostra ingira uma pequena porção de bolacha, lavando de seguida a boca com água, que se encontram junto das amostras (para que não exista mistura de sabores entre as amostras).

Fases da prova	Parâmetro	Amostra	
Antes da degustação	Cor		
	Aparência		
	Odor		
Durante a degustação	Doce		
	Ácido		
	Textura na boca		
Após a degustação	Flavour residual/persistência		

No global qual das amostras prefere: _____

(Coloque o número respetivo à amostra escolhida)

Observações:

NOTA: Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo. Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a sua prova.

Obrigado!

8.9 Anexo 9 – Folha da prova de aceitação

<p>IPL Instituto Politécnico de Leiria Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar</p>	Mestrado Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar Tese: Avaliação da Qualidade Físico-Química e Sensorial em Produtos derivados de Kefir	
	Folha de Prova	19/04/2012

Nome: _____ (Não Obrigatório)

Prova de Aceitação

Produto: Batido de kefir com frutos vermelhos.

Este é um produto probiótico com propriedades benéficas para a saúde, provadas cientificamente, com efeitos antibacterianos, imunológicos, hipocolesterolémicos e contribuem para a prevenção de tumores. Além disso é ideal para pessoas intolerantes à lactose, proporcionando uma melhor digestão e funcionamento do intestino.

Por favor, prove as amostras fornecidas e coloque um círculo (O) no número que, para si, se adequa a cada parâmetro.

Parâmetros	Nada agradável	Pouco agradável	Agradável	Bastante Agradável	Extremamente Agradável
Odor	1	2	3	4	5
Cor	1	2	3	4	5
Textura	1	2	3	4	5
Sabor	1	2	3	4	5
Flavour residual/ persistência de sabor	1	2	3	4	5

Tendo em conta as suas propriedades, se este produto existisse à venda, compraria?

Sim Não

Observações:

NOTA: Após terminar a prova certifique-se que deixa o local de prova limpo. Acenda a luz de presença para sinalizar que terminou a sua prova.

Obrigada!

8.10 Anexo 10 – Tratamento Estatístico dos Resultados

Tabela 8.10.1 – Teste da Homogeneidade das Variâncias.

	Sig.
pH	,016
Acidez(mL/L)	,176
Gordura(%)	,005
Proteína(%)	,019
Lactose(%)	,890
Açucars Totais(%)	,476
Cinzas(%)	,005

Tabela 8.10.2 – Teste Kruskal-wallis para o pH, teor de matéria gorda (gordura), proteína e cinzas.

	pH	Gordura(%)	Proteína(%)	Cinzas(%)
Asymp. Sig.	,009	,012	,023	,017

Tabela 8.10.3 – Teste de comparações múltiplas, Teste Gomes-Howell (Post Hoc), para o pH, para o teor de matéria gorda, de proteína e cinzas.

Dependent Variable	(I) Amostras	(J) Amostras	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
pH	Kefir12h	Kefir24h	1,26000	,08769	,014
		Kefir48h	1,59333	,09006	,006
		Kefir72h	1,70000	,11294	,001
		Leite	-,75667	,08647	,045
		logurte líquido natural açucarado	1,63667	,08692	,009
	Kefir24h	Kefir12h	-1,26000	,08769	,014
		Kefir48h	,33333	,02906	,005
		Kefir72h	,44000	,07409	,083
		Leite	-2,01667	,01453	,000
		logurte líquido natural açucarado	,37667	,01700	,001
	Kefir48h	Kefir12h	-1,59333	,09006	,006
		Kefir24h	-,33333	,02906	,005
		Kefir72h	,10667	,07688	,741
		Leite	-2,35000	,02517	,000
		logurte líquido natural açucarado	,04333	,02667	,645
	Kefir72h	Kefir12h	-1,70000	,11294	,001
		Kefir24h	-,44000	,07409	,083

	Kefir48h		-1,10667	,07688	,741
	Leite		-2,45667	,07265	,003
	Iogurte líquido natural açucarado		-,06333	,07318	,927
Leite	Kefir12h		,75667	,08647	,045
	Kefir24h		2,01667	,01453	,000
	Kefir48h		2,35000	,02517	,000
	Kefir72h		2,45667	,07265	,003
	Iogurte líquido natural açucarado		2,39333	,00882	,000
Iogurte líquido natural açucarado	Kefir12h		-1,63667	,08692	,009
	Kefir24h		-,37667	,01700	,001
	Kefir48h		-,04333	,02667	,645
	Kefir72h		,06333	,07318	,927
	Leite		-2,39333	,00882	,000
Gordura(%)	Kefir12h	Kefir24h	,65333	,17704	,156
		Kefir48h	,49333	,16045	,291
		Kefir72h	,54000	,15990	,252
		Leite	-,40333	,21074	,501
		Iogurte líquido natural açucarado	-,12000	,16114	,957
	Kefir24h	Kefir12h	-,65333	,17704	,156
		Kefir48h	-,16000	,07888	,511
		Kefir72h	-,11333	,07775	,717
		Leite	-1,05667	,15776	,029
		Iogurte líquido natural açucarado	-,77333	,08028	,024
	Kefir48h	Kefir12h	-,49333	,16045	,291
		Kefir24h	,16000	,07888	,511
		Kefir72h	,04667	,02108	,404
		Leite	-,89667	,13888	,076
		Iogurte líquido natural açucarado	-,61333	,02906	,000
	Kefir72h	Kefir12h	-,54000	,15990	,252
		Kefir24h	,11333	,07775	,717
		Kefir48h	-,04667	,02108	,404
		Leite	-,94333	,13824	,071
		Iogurte líquido natural açucarado	-,66000	,02582	,001
Leite	Kefir12h		,40333	,21074	,501
	Kefir24h		1,05667	,15776	,029
	Kefir48h		,89667	,13888	,076
	Kefir72h		,94333	,13824	,071
	Iogurte líquido natural açucarado		,28333	,13968	,516
Iogurte líquido	Kefir12h		,12000	,16114	,957
	Kefir24h		,77333	,08028	,024

natural	Kefir48h		,61333	,02906	,000
açucarado	Kefir72h		,66000	,02582	,001
	Leite		-,28333	,13968	,516
Proteína(%)	Kefir12h	Kefir24h	-,11333	,09922	,839
		Kefir48h	-,19000	,12120	,672
		Kefir72h	-,13000	,05055	,300
		Leite	,21000	,02981	,048
		logurte líquido natural açucarado	1,09667	,04177	,000
Kefir24h	Kefir12h	Kefir24h	,11333	,09922	,839
		Kefir48h	-,07667	,15136	,993
		Kefir72h	-,01667	,10382	1,000
		Leite	,32333	,09545	,250
		logurte líquido natural açucarado	1,21000	,09983	,013
Kefir48h	Kefir12h	Kefir24h	,19000	,12120	,672
		Kefir48h	,07667	,15136	,993
		Kefir72h	,06000	,12499	,993
		Leite	,40000	,11813	,251
		logurte líquido natural açucarado	1,28667	,12170	,022
Kefir72h	Kefir12h	Kefir24h	,13000	,05055	,300
		Kefir48h	,01667	,10382	1,000
		Kefir72h	-,06000	,12499	,993
		Leite	,34000	,04269	,045
		logurte líquido natural açucarado	1,22667	,05175	,000
Leite	Kefir12h	Kefir24h	-,21000	,02981	,048
		Kefir48h	-,32333	,09545	,250
		Kefir72h	-,40000	,11813	,251
		logurte líquido natural açucarado	,88667	,03180	,002
		logurte líquido natural açucarado	-1,09667	,04177	,000
logurte líquido natural açucarado	Kefir24h	Kefir48h	-1,21000	,09983	,013
		Kefir72h	-1,22667	,05175	,000
		Leite	-,88667	,03180	,002
		logurte líquido natural açucarado	-1,28667	,12170	,022
		Leite	-,40000	,11813	,251
Cinzas(%)	Kefir12h	Kefir24h	-,38667	,19264	,526
		Kefir48h	-,22000	,30708	,969
		Kefir72h	-,76333	,20415	,172
		Leite	-,06000	,19166	,999
		logurte líquido natural açucarado	-,60000	,19166	,287
Kefir24h	Kefir12h	Kefir24h	,38667	,19264	,526
		Kefir48h	,16667	,24085	,966
		Kefir72h	-,37667	,07341	,099

	Leite	,32667	,02108	,009
	Iogurte líquido natural açucarado	-,21333	,02108	,022
Kefir48h	Kefir12h	,22000	,30708	,969
	Kefir24h	-,16667	,24085	,966
	Kefir72h	-,54333	,25016	,461
	Leite	,16000	,24007	,971
	Iogurte líquido natural açucarado	-,38000	,24007	,671
Kefir72h	Kefir12h	,76333	,20415	,172
	Kefir24h	,37667	,07341	,099
	Kefir48h	,54333	,25016	,461
	Leite	,70333	,07079	,034
	Iogurte líquido natural açucarado	,16333	,07079	,443
Leite	Kefir12h	,06000	,19166	,999
	Kefir24h	-,32667	,02108	,009
	Kefir48h	-,16000	,24007	,971
	Kefir72h	-,70333	,07079	,034
	Iogurte líquido natural açucarado	-,54000	,00816	,000
Iogurte líquido natural açucarado	Kefir12h	,60000	,19166	,287
	Kefir24h	,21333	,02108	,022
	Kefir48h	,38000	,24007	,671
	Kefir72h	-,16333	,07079	,443
	Leite	,54000	,00816	,000

Tabela 8.10.4 – Teste ANOVA para o teor de acidez, de lactose e açúcares totais.

		Sig.
Acidez(mL/L)	Between Groups	,000
	Within Groups	
	Total	
Lactose(%)	Between Groups	,000
	Within Groups	
	Total	
Açúcares Totais(%)	Between Groups	,000
	Within Groups	
	Total	

Tabela 8.10.5 – Teste de comparações múltiplas, Teste Post Hoc, para o teor de acidez, lactose e açúcares totais.

Dependent Variable	(I) Amostras	(J) Amostras	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
Acidez(mL/L)	Kefir12h	Kefir24h	-156,500	7,3887	,000
		Kefir48h	-217,000	7,3887	,000
		Kefir72h	-268,000	7,3887	,000
		Leite	76,833	7,3887	,000
		logurte líquido natural açucarado	-175,500	7,3887	,000
	Kefir24h	Kefir12h	156,500	7,3887	,000
		Kefir48h	-60,500	7,3887	,000
		Kefir72h	-111,500	7,3887	,000
		Leite	233,333	7,3887	,000
		logurte líquido natural açucarado	-19,000	7,3887	,178
	Kefir48h	Kefir12h	217,000	7,3887	,000
		Kefir24h	60,500	7,3887	,000
		Kefir72h	-51,000	7,3887	,000
		Leite	293,833	7,3887	,000
		logurte líquido natural açucarado	41,500	7,3887	,001
	Kefir72h	Kefir12h	268,000	7,3887	,000
		Kefir24h	111,500	7,3887	,000
		Kefir48h	51,000	7,3887	,000
		Leite	344,833	7,3887	,000
		logurte líquido natural açucarado	92,500	7,3887	,000
	Leite	Kefir12h	-76,833	7,3887	,000
		Kefir24h	-233,333	7,3887	,000
		Kefir48h	-293,833	7,3887	,000
		Kefir72h	-344,833	7,3887	,000
		logurte líquido natural açucarado	-252,333	7,3887	,000
logurte líquido natural açucarado	Kefir12h	175,500	7,3887	,000	
	Kefir24h	19,000	7,3887	,178	
	Kefir48h	-41,500	7,3887	,001	
	Kefir72h	-92,500	7,3887	,000	
	Leite	252,333	7,3887	,000	
Lactose(%)	Kefir12h	Kefir24h	,477	,01622	,000
		Kefir48h	,807	,01622	,000
		Kefir72h	,947	,01622	,000
		Leite	-,453	,01622	,000

		logurte líquido natural açucarado	,317	,01622	,000
Kefir24h	Kefir12h		-,477	,01622	,000
	Kefir48h		,330	,01622	,000
	Kefir72h		,470	,01622	,000
	Leite		-,930	,01622	,000
		logurte líquido natural açucarado	-,160	,01622	,000
Kefir48h	Kefir12h		-,807	,01622	,000
	Kefir24h		-,330	,01622	,000
	Kefir72h		,140	,01622	,000
	Leite		-1,260	,01622	,000
		logurte líquido natural açucarado	-,490	,01622	,000
Kefir72h	Kefir12h		-,947	,01622	,000
	Kefir24h		-,470	,01622	,000
	Kefir48h		-,140	,01622	,000
	Leite		-1,400	,01622	,000
		logurte líquido natural açucarado	-,630	,01622	,000
Leite	Kefir12h		,453	,01622	,000
	Kefir24h		,930	,01622	,000
	Kefir48h		1,260	,01622	,000
	Kefir72h		1,400	,01622	,000
		logurte líquido natural açucarado	,770	,01622	,000
logurte líquido natural açucarado	Kefir12h		-,317	,01622	,000
	Kefir24h		,160	,01622	,000
	Kefir48h		,490	,01622	,000
	Kefir72h		,630	,01622	,000
	Leite		-,770	,01622	,000
Açúcares Totais(%)	Kefir12h	Kefir24h	,450	,01610	,000
		Kefir48h	,907	,01610	,000
		Kefir72h	1,157	,01610	,000
		Leite	-,207	,01610	,000
		logurte líquido natural açucarado	-7,723	,01610	,000
Kefir24h	Kefir12h		-,450	,01610	,000
	Kefir48h		,457	,01610	,000
	Kefir72h		,707	,01610	,000
	Leite		-,657	,01610	,000
		logurte líquido natural açucarado	-8,173	,01610	,000
Kefir48h	Kefir12h		-,907	,01610	,000
	Kefir24h		-,457	,01610	,000
	Kefir72h		,250	,01610	,000

	Leite	-1,113	,01610	,000
	logurte líquido natural açucarado	-8,630	,01610	,000
Kefir72h	Kefir12h	-1,157	,01610	,000
	Kefir24h	-,707	,01610	,000
	Kefir48h	-,250	,01610	,000
	Leite	-1,363	,01610	,000
	logurte líquido natural açucarado	-8,880	,01610	,000
Leite	Kefir12h	,207	,01610	,000
	Kefir24h	,657	,01610	,000
	Kefir48h	1,113	,01610	,000
	Kefir72h	1,363	,01610	,000
	logurte líquido natural açucarado	-7,517	,01610	,000
logurte líquido natural açucarado	Kefir12h	7,723	,01610	,000
	Kefir24h	8,173	,01610	,000
	Kefir48h	8,630	,01610	,000
	Kefir72h	8,880	,01610	,000
	Leite	7,517	,01610	,000