

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

ANA LUÍZA BARBOSA DE CARVALHO LIMA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA FERMENTAÇÃO DO KEFIR
DE ÁGUA**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

ANA LUÍZA BARBOSA DE CARVALHO LIMA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA FERMENTAÇÃO DO KEFIR
DE ÁGUA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

L732i
2022
Lima, Ana Luíza Barbosa de Carvalho, 1996-
Influência de diferentes substratos na fermentação do kefir
de água / Ana Luíza Barbosa de Carvalho Lima. – Viçosa, MG,
2022.

1 dissertação eletrônica (88 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2022.

Referências bibliográficas: f. 74-80.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.366>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Kefir. 2. Açúcar. 3. Bebidas fermentadas.
4. Fermentação. 5. Alimentos funcionais. 6. Probióticos. I.
Pereira, Alexandre Fontes, 1979-. II. Universidade Federal de
Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Química. III. Título.

CDD 22. ed. 637.146


ANA LUÍZA BARBOSA DE CARVALHO LIMA

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES SUBSTRATOS NA FERMENTAÇÃO DO KEFIR
DE ÁGUA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de dezembro de 2022.

Assentimento:



Ana Luíza Barbosa de Carvalho Lima
Autora



Documento assinado digitalmente
ALEXANDRE FONTES PEREIRA
Data: 18/07/2023 13:28:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Alexandre Fontes Pereira
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente à minha família, mas principalmente aos meus pais, Afonso e Norma, por serem exemplo desde sempre e por todo apoio que sempre me deram sem medir nenhum esforço. Nunca teria chegado até aqui sem vocês ao meu lado.

A minha avó Marta que não pode comemorar o fim deste ciclo comigo do jeito que gostaríamos, mas que com certeza está feliz por essa conquista.

Às colegas de mestrado que estiveram comigo nessa caminhada, nas dificuldades no laboratório e nas risadas para descontrair.

À Luciana, técnica do laboratório que fez muitos planejamentos se tornarem possíveis. Obrigada pelos ensinamentos, conversas e ajuda durante meu período no DEQ.

À minha amiga/irmã, Viviane, que viveu essa fase comigo do início ao fim me dando força, incentivo, palavras de apoio e muita solidariedade.

À Letícia, companheira de mestrado e de doutorado, enfrentando vários desafios juntas, mas também comemorando muitas vitórias.

Ao Rafael, meu namorado e melhor amigo, que sempre me fez mais forte, me dando incentivos diários e me mostrando que essa jornada podia ser leve.

Agradeço o suporte e parceria do meu orientador, Prof. Alexandre, que confiou em mim e me ajudou sempre que foi possível.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

E a todos que estiveram comigo de alguma maneira durante este período que me ajudaram a seguir em frente.

RESUMO

LIMA, Ana Luíza Barbosa de Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Influência de diferentes substratos na fermentação do kefir de água.** Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

O kefir é uma bebida probiótica com potencial crescimento de mercado devido a diversas propriedades benéficas ao organismo humano. Pesquisas têm associado seu consumo à modulação do sistema imunológico, equilíbrio da microbiota intestinal e propriedades anti-inflamatórias. Sua produção se dá por meio dos grãos que se multiplicam a partir de uma cultura inicial de microrganismos capazes de fermentar um substrato específico, sendo a lactose ou a sacarose, resultando em uma bebida levemente ácida, gaseificada e com baixo teor alcoólico. Os grãos de kefir de água têm sua biomassa formada por microrganismos que fermentam a sacarose, e tanto os grãos quanto a bebida estão sendo objetos de novas pesquisas por serem menos tradicionais que o kefir de leite além de poder ser ingerido por veganos, e também substituir a ingestão de refrigerantes. Os grãos de kefir de água tem potencial fermentativo em diversos meios que disponibilizem o açúcar como substrato. Dessa forma, é desejável que se estude os parâmetros fermentativos para que seja possível conhecer se existe um meio mais favorável para a fermentação dos grãos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi utilizar três diferentes substratos para a fermentação com grãos de kefir de água (açúcar de coco, mascavo e refinado) e realizar análises de pH, teor de sólidos solúveis, cor e acidez total em 0 h, 12h, 24 h, 36 h e 48 h do processo fermentativo. Nos grãos, foram avaliados ganho de massa, teor de massa úmida e seca, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de dispersão de energia. Foram feitas cinco fermentações para cada fonte de açúcar. Os resultados apresentaram diferenças entre a utilização dos açúcares, concluindo que a diferença mais significativa foi em relação ao açúcar refinado e os demais. As bebidas fermentadas em açúcar de coco e mascavo apresentaram valores de pH e acidez dentro das faixas encontradas na literatura consultada, assim como grãos com estruturas que proporcionaram boa aderência dos microrganismos, o que não foi possível notar nos grãos de açúcar refinado. Tal fato pode ser devido ao processo de refino do açúcar branco que envolve compostos químicos, fazendo com que o açúcar possua alto teor de sacarose, porém baixa concentração de minerais e nutrientes que favorecem o crescimento dos grãos. No entanto, os grãos não apresentaram alto ganho de massa, o que pode ter sido causado pela proporção de açúcar/grão (40 g/26 g) e até mesmo pela temperatura (27 °C) e tempo (48 h) aplicados no processo. Por fim, concluiu-se que os açúcares de coco e

mascavo são mais interessantes para a fermentação com os grãos de kefir de água, uma vez que apresentam características similares às desejadas para uma bebida fermentada de kefir, sendo o açúcar refinado uma opção menos vantajosa tanto para a produção da bebida quanto para manter a integridade dos grãos.

PALAVRAS-CHAVE: Bebida funcional. Fontes de açúcar. Grãos de kefir de água. Parâmetros de fermentação. Probiótico.

ABSTRACT

LIMA, Ana Luíza Barbosa de Carvalho, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Influence of different substrates on water kefir fermentation.** Adviser: Alexandre Fontes Pereira.

Kefir is a probiotic drink with potential market growth due to several beneficial properties for the human body. Research has associated its consumption to the modulation of the immune system, balance of the intestinal microbiota and anti-inflammatory properties. Its production takes place through the grains that multiply from an initial culture of microorganisms capable of fermenting a specific substrate, being lactose or sucrose, resulting in a slightly acidic, carbonated drink with low alcohol content. Water kefir grains have their biomass formed by microorganisms ferment sucrose, and both the grains and the drink are being the subject of new research because they are less traditional than milk kefir, in addition to being able to be ingested by vegans, and also to replace the ingestion of soft drinks. Water kefir grains have fermentative potential in several media that provide sugar available as a substrate. So, it is desirable to study the fermentative parameters so that it is possible to know if there is a more favorable environment for the fermentation of the grains. Therefore, the objective of this work was to use three different substrates for the fermentation with water kefir grains (coconut, brown and refined sugar) and to carry out analyzes of pH, soluble solids content, color and acidity in 0 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h of the process. In the grains, mass gain, wet and dry mass content, scanning electronic microscopy and energy dispersion spectroscopy were evaluated. Five fermentations were made for each sugar source. The results showed differences between the use of sugars, concluding that the most significant difference was in relation to refined sugar and the others. Drinks fermented in coconut and brown sugar showed pH and acidity values within the ranges consulted in literature, as well as grains with structures that provided good adherence of microorganisms, which was not possible to notice in the refined sugar grains. This fact may be due to the white sugar refining process that involves chemical compounds, causing the sugar to have a high sucrose content, but low concentration of mineral and nutrients that favor grain growth. However, the grains did not show high mass gain, which may have been caused by the sugar/grain ratio (40 g/26 g) and even by the temperature (27 °C) and time (48 h) applied in the process. Finally, it was concluded that coconut and brown sugars are more interesting for the fermentation with water kefir grains, since they have similar characteristics to those desired for

a fermented kefir drink, with refined sugar being a less advantageous option, both for the production of the drink and to maintain the integrity of the grains.

KEYWORDS: Functional drink. Sugar sources. Water kefir grains. Fermentation parameters. Probiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grãos de kefir de leite.....	17
Figura 2 - Grãos de kefir de água.	21
Figura 3 - Representação da estrutura química da dextrana.....	24
Figura 4 - Esquema de formação do biofilme do grão de kefir relacionado à produção do EPS a partir do crescimento microbiano da cultura.	25
Figura 5 – Processo simplificado da fermentação do kefir de água.	26
Figura 6 - "Nuvem" representativa da interação da microbiota do kefir de água e seus produtos formados.	27
Figura 7 - Consequências gerais de diversos fatores na fermentação do kefir de água.	29
Figura 8 - Metabólitos e compostos aromáticos encontrados no kefir de água.....	30
Figura 9 - Resultado da análise de HPLC do kefir de água com mel.....	31
Figura 10 - Fluxograma genérico de produção artesanal do kefir.....	34
Figura 11 - Fluxograma da produção industrial do kefir de água.....	36
Figura 12 – Recipientes de vidro (suqueiras) contendo água, açúcar e os grãos, armazenados na estufa em processo de fermentação.	39
Figura 13 – Esquema da metodologia de produção do kefir de água utilizada para a realização do presente estudo.	40
Figura 14 - Diagrama para interpretação da análise colorimétrica.....	43
Figura 15 - Grãos fermentados em solução de açúcar de coco, mascavo e refinado, respectivamente.	45
Figura 16 - Cadinhos contendo os grãos na estufa para secagem; grãos secos.	46
Figura 17 - Gráfico de barras verticais indicando os valores de pH ao longo das horas de fermentação e as diferenças significativas observadas.....	49
Figura 18 - Gráficos referentes às regressões lineares feitas a partir das médias dos valores de pH.	50
Figura 19 - Gráfico de barras verticais representando o perfil do valor de teor de sólidos solúveis (°brix) em relação as horas e cada açúcar utilizado na fermentação.....	52
Figura 20 - Gráficos de regressão linear criados a partir das médias dos valores de teor de sólidos solúveis calculados para cada fermentação.....	53

Figura 21 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentados os valores obtidos de acidez total das fermentações ao longo das horas	54
Figura 22 - Gráficos de regressão linear em que estão expressas as equações obtidas e seus respectivos coeficientes em relação à acidez total das fermentações	55
Figura 23 - Gráfico de barras verticais em que estão indicados os valores de ganho de massa obtidos ao longo das fermentações	59
Figura 24 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de massa seca calculadas nos grãos.	60
Figura 25 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de teor de massa úmida nos grãos nas diferentes fermentações.....	61
Figura 26 - Imagens dos grãos de kefir de água inteiros gerados pelo MEV, em aproximação de 100x. A) grão inteiro resultante da fermentação em açúcar de coco; B) grão resultante da fermentação em açúcar mascavo; C) grão cultivado em açúcar refinado.	66
Figura 27 - Imagens da superfície externa dos grãos de kefir de água aproximada em 3.000x. A) grão cultivado em açúcar de coco; B) grão cultivado em açúcar mascavo; C) grão cultivado em açúcar refinado.....	66
Figura 28 - Microrganismos observados no interior dos grãos avaliados no MEV. A) grão cultivado em açúcar de coco com zoom de 5.000x; B) grão resultante da fermentação em açúcar mascavo com zoom de 3.000x; C) grão cultivado em açúcar refinado com zoom de 3.000x.	67
Figura 29 – EPS observado nas fotos obtidas por meio do MEV. A) grão cultivado em açúcar de coco com aproximação de 2.000x; B) grão cultivado em açúcar mascavo com aproximação de 3.000x; C) grão cultivado em açúcar refinado com aproximação de 2.000x.	67
Figura 30 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de Ferro presentes na composição dos grãos analisados após cada fermentação nos diferentes açúcares.	68
Figura 31 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de K e Na na composição dos grãos analisados após as fermentações utilizando os diferentes açúcares.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores que representam as diferenças de cor (ΔE) entre as formulações das fermentações em diferentes açúcares em cada tempo.	57
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 Origem do kefir	16
3.2 Kefir de leite	16
3.3 Kefir de água	18
3.3.1 Histórico do Kefir de água.....	19
3.3.2 Benefícios do consumo do kefir de água para a saúde humana	19
3.3.3 Grãos de Kefir de água	20
3.3.3.1 Microrganismos	22
3.3.3.2 Estrutura dos grãos	24
3.4 Fermentação.....	25
3.4.1 Interações e dinâmica da fermentação.....	26
3.4.2 Metabólitos e compostos produzidos	30
3.5 Substratos como fontes de sacarose.....	32
3.5.1 Açúcar mascavo.....	32
3.5.2 Açúcar de coco	32
3.5.3 Açúcar branco refinado	33
3.6 Produção do Kefir de água	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Locais da pesquisa	38
4.2 Obtenção dos grãos e açúcares	38
4.3 Ativação dos grãos	38
4.4 Fermentação.....	39
4.5 Delineamento experimental.....	40
4.6 Análises	41
4.6.1 Análises da bebida.....	42
4.6.2 Análises dos grãos	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1 Análises na bebida	48
5.1.1 pH	48
5.1.2 Teor de sólidos solúveis	51
5.1.3 Acidez total.....	54
5.1.4 Cor	56
5.2 Análises nos grãos	58
5.2.1 Ganho de massa	58
5.2.2 Taxa de massa seca e teor de água	60
5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	61
5.2.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva.....	67
6 CONCLUSÃO.....	71
7 SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
APÊNDICES	81

1 INTRODUÇÃO

A busca por uma alimentação saudável é crescente e os alimentos funcionais são as opções de alimentos que trazem benefícios à saúde humana. O kefir, por exemplo, é uma bebida classificada como funcional e probiótica, com consumo em ascensão, em que pesquisas associam sua ingestão à modulação do sistema imunológico, equilíbrio da microbiota intestinal e propriedades anti-inflamatórias (DESTRO et al., 2019; ZONGO et al., 2020).

Kefir é uma bebida fermentada, levemente ácida e gaseificada, com baixo teor alcoólico proveniente da fermentação com a presença dos grãos em substrato adequado. Os grãos do kefir são pequenos agregados de massa gelatinosa e consistem em uma associação simbiótica de bactérias e leveduras que é envolta em uma matriz polissacarídica, o kefiran. Esses grãos se multiplicam e fermentam o meio resultando na bebida kefir (ZONGO et al., 2020).

No Brasil, de acordo com a Instrução Normativa de nº 46, o kefir é classificado como leite fermentado por grãos constituídos de leveduras fermentadoras e não fermentadoras de lactose (BRASIL, 2007), popularmente, o mais conhecido é o obtido da fermentação dos seus grãos em leite, que resulta em uma bebida semelhante ao iogurte, com sabor parecido ao da coalhada e levemente carbonatada.

No entanto, existe outro tipo de grão de kefir capaz de fermentar sacarose em meios como suco de frutas, extratos vegetais e solução de água com açúcar. Diferentes fontes de sacarose geram variações nos processos fermentativos, como tempo de duração da fermentação, crescimento e multiplicação dos grãos, além de produzir bebidas com características físico-químicas e sensoriais distintas. Esta é uma bebida que pode ser consumida logo após a fermentação (*in natura*) ou ser saborizada com frutas e ervas frescas, sendo uma opção de bebida para consumidores veganos, alérgicos à lactose ou até mesmo para aqueles que se interessam pelo kefir como substituição aos refrigerantes (DESTRO et al., 2019). O kefir de água não tem os Padrões de Identidade e Qualidade no Brasil. O estudo de diferentes substratos para sua produção é interesse de pesquisas para estabelecer critérios da bebida, com potenciais benefícios à saúde e crescimento de mercado.

A produção brasileira industrial do kefir de leite é restrita a poucas marcas e a produção de kefir de água se limita à produção caseira e artesanal, sem normas para controle da fermentação ou padronização do produto (JANUÁRIO et al., 2016; VEECK et al., 2019). Em relação às dificuldades da produção industrial do kefir, deve-se ressaltar a complexidade em se obter grãos com a mesma composição microbiológica para diferentes lotes.

Além disso, para a produção do kefir de água, diversos substratos podem ser utilizados. Assim é importante compreender o efeito de cada um deles no processo fermentativo para definição de padrões e para facilitar a escolha do substrato pelo produtor de acordo com as características fermentativas e o perfil final da bebida. Segundo Moretti *et al.* (2022), há o interesse em pesquisas que caracterizem o kefir de água utilizando diferentes substratos em todo o mundo, contribuindo para a transição da produção em escala artesanal para a industrial e, também, favorecendo a inserção dos padrões nos Codex Alimentarius de vários países, incluindo o Brasil.

Dado o acima exposto, esse estudo tem como objetivo avaliar a influência da utilização de diferentes fontes de sacarose, provenientes do açúcar mascavo, do açúcar de coco e do açúcar branco refinado na atividade fermentativa e composição dos grãos do kefir de água.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência de diferentes substratos, açúcar mascavo, açúcar de coco e açúcar branco refinado, no processo de fermentação do kefir de água.

2.2 Objetivos Específicos

- Produzir kefir de água fermentado em fontes de sacarose distintas;
- Avaliar parâmetros como pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis, durante o tempo de fermentação para os diferentes substratos;
- Avaliar o ganho de massa e massa seca dos grãos para cada substrato;
- Diferenciar microscopicamente os grãos do kefir de água por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV);
- Identificar os elementos químicos presentes nos grãos fermentados em cada substrato por Espectroscopia por Energia Dispersiva (EDS).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Origem do kefir

O termo kefir tem origem da palavra turca “keif”, que significa “bom sentimento”, “bem-estar”. Pesquisas apontam a origem do kefir nas montanhas caucasianas, há mais de 2.000 anos, quando tribos muçulmanas locais estocavam e transportavam leite, de vaca ou de cabra, em bolsas fabricadas a partir de peles de animais e após a retirada desse leite, outra quantidade era adicionada, e resíduos permaneciam na bolsa. Com a repetição deste processo por um período de tempo, os grãos se formavam em um agregado de moléculas compostas por polissacarídeos (CORDEIRO, 2018; SOUTO; SILVA; NEIF, 2020). As tribos presumiam que os grãos de kefir eram um presente de Alá pois a ingestão da bebida produzida a partir deles era indicada para tratamento de diversas doenças (MORE, 2019; OTLES; CAGINDI, 2003).

A partir do final do século XIX, a produção artesanal do kefir se espalhou pelo mundo, e no começo do século XX, cientistas começaram a estudar os benefícios da ingestão do kefir à saúde, tornando-o cada vez mais popular (CORDEIRO, 2018). Atualmente, tanto a produção artesanal-familiar quanto a industrial do kefir, ocorre em vários países, tais como Rússia, Portugal, Áustria, Hungria e Argentina. No entanto, de acordo com Farnworth (2005), não se sabe ao certo se a origem de todos os grãos de kefir espalhados pelo mundo é a mesma, já que análises microbiológicas apontam diferentes composições das culturas dependendo da região onde o kefir é cultivado (SILVEIRA, 2017).

Em países como Austrália, Canadá e Estados Unidos, produtos como queijos, *frozen yogurt* e outras bebidas fermentadas são produzidas à base do kefir de leite (PRADO et al., 2015). No Brasil, a fabricação comercial do kefir lácteo é recente, embora não se tenha registros sobre datas, e apenas poucas marcas estão disponíveis no mercado, portanto, a produção artesanal ainda é a forma mais comum da obtenção da bebida fermentada dos grãos (SILVEIRA, 2017).

3.2 Kefir de leite

O kefir é um leite fermentado obtido a partir da dupla fermentação, láctica e alcoólica, de bactérias e leveduras presentes nos grãos (OTLES; CAGINDI, 2003). A bebida é

caracteristicamente viscosa, assemelhando-se ao iogurte, porém é levemente carbonatada e de baixo teor alcoólico (JANUÁRIO et al., 2016; OTLES; CAGINDI, 2003).

Segundo o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (2007) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o kefir é definido como leite fermentado a partir dos grãos de kefir, com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. As características microbiológicas e físico-químicas da bebida variam de acordo com a origem e quantidade de grãos inoculados (LAUREYS; DE VUYST, 2017). O padrão estabelecido pela Instrução Normativa é que a bebida deve conter menos de 1 g de ácido láctico por 100 g de bebida e de 0,5 a 1,5 % (v/m) de etanol. Além de ter no mínimo 10^7 unidades formadoras de colônias de bactérias lácticas e mínimo de 10^4 de leveduras específicas (BRASIL, 2007).

Os grãos de kefir de leite são constituídos de bactérias ácido lácticas e acéticas, leveduras fermentadoras e não fermentadoras de lactose. Essa associação de microrganismos forma uma massa de aspecto gelatinoso de cor branca, de tamanho entre 1 e 6 mm com contorno irregular, representada na Figura 1 (JANUÁRIO et al., 2016; SILVEIRA, 2017).

Figura 1 - Grãos de kefir de leite.



Fonte: Januário *et al.*, 2016.

Dependendo do país e da região onde os grãos são cultivados, sua composição pode variar, no entanto, é mais comum a presença de bactérias dos gêneros *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Lactococcus*; e com predominância do gênero de *Lactobacillus*, além de leveduras *Saccharomyces* (SILVEIRA, 2017).

O método tradicional de produção da bebida consiste na inoculação de, em média, 5 % m/m de grãos de Kefir em leite à temperatura de 20 a 25 °C, por um período de 18 a 24 h para que ocorra a fermentação. O líquido fermentado é filtrado e armazenado a 4°C e os grãos são

separados para reaproveitamento em próximas fermentações, uma vez que, quando cultivados corretamente, se mantém estáveis por longos períodos (OTLES; CAGINDI, 2003).

O kefir, portanto, é uma bebida fermentada funcional probiótica capaz de, se consumido regularmente, equilibrar a microbiota intestinal, com boa qualidade nutricional, assim como composição química e microbiológica favoráveis ao organismo humano (ARAÚJO et al., 2019; DESTRO et al., 2019). Ela ainda contém minerais, vitamina K, cálcio e vitaminas do complexo B, sendo que estas atuam na regulação da atividade renal e do fígado (PERES, 2019).

Vale ressaltar ainda outros benefícios à saúde, como no trabalho realizado por Pedro (2019), em que a ingestão de kefir por mulheres com queixas gastrointestinais gerou efeitos positivos nos sintomas de constipação relatados. Em outro estudo feito por Ostadrahimi *et al.* (2015), a ingestão do kefir de leite auxiliou na diminuição da glicemia de pacientes com diabetes mellitus tipo 2, o que pode ser relacionado com os probióticos presentes na bebida que causam a regulação do teor de açúcar no sangue.

Apesar de ser mais habitual a utilização do leite como substrato para a fermentação do kefir, a mistura de água e sacarose também pode ser oferecida como fonte de nutrientes para os grãos (UGALDE et al., 2019). Consumido especialmente no México, o kefir de água é uma alternativa para pessoas alérgicas a produtos derivados do leite, intolerantes à lactose ou veganos que não abrem mão dos benefícios propiciados pela bebida fermentada (ÇEVIK et al., 2019). Embora a composição do kefir de água seja diferente da bebida produzida a partir do leite, justamente pela diferença de substratos e da composição dos grãos, seu consumo também apresenta vantagens em uma alimentação equilibrada para o organismo humano (BARROS, 2019).

3.3 Kefir de água

O kefir de água é uma bebida não-láctica produzida a partir da fermentação da sacarose pelos grãos inoculados em solução de água açucarada (FIORDA, 2016; LAUREYS; DE VUYST, 2014).

Após a fermentação anaeróbica na presença dos grãos que varia de 24 a 96 h em temperatura entre 20 e 30 °C, é esperado que se obtenha uma bebida carbonatada de aparência semi-translúcida e, com cor variando entre o amarelo claro e o caramelo, dependendo do tipo de açúcar utilizado. Considerando que a sacarose é o substrato a ser consumido pelas leveduras presentes nos grãos, o resultado é uma água kefirada pouco adocicada, levemente alcoólica,

ligeiramente ácida e refrescante (GULITZ et al., 2011; GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021).

O açúcar mascavo é o principal substrato utilizado na fermentação dos grãos de kefir de água (TAVARES et al., 2020), porém utilizam-se também diversos vegetais e frutas, como soja, gengibre, maçã, abacaxi, uva, melão, morango, coco e jabuticaba sendo boas opções de diversificação e enriquecimento nutricional (DESTRO et al., 2019; FIORDA et al., 2017).

3.3.1 Histórico do Kefir de água

A exata origem dos grãos de kefir de água ainda é incerta, entretanto, Beijerinck, em 1889, relacionou os grãos de kefir de água às “gingerbeer plants”, que teria sido levado da Criméia após a guerra, em 1856, até a Inglaterra, por soldados britânicos. Mais tarde, Lutz, em 1899, descreveu uma origem parecida com a anterior, dando o nome de “Tibis”, originário das frutas de um cacto tipicamente mexicano, Opúncia. Na França, alguns anos depois, Vayssier, em 1978, nomeou os grãos de kefir de “sugary kefir grains” (grãos de kefir açucarado) com o intuito de diferenciá-lo dos grãos de leite e assim ficaram conhecidos (PIDOUX, 1989).

Os países que mais consomem a bebida de kefir de água são: Estados Unidos, México, Canadá, Japão, Tailândia e Malásia, França Grécia, Turquia, Romênia, Rússia, Inglaterra, Holanda, Noruega, Suécia, Espanha e Portugal, Brasil, Chile, Peru e Argentina (FIORDA et al., 2017; SILVEIRA, 2017).

O kefir de água conta com produção tradicionalmente artesanal e caseira, mas apresenta um futuro promissor no mercado de bebidas fermentadas, não somente por apresentar características funcionais e probióticas, mas também por considerar o potencial mercado dos consumidores alérgicos ou intolerantes à lactose e veganos (FIORDA et al., 2017; LAUREYS; DE VUYST, 2014).

3.3.2 Benefícios do consumo do kefir de água para a saúde humana

Há uma tendência de a população buscar uma melhor qualidade de vida a partir de hábitos de alimentação mais saudáveis e dieta equilibrada. Com isso, a procura por alimentos funcionais e probióticos vem aumentando, sendo que estudos e pesquisas demonstram relação positiva entre a ingestão desses alimentos com a saúde (FIORDA et al., 2017; UGALDE et al., 2019).

Os alimentos considerados funcionais são capazes de prover ao consumidor, além da nutrição necessária obtida de um alimento, vantagens complementares como melhor funcionamento do sistema imunológico e prevenção do surgimento precoce de doenças (CAMPOLINA; AURÉLIO; CARVALHO, 2017).

Os probióticos, segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO/WHO) (2006), são organismos vivos que ao serem consumidos em quantidade adequada, proporcionam benefícios à saúde de quem os ingere. Portanto, os probióticos são microrganismos, podendo ser bactérias e leveduras de diversos gêneros e espécies, que atuam no organismo humano oferecendo benefícios à saúde (ANVISA, 2019). Esses microrganismos ajudam na melhor absorção dos nutrientes, como vitaminas e aminoácidos, fundamentais para o bom funcionamento do organismo, e ainda auxiliam na diminuição de microrganismos causadores de doenças, modulando o sistema imunológico (ARAUJO et al., 2020).

No estudo realizado por Silveira (2017), foi possível observar a atuação benéfica do kefir de água no organismo de ratos wistar em complicações metabólicas causadas pela obesidade após uma dieta específica para este fim, e também na redução de gordura no fígado, além de promover efeitos anti-inflamatórios nos animais. Há também relatos da relação da ingestão de kefir de água com ação antioxidante, cicatrizante e anti-ulcerogênica (LOPES, 2019).

Os benefícios do kefir podem ser relacionados aos mecanismos de ação de determinados microrganismos presentes nos grãos do kefir e que resultam em características antimicrobianas contra patógenos. Esses mecanismos podem ser tanto a disputa pelos nutrientes disponíveis ou a produção de inibidores desses microrganismos patogênicos, como peróxido de hidrogênio ou ácidos orgânicos (BARROS, 2019).

3.3.3 Grãos de Kefir de água

Os grãos de kefir de água (Figura 2), assim como os de leite, são constituídos de uma associação simbiótica de diferentes microrganismos. Os de água, porém, são mais transparentes, menos gelatinosos e menos elásticos, portanto menos resistentes que os grãos de leite (FIORDA et al., 2017). Além disso, a composição dos grãos também é diferente, visto que o uso de sacarose seleciona leveduras, favorecendo sua prevalência e por isso este tipo de grão contém maior concentração de leveduras *Saccharomyces* ssp. Em conjunto com os diversos microrganismos que compõem os grãos de kefir de água, existe também um polímero de

glicose, conhecido como dextrana, resultado da fermentação a partir da sacarose (LAUREYS; DE VUYST, 2014), o que distingue os grãos de kefir de água para os de leite, uma vez que os grãos fermentados em leite são compostos por heteropolissacarídeos ramificados, conhecidos como kefirano (ALVES, 2020).

Figura 2 - Grãos de kefir de água.



Fonte: Lopes, 2019.

Os grãos de kefir são estruturas resilientes que se adaptam ao ambiente em que estão inoculadas e têm a capacidade de se manter saudáveis enquanto o ambiente não se torna prejudicial. Contudo, os grãos podem ser sobrecarregados ou se estressarem dependendo da mudança a que forem expostos, mudando sua forma ou tamanho e apresentar aroma mais ou menos fermentado. A habilidade de adaptação em diferentes ambientes e temperaturas faz com que os grãos tenham características distintas nas estações do ano, podendo sobreviver em condições variadas. Sua cor varia de acordo com o substrato ou fruta seca utilizada na fermentação, podendo ser desde marrom claro até marrom escuro (FIORDA, 2016).

Para o cultivo dos grãos de kefir é necessário possuir uma colônia inicial para começar o processo e a partir dos grãos que já existem, iniciar a fermentação. No princípio do cultivo os grãos têm tamanhos pequenos e vão crescendo e se multiplicando ao longo do processo fermentativo a partir do crescimento dos microrganismos e da biossíntese dos componentes presentes, de acordo os parâmetros ideais e já estipulados para a produção. Então, para garantir uma fermentação com alto rendimento, tanto a nível caseiro quanto industrial, que produza uma bebida com características de qualidade, é importante que se tenha conhecimento e entendimento da atividade desses grãos (WANG et al., 2022).

A completa atividade dos microrganismos pode se iniciar após a segunda ou terceira rodada de fermentações e, a partir deste momento, começar o processo de crescimento e

multiplicação dos grãos. No entanto, devido ao seu alto poder de adaptabilidade em diversos meios, existe a possibilidade de que os grãos não estejam em um meio totalmente favorável ao seu crescimento, mas mesmo assim, os microrganismos são capazes de produzir uma bebida benéfica à saúde. Ou seja, a qualidade do kefir de água não deve ser diretamente relacionada à taxa de crescimento dos grãos utilizados (FIORDA, 2016).

Na composição geral dos grãos, há a presença de cerca de 80% de água e, quando armazenados a 4 °C na sua forma *in natura*, apresentam uma vida de prateleira reduzida para cerca de 30 dias quando comparado ao armazenamento dos grãos secos, que fica em torno de 12 a 18 meses (FIORDA, 2016).

Em sua pesquisa, Fiorda (2016) cita estudo publicado por Garrote *et al.* (1997) em que foi verificado que o armazenamento dos grãos de kefir nas temperaturas de -20 °C e -80 °C não foi capaz de causar alteração na microbiota e qualidade dos padrões do kefir em relação à bebida produzida com grãos que não foram armazenados previamente.

Apesar da alta variabilidade da composição das culturas do kefir de água, uma solução proposta por Mistry (2004) e citado por Fiorda (2016) para garantir a uniformidade da produção da bebida é a utilização de cepas liofilizadas, já que uma vez secas, espera-se não ter alteração da microbiota dos grãos.

3.3.3.1 Microrganismos

A diversidade da microbiota dos grãos de kefir de água é objeto de estudo de diversas pesquisas, uma vez que cada cultura é única e as características de cada uma delas dependem da interação que ocorre entre os componentes que formam a cultura. De forma geral, estudos apontam que a composição microbiana do kefir é constituída por bactérias ácido acéticas, bactérias ácido lácticas e leveduras. Apesar da aparência dos grãos e sua característica probiótica não variarem de forma significativa em decorrência da variação da microbiota dos grãos, essa variação pode ocorrer de cultura para cultura, também dependendo da forma de cultivo escolhida, assim como o tipo de substrato utilizado. Realizar lavagens excessivas e a utilização inadequada dos grãos também podem alterar a microbiota original e, conseqüentemente, as características físico-químicas do produto final (CORDEIRO, 2018; EGEA *et al.*, 2020; FIORDA, 2016).

Na Alemanha, por exemplo, Gulitz *et al.* (2011), caracterizaram a composição de grãos de três origens distintas e encontrou diversas bactérias, como *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*

hordei, *Lactobacillus nagelii*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter fabarum* e *Acetobacter Orientalis*; e leveduras: *Hanseniaspora valbyensis*, *Lachancea fermentati*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygorulaspora florentina*.

Provando a diferença da composição da microbiota de grãos de kefir de diferentes origens, Miguel *et al.*, em 2011 analisaram microbiologicamente grãos de oito estados do Brasil, encontrando as seguintes bactérias *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Acetobacter lovaniensis*, e *Bacillus cereus*, além das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces fermentati*, e *Candida valdiviana* (LOPES, 2019).

Laureys *et al.* (2016) analisaram outros grãos, de origem Belga e identificaram *Bifidobacterium aquikefiri sp.*, variação do gênero *Bifidobacterium*, que são bactérias comumente relacionadas à microbiotas intestinais saudáveis e presentes na produção de alimentos funcionais.

Graças à microbiota do kefir ser formada por uma gama de culturas de diferentes microrganismos, a contaminação não é algo simples na produção da bebida uma vez que existe competição por alimento e a quantidade de microrganismos benéficos provavelmente será maior que os patogênicos presentes no meio. Além disso, Conceição (2012) cita um estudo feito por Franco e Landgraf (1996) em que os autores classificam o kefir de água como um alimento tão ácido que se torna capaz de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos no seu meio fermentativo.

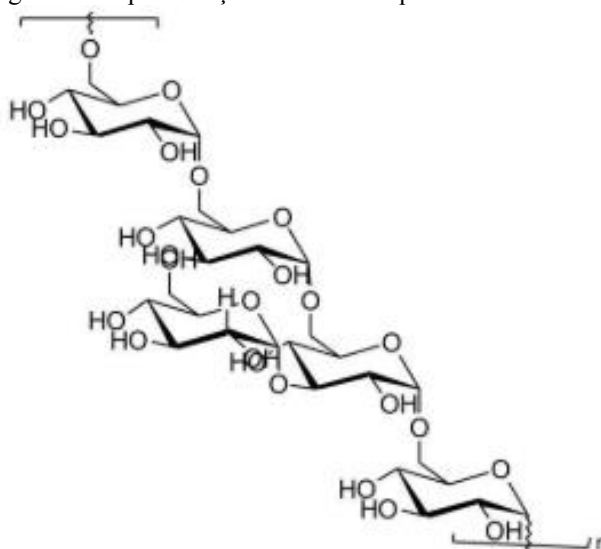
No entanto, a contaminação por *E. coli* e *S. aureus*, por exemplo, podem causar riscos à saúde dos consumidores do kefir, além de atribuir à bebida características diferentes das esperadas para uma fermentação livre de contaminações, como textura mais densa, cheiro forte e desagradável, e cor pálida (FIORDA, 2016).

Portanto, alguns cuidados devem ser tomados para que se possa evitar qualquer tipo de contaminação por microrganismos patogênicos, incluindo utilizar utensílios e equipamentos limpos, fermentar os grãos em temperatura indicada e controlada para tal procedimento para que não haja a possibilidade da proliferação de fungos e bactérias causadoras de doenças, assim como selar de forma correta o fermentador sem que seja possível a entrada de sujidades e insetos. Por fim, a quantidade de grãos, líquido e açúcar deve ser a ideal para não estimular as bactérias patogênicas a competir e ultrapassar a quantidade de grãos no meio. Mesmo tomando cuidados, o risco de contaminação existe, porém as chances diminuem (FIORDA, 2016).

3.3.3.2 Estrutura dos grãos

Como já citado, os grãos do kefir são compostos por bactérias, acéticas e lácticas, e leveduras. Esses microrganismos se agregam por meio de uma matriz de exopolissacarídeo de dextrano (dextrana), o EPS, que é formado por polímeros de glicose em que basicamente estão presentes as ligações α -D-glicose, agregadas por ligações α -1,6 linear e ramificações em α -1,2, α -1,3 e α -1,4, fazendo com que o comprimento de sua cadeia seja extenso (Figura 3) (alto peso molecular) e agregando diversidade nas suas características (LAUREYS et al., 2018; CORDEIRO, 2018). Devido a isso, o EPS é um polissacarídeo natural e biodegradável altamente utilizado nas indústrias de biotecnologia como as de alimentos, químicas, farmacêuticas, entre outras (CONCEIÇÃO, 2012; WANG et al., 2022).

Figura 3 - Representação da estrutura química da dextrana.



Fonte: Schmid, Sieber, Rehm (2015) apud Cordeiro (2018).

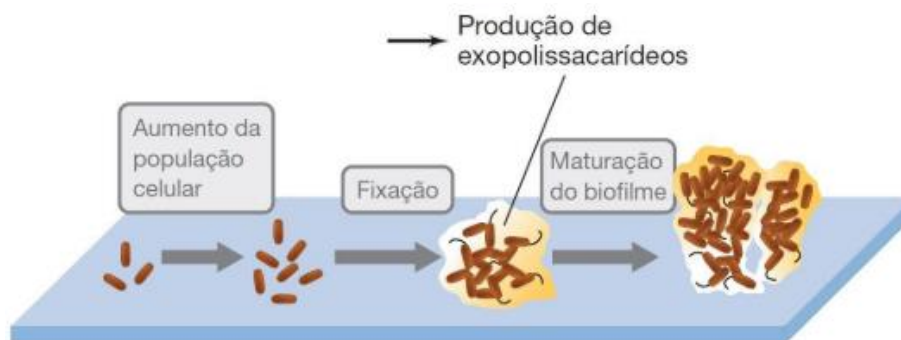
Inicialmente, a síntese da dextrana foi relacionada à presença das bactérias ácido lácticas da espécie *Lactobacillus hilgardii* que produzem uma glucana com estrutura semelhante à do EPS, sendo então consideradas as principais responsáveis pelo crescimento dos grãos do kefir de água (Pidoux, 1989). No entanto, no estudo publicado por Laureys e De Vuyst (2017), foi observado que as cepas de *L. hilgardii* produziram EPS em grãos com baixa taxa de crescimento da biomassa, ou seja, a existência somente dessas cepas na microbiota foi insuficiente para gerar um alto crescimento dos grãos.

Assim, outros estudos foram realizados e foi possível compreender que outras espécies de BAL são capazes de produzir dextrana a partir da sacarose, a qual está associada ao

favorecimento do crescimento da biomassa dos grãos, tais como: *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus hordei*, *Lactobacillus nagelli*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum* (LYNCH et al., 2021; PENDÓN et al., 2021; WANG et al., 2022).

O EPS é produzido e secretado pelos microrganismos como forma de proteção já que a partir da associação dos microrganismos dos grãos e o EPS extracelular que os envolve tem-se a formação de uma comunidade bem estruturada denominada biofilme. Esse biofilme promove a formação dos grãos e os protege contra condições extremas como altos níveis de etanol e ácido acético que podem ser prejudiciais aos microrganismos, desidratação das células, adesão à diversas superfícies e reserva de nutrientes (WANG et al., 2022).

Figura 4 - Esquema de formação do biofilme do grão de kefir relacionado à produção do EPS a partir do crescimento microbiano da cultura.



Fonte: Cordeiro, 2018

3.4 Fermentação

A fermentação do kefir de água ocorre a partir da inoculação dos grãos em substrato rico em açúcar, como suco de frutas ou vegetais, ou água com açúcar. A bebida produzida é composta pelos produtos da fermentação, sendo eles compostos aromáticos, ácidos láctico e acético, etanol e dióxido de carbono (CORDEIRO, 2018).

A composição final da bebida pode variar de acordo com o método aplicado no cultivo e produção do kefir, a origem, qualidade e as características do substrato utilizado, e ainda a origem, microbiota e quantidade dos grãos (OTLES; CAGINDI, 2003).

A quantidade inicial de grãos é um fator a ser considerado no processo fermentativo já que isso causa alteração na parcela de microrganismos em atividade, podendo afetar o pH do meio. O tempo e a temperatura também são importantes, pois, pode haver alteração na microbiota da fermentação por favorecimento ou perda de determinados microrganismos. Tais

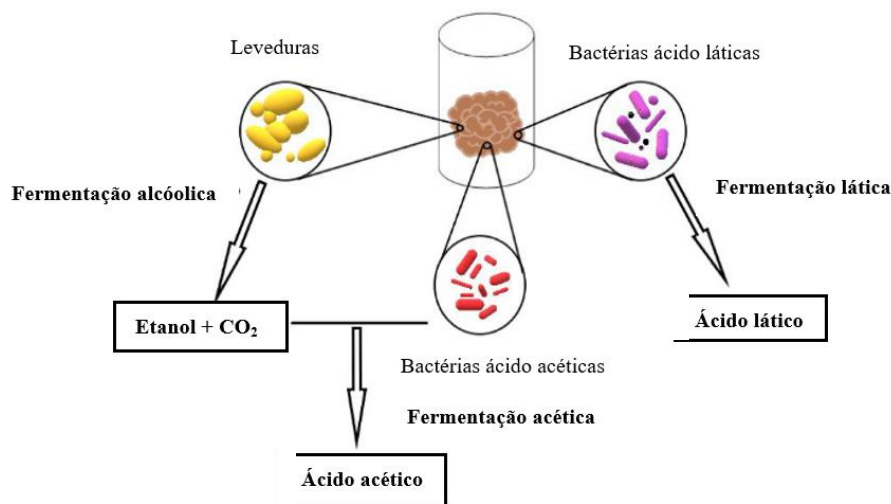
parâmetros influenciam nas características físico-químicas e sensoriais da bebida fermentada (FARNWORTH, 2005).

Além disso, em estudo realizado por Laureys e De Vuyst (2017) foi comprovado que o crescimento dos grãos aumenta conforme com o consumo da sacarose, se multiplicando em seguida e aumentando significativamente de volume, formando grãos com as mesmas características que serão úteis para próximas fermentações. Portanto, a concentração de substrato deve ser ideal para nutrir os grãos.

3.4.1 Interações e dinâmica da fermentação

As bactérias e leveduras que compõem os grãos são responsáveis pela produção do kefir participando de três etapas do processo de fermentação. As bactérias ácido lácticas convertem os carboidratos disponíveis no meio (sacarose ou lactose) em açúcares simples e ácido láctico. Já as leveduras, fermentam os açúcares simples, transformando glicose ou frutose em etanol. Em seguida, as bactérias ácido acéticas utilizam o etanol para a produção do ácido acético (Figura 3) (FIORDA et al., 2016a).

Figura 5 – Processo simplificado da fermentação do kefir de água.

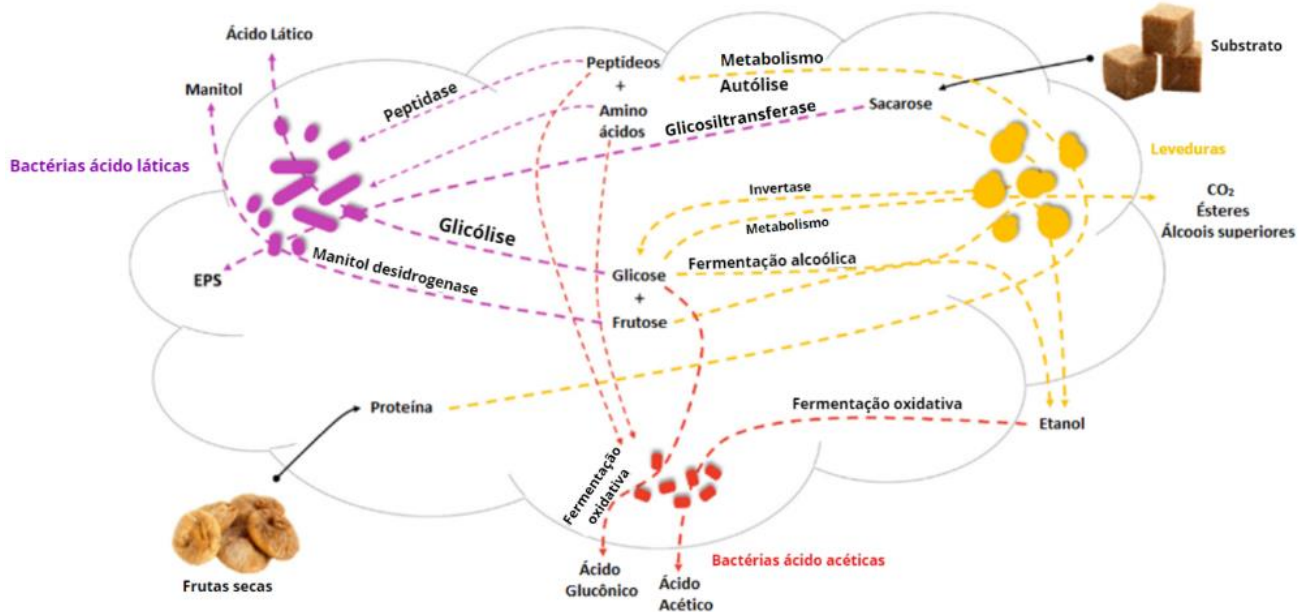


Fonte: Adaptado de Cordeiro, 2018.

De acordo com o estudo feito por Lynch *et al.* (2021), a Figura 6 representa, de forma mais completa, apresentando os principais caminhos e produtos do processo, o mapa bioquímico da fermentação realizada pelos microrganismos que compõem os grãos do kefir de água. Os autores enfatizaram que o esquema foi montado a partir do conhecimento atualmente

disponível em relação ao processo de fermentação, e que é real a possibilidade de existirem outras interações acontecendo entre espécies de microrganismos desconhecidos, assim como a formação de compostos importantes não identificados até então. Tal mapa ou “nuvem” foi representado neste formato com o intuito de simular a estrutura física de um grão de kefir e a atividade do processo que ocorre no seu interior.

Figura 6 - "Nuvem" representativa da interação da microbiota do kefir de água e seus produtos formados.



Fonte: Adaptado de Lynch et al., 2021.

Na imagem, os cubos de açúcar representam, de forma geral, os substratos utilizados na fermentação que são fonte de carbono para o processo, e os figos secos representam frutas secas que podem ser adicionadas à fermentação, utilizadas como fonte extra de proteínas, complementando o meio com sais minerais e nutrientes. No Brasil, essa prática não é essencial visto que os açúcares encontrados no mercado podem apresentar origem orgânica ou mais natural do que em outros países, onde as frutas secas são requeridas e comumente utilizadas.

Os microrganismos que constituem os grãos do kefir de água são as leveduras, bactérias ácido lácticas e bactérias ácido acéticas, sendo estas últimas em menor quantidade, e tais microrganismos são alimentados pelo substrato fornecido pelo açúcar, a sacarose.

No início da fermentação, a sacarose é consumida pelas leveduras e por algumas bactérias lácticas que possuem a capacidade de consumir esse substrato sem a necessidade da interferência das leveduras, a partir da via metabólica glicosiltransferase que é utilizada por algumas bactérias ácido lácticas.

De forma geral, a sacarose é consumida pelas leveduras e o resultado dessa ação é a excreção da enzima invertase, que é capaz de quebrar as moléculas da sacarose em glicose e frutose. Quando o meio possui alta concentração de açúcar, as leveduras excretam grande quantidade dessa enzima, fazendo com que a velocidade da fermentação aumente e com isso, as leveduras conseguem mais energia para o processo.

Após a quebra da molécula de sacarose em glicose e frutose, e com a liberação da enzima invertase, as bactérias ácido lácticas consomem esses monossacarídeos por meio de vias metabólicas específicas e produzindo assim, na fermentação láctica, o ácido láctico (via glicólise) e o manitol (via desidrogenase do manitol), além do EPS, o exopolissacarídeo responsável pela estrutura dos grãos (descrito pelo autor como biomassa dos grãos e por isso se encontra no interior do mapa).

Ao mesmo tempo em que ocorre a ação descrita anteriormente de liberação da enzima e consumo dos monossacarídeos, as leveduras também consomem a glicose e a frutose e formam os outros principais produtos da fermentação alcoólica: o etanol, CO₂, ésteres e álcoois superiores. A presença de CO₂ no meio fermentativo é notória durante o processo já que é possível observar bolhas se formando na superfície do líquido, e quanto maior a atividade das leveduras, maior é a quantidade de bolhas aparentes no meio. Os ésteres e álcoois superiores são comumente produzidos em pequenas quantidades, mas são essenciais para a composição aromática da bebida final.

Em relação às frutas secas, Lynch *et al.*, (2021) consideram que as mesmas fornecem proteínas para o processo e são essas proteínas que são consumidas primariamente pelas leveduras, processo que também irá resultar na liberação de enzimas no meio, que posteriormente quebram as proteínas disponíveis em peptídeos e aminoácidos, e entrando em seguida no metabolismo das bactérias ácido lácticas.

Já as bactérias acéticas dependem preferivelmente da glicose (já que comumente não consomem frutose) para a formação do ácido glucônico. Utilizam também dos peptídeos, aminoácidos e etanol produzidos pela atuação das leveduras, e a assim, no final do processo fermentativo do kefir de água, começam a sua atividade da fermentação acética.

Além disso, as bactérias ácido acéticas também dependem da presença de oxigênio para atuarem na fermentação, porém, considerando que o kefir é cultivado por pouco tempo, geralmente, não há a necessidade de agitação do meio durante a fermentação. Além disso, a concentração de etanol é baixa, e levando em conta a baixa presença das bactérias ácido acéticas no meio, sua atividade é limitada e, conseqüentemente, os produtos da fermentação desses

microrganismos serão presentes em menor quantidade em relação aos outros. No entanto, tais produtos são importantes para o resultado do processo, uma vez que agregam acidez e aroma à bebida, além de apresentarem benefícios à saúde.

A fermentação, de forma geral, apresenta diversos fatores que podem influenciar no andamento do processo (Figura 7) e por isso, cada fermentação tem uma característica individual apesar de seguir um padrão.

Figura 7 - Consequências gerais de diversos fatores na fermentação do kefir de água.

Fator	Nível		
	Baixo	Alto	
Extrínseco	Nutriente	<ul style="list-style-type: none"> • Fermentação lenta • Altos carboidratos residuais totais • Baixa produção de metabólitos • Altos valores de pH • Baixo ou nenhum crescimento dos grãos • Abundância de BAA 	<ul style="list-style-type: none"> • Fermentação rápida • Alta produção de metabólitos • Altos carboidratos residuais totais • Relativo pH alto • Baixa proporção levedura:BAA • Baixa proporção AcOH: EtOH / AcOH: ácido láctico
	Capacidade tamponante	<ul style="list-style-type: none"> • Baixos valores de pH • Baixo crescimento dos grãos 	<ul style="list-style-type: none"> • Alta produção de metabólitos • Altos carboidratos residuais totais • Relativo pH alto
	Oxigênio	<ul style="list-style-type: none"> • Baixa abundância de BAA 	<ul style="list-style-type: none"> • Abundância de BAA
Intrínseco	pH	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo aumento do grão 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto crescimento do grão
	Crescimento dos grãos	<ul style="list-style-type: none"> • Grãos pequenos • Alta contagem de células viáveis • Alta produção de metabólitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Grãos grandes • Baixa contagem de células viáveis

Fonte: Adaptado de Lynch et al., 2021.

Apesar de possíveis alterações nos processos de fermentação, é possível perceber a relação de dependência das bactérias ácido lácticas com as leveduras, que iniciam a fermentação, dando condições para as bactérias se desenvolverem, assim como a dependência das bactérias ácido acéticas com os produtos das etapas iniciais do processo para sua atividade, por isso a composição dos grãos de kefir é considerada uma simbiose.

No estudo da cinética da fermentação feito por Laureys e De Vuyst (2014), a sacarose foi o substrato escolhido para o processo de produção do kefir de água utilizando açúcar não refinado. Assim como representado no esquema proposto por Cordeiro (2018), passadas 24 horas do início da fermentação, a sacarose presente no meio foi consumida em grande quantidade e houve formação de frutose, sugerindo a atividade das bactérias ácido lácticas. O consumo quase total da sacarose foi relatado após 72 horas de fermentação. As leveduras, então,

fermentaram a frutose disponível resultando em etanol, que, a partir das bactérias ácido acéticas, aumentaram a quantidade de ácidos lático e acético ao longo do processo.

Em relação ao pH, Yaman, Elmali, Kamber (2010) avaliaram a fermentação do kefir de leite e apresentou dados que mostram sua variação durante o processo, em que no início o pH cai rapidamente, devido a produção dos ácidos lático e acético, caminhando para a estabilidade de acordo com o passar das horas. Também para Laureys e De Vuyst (2017), na fase da fermentação aeróbica, as bactérias ácido acéticas eram predominantes, produzindo ácido acético, resultando na queda do pH do meio. No entanto, apesar da aceleração do processo de fermentação, o baixo pH pode ter causado estresse aos grãos, evitando sua multiplicação em grande quantidade. Portanto, a concentração de substrato e de grãos é essencial para o equilíbrio do processo.

3.4.2 Metabólitos e compostos produzidos

O kefir de água é formado pelos produtos da fermentação dos microrganismos presentes na cultura específica que está sendo fermentada, portanto, pode haver variação nos compostos encontrados nas bebidas. Porém, aproximadamente 30 compostos diferentes já foram identificados (Figura 8) (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021).

Figura 8 - Metabólitos e compostos aromáticos encontrados no kefir de água.

Nome do composto	Referência
2-metil-1-propanol, álcool isoamílico, acetato de etila, acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila, decanoato de etila, butanoato de etila, 2-metil-butanoato de etila	Laureys & De Vuyst, 2014
Acetato de 2-feniletila, lactato de etila, butanoato de etila, 2-metil-butanoato de etila, heptanoato de etila, nonanoato de etila, 9-decenoato de etila, benzenopropanoato de etila, octanoato de metila, nonanoato, decanoato, hexanal, furfural, benzaldeído, 1-octanol, 1,3-propanodiol, álcool benzílico, 2-feniletanol, 4-etilfenol, 4-etilguaiacol, 2,4-di-terc-butilfenol, hidroxitolueno butilado, estireno	Laureys & De Vuyst, 2017

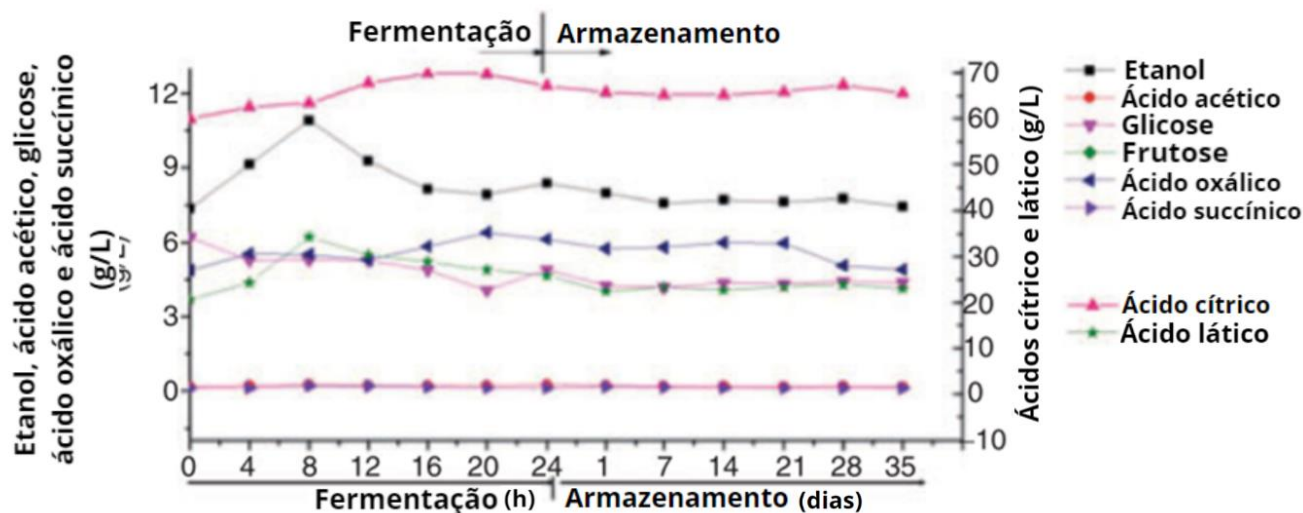
Fonte: Adaptado de (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021).

Os principais metabólitos produzidos durante a fermentação dos grãos de kefir de água são os ácidos lático e acético, glicerol e manitol. O manitol, por exemplo, apresenta características importantes para o kefir de água como a doçura e o perfil antioxidante. O glicerol

é uma molécula que pode interferir na viscosidade do kefir, tornando-o levemente mais viscoso, porém não interfere no aroma e sabor da bebida (FIORDA, 2016). Os componentes responsáveis pelo aroma da bebida são, principalmente, 2-metil-1-propanol, álcool isoamílico, acetato de isoamila, acetato de etila, hexanoato de etila e octanoato de etila (GUZEL-SEYDIM; GÖKIRMAKLI; GREENE, 2021; LAUREYS; DE VUYST, 2014).

Na Figura 9, a seguir, é apresentado o resultado da análise de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) realizada no estudo de Fiorda et al. (2016b), em que foi analisada uma amostra de kefir de água com o mel sendo o substrato da fermentação. O estudo avaliou características físicas e composição química da bebida durante o processo fermentativo (24h) e depois, no período de armazenamento (35 dias).

Figura 9 - Resultado da análise de HPLC do kefir de água com mel.



Fonte: Fiorda *et al.*, 2016b.

No gráfico da análise, os autores constataram maior presença de ácido cítrico resultante da fermentação, além da produção de etanol, dos ácidos acético, oxálico, succínico e láctico. No entanto, não foi indicada a presença de outros ácidos como málico e gálico, que também podem ser encontrados na composição do kefir de água.

De forma geral, segundo os autores, açúcares e ácidos orgânicos agregam características positivas às bebidas, principalmente sensoriais, como refrigerantes e vinhos. Esses compostos fornecem frescor e doçura ao paladar, construção do aroma da bebida e ainda podem contribuir para a estabilidade microbiológica do meio (FIORDA et al., 2016b).

3.5 Substratos como fontes de sacarose

Como substrato para a fermentação no kefir de água, é importante a escolha de um açúcar de qualidade, livre de contaminação e de demais ingredientes que possam interferir na multiplicação dos grãos, e que seja fonte de nutrientes para os microrganismos, afim de se obter um processo fermentativo satisfatório.

Da cana-de-açúcar é possível produzir diversos tipos de açúcares e por isso encontra-se no mercado várias opções.

3.5.1 Açúcar mascavo

Com aspecto úmido e de cor escura, o açúcar mascavo é um produto praticamente bruto obtido da moagem da cana-de-açúcar. Por não passar por nenhum processo industrial como branqueamento ou refinamento (em que se produz o açúcar branco refinado, por exemplo) é capaz de conservar vitaminas e minerais presentes na cana, como cálcio, ferro, manganês e potássio, sendo então, uma opção de açúcar saudável e boa fonte de nutrientes. Os processos envolvidos na produção do açúcar mascavo são a moagem da cana, cozimento e desidratação do caldo. Sua composição de sacarose é de cerca de 90%, 6% de açúcares redutores, aproximadamente 15% de minerais (K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Mn, Zn e Cu) e umidade perto de 2,5% (CHEMELLO, 2005; DESTRO et al., 2019; GUERRA; MUJICA, 2010; SOUZA et al., 2018).

Afim de aproveitar seu perfil nutritivo, o açúcar mascavo é utilizado na indústria alimentícia na produção de bolos, produtos integrais e pães. Além disso, o estudo realizado por Destro *et al.* (2019), constatou que a utilização do açúcar mascavo na fermentação dos grãos de kefir de água foi satisfatória em relação ao teor de açúcar total que apresentou redução de cerca de 50% ao longo do processo fermentativo e presença de minerais na bebida, como K e Mn.

Portanto, com alto teor de sacarose e nutrientes, o açúcar mascavo é uma opção favorável de substrato para a inoculação dos grãos de kefir de água.

3.5.2 Açúcar de coco

O açúcar de coco é proveniente de cortes no coqueiro que liberam sua seiva e que, quando aquecida até a evaporação da água presente, possibilita a cristalização da sacarose

resultando na formação do açúcar de coco, um açúcar de cor marrom escuro e aspecto granulado (ALVES, 2020). Com cerca de 7% de frutose e 3% de glicose, seu teor de sacarose é de aproximadamente 80%, e apesar de ter menor quantidade de sacarose, sua doçura se compara com a do açúcar refinado e pode ser substituído na proporção de 1g de açúcar de coco para 1g de açúcar refinado (WRAGE et al., 2019).

O fato de possuir características saudáveis à alimentação agrega valor ao açúcar de coco e o faz ganhar espaço no mercado brasileiro, apesar do seu uso ser pouco comum no dia a dia dos consumidores do Brasil. Assim como o açúcar mascavo, esta variedade do açúcar de palma não passa por nenhum processo industrial de refinamento, apenas secagem e peneiramento. Por isso, de acordo com Philippine Coconut Authority (PCA) (2015), o açúcar de coco preserva em sua composição os nutrientes presentes no coco, como minerais (Fe, Zn, K e Ca) e também a inulina, uma fibra que é capaz de retardar a absorção de glicose pelo corpo humano, fazendo assim com que o índice glicêmico deste açúcar seja menor do que o açúcar branco refinado.

Apesar dos nutrientes do substrato serem necessários para o crescimento dos grãos de kefir, o alto teor de vitaminas e minerais que compõem o açúcar de coco pode sobrecarregar os grãos, fazendo com que sua multiplicação não ocorra em grandes quantidades. Por isso, pode ser interessante avaliar a combinação do alto teor de nutrientes do açúcar de coco com a elevada pureza de sacarose do açúcar branco refinado, afim de equilibrar o meio de substrato para fermentação dos grãos de kefir de água (SOUZA et al., 2018).

3.5.3 Açúcar branco refinado

Por passar por processos de refinamento, este tipo de açúcar dispõe de características visuais mais atrativas como cristais muito finos, de aspecto solto com baixa umidade, e de cor branca sem adição de corantes. O açúcar branco refinado é mais puro do que os outros açúcares, contendo alto teor de sacarose (cerca de 98%) e é o açúcar mais consumido pelos brasileiros (CREMA, 2012; JAMBASSI, 2017).

Para a fermentação do kefir de água, o açúcar refinado pode produzir uma bebida de característica final pouco doce e ácida. Diferente do açúcar mascavo, o açúcar branco refinado contém menos nutrientes e por isso pode levar a uma menor multiplicação dos grãos, resultando também, na produção de uma bebida com menos qualidades nutricionais (OLIVEIRA; KAWASHIMA; VERAS, 2018). Além disso, o baixo desenvolvimento e crescimento de microrganismos observado em estudos sobre a bebida produzida a partir deste substrato pode

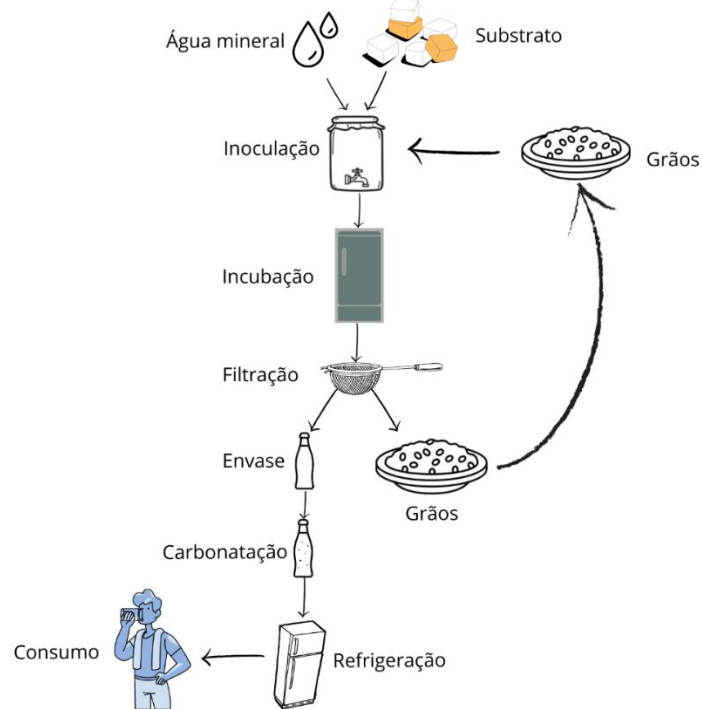
ter relação direta com a adição de compostos químicos nas fases do processo de produção do açúcar branco refinado, como dióxido de enxofre e peróxido de hidrogênio que tem como intuito branquear o açúcar (ÇEVİK et al., 2019).

3.6 Produção do Kefir de água

A produção do kefir de água (Figura 10) é tradicionalmente artesanal e se dá, basicamente, pela adição e incubação dos grãos de kefir em um meio com substrato onde ocorrerá a fermentação, em média, por 24 horas à uma temperatura entre 25 a 30°C. Com o processo fermentativo completo, o líquido fermentado é filtrado e os grãos podem ser utilizados em outra batelada ou podem ser lavados, desidratados e armazenados de forma refrigerada para serem utilizados em fermentações seguintes. Além da inoculação direta dos grãos na solução de substrato, outra possibilidade para a fabricação do kefir de água é utilizar culturas isoladas e liofilizadas de bactérias e leveduras para a fermentação (FIORDA, 2016).

Após a filtração, a bebida pode ser engarrafada para continuar com o processo de carbonatação, em temperatura média de 25°C por 24h. Posteriormente, a bebida deve ser armazenada a 4°C e estará pronto para o consumo (DESTRO et al., 2019).

Figura 10 - Fluxograma genérico de produção artesanal do kefir.



Para iniciar uma fermentação, é importante que alguns parâmetros sejam levados em consideração e por isso, na literatura são encontrados estudos que apontam valores específicos para tais parâmetros, dependendo da forma e até mesmo da região de cultivo. Em relação à temperatura, de forma geral, os grãos de kefir tanto de leite quanto de água são fermentados na faixa de 25 a 30°C (FIORDA *et al.*, 2017) . Porém, a temperatura de 21°C foi mencionada como uma possibilidade de faixa de fermentação ótima para os estudos feitos por Laureys; De Vuyst (2011) e por Alsayadi *et al.* (2013).

Quanto ao tempo de incubação dos grãos no meio com substrato, a produção do kefir de água apresenta uma variação nas horas de fermentação do que no caso do kefir de leite. Isso acontece pelo fato de a produção do kefir de leite ser considerada mais padronizada e geralmente se faz completa em um período de 24 horas (Guzel-Saydim *et al.*, 2005), diferentemente do kefir de água. Para Fiorda *et al.* (2017), a fermentação do seu estudo considerou o tempo de 24h, mas para Randazzo *et al.* (2016), 48h foi o período melhor observado e já para Gulitz *et al.* (2011), o tempo de fermentação ideal foi de 72h.

No que diz respeito à quantidade de grãos a serem inoculados também existem variações, não havendo a determinação de um padrão. Para Fiorda *et al.* (2017), foi utilizada a proporção de 10% de grãos por volume de meio fermentativo, ou seja, massa/volume. No entanto, no estudo de Alsayadi *et al.* (2013), apenas 5% m/v foram utilizados na fermentação.

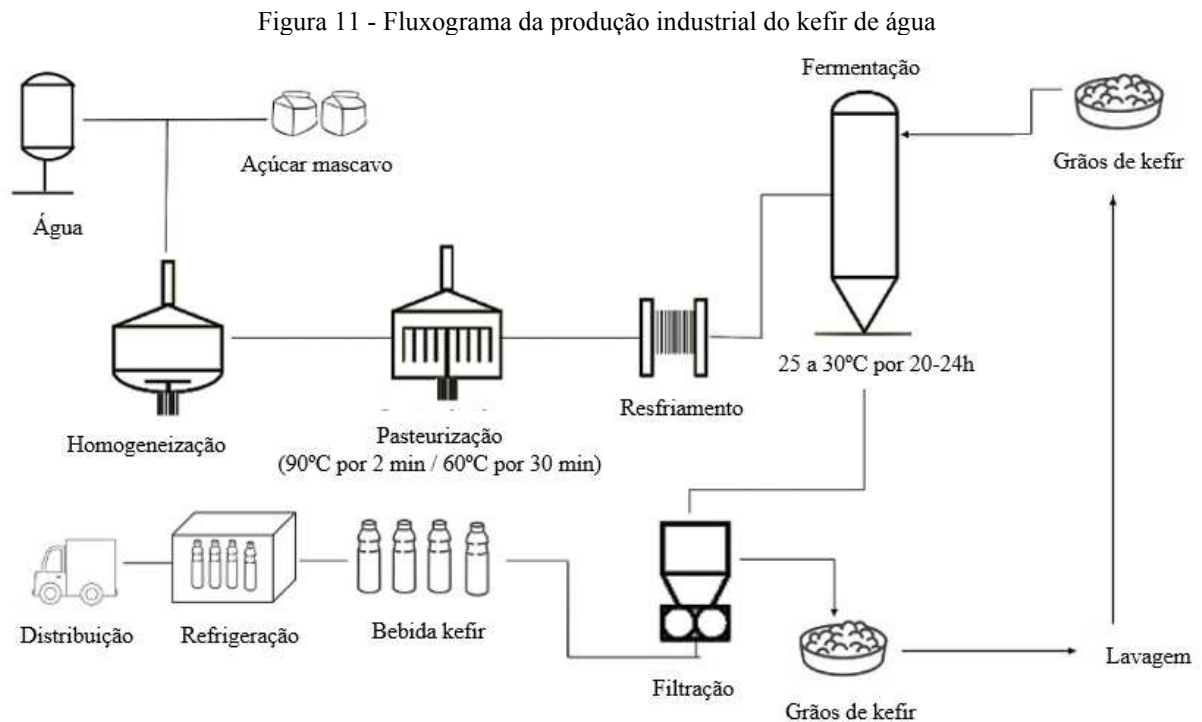
Durante a processo fermentativo, ocorre o crescimento e multiplicação dos grãos de kefir, que varia dependendo do substrato utilizado, além de ter a influência da agitação do meio de tempos em tempos e da integridade dos grãos inicialmente inoculados. Em média, o crescimento diário dos grãos cultivados para ativação em leite é de 5% e dos cultivados em meio açucarado é 45%, e após esta etapa, há a multiplicação dos grãos, que mantém a composição microbiológica da cultura inicial. Então, de forma geral, quando decorrida corretamente, a fermentação é capaz de multiplicar os grãos em grande quantidade, possibilitando os produtores de realizarem a venda ou a doação do excesso desses grãos, sempre atentando-se à necessidade da conservação correta dos grãos, sejam eles desidratados, secos ou inoculados em meio aquoso (SANTOS *et al.*, 2012).

A produção caseira da bebida é considerada simples e acessível, já que não exige equipamentos específicos e de alto custo, podendo ser feita em pequena quantidade com utensílios domésticos devidamente sanitizados. Sua saborização pode ser feita com variadas frutas ou ervas, como no estudo feito por Ugalde *et al.* (2019), em que foi produzida uma água

kefirada adicionada de suco de laranja e gengibre que, ao ser avaliada, obteve 53% da intenção de compra.

No Brasil, poucas marcas comercializam a bebida fermentada de leite. No caso do kefir de água, no ano de 2022 foi iniciada a venda da bebida em larga escala por uma única empresa considerando o mercado nacional, apesar de ainda não existir legislação própria da bebida para comercialização. De acordo com Fiorda *et al.* (2017) e Açıık *et al.* (2020), estudos ainda devem ser feitos com o objetivo de projetar e testar equipamentos de escala industrial que possam ser eficientes no processo, assim como desenvolver maneiras de evitar a contaminação da cultura iniciadora da fermentação, manter o mesmo grupo de microrganismos em diferentes bateladas de produtos e padronizar a qualidade da bebida.

Considerando a produção industrial da bebida à base de água, Fiorda *et al.* (2017) sugeriu um fluxograma incluindo todas as etapas do processo produtivo, representado na Figura 11.



Fonte: Adaptado de Fiorda *et al.*, 2017.

O processo indicado acima apresenta as mesmas etapas do processo artesanal, porém conta com equipamentos com capacidade de produção industrial em grande escala, como tanque de homogeneização, pasteurizador, trocador de calor, fermentador ou biorreator e filtro. No estudo mais recente realizado por Guzel-Seydim, Gökirmaklı e Greene (2021), os autores reforçam a dificuldade de se encontrar no acervo científico disponível, artigos que descrevam

e relatem sobre a produção industrial do kefir de água bem como as características dos grãos em relação aos parâmetros de fermentação.

Além disso, não se encontrou na literatura a proposição, como um comparativo, da utilização dos açúcares mascavo, de coco e branco refinado para a produção do kefir de água em relação aos parâmetros cinéticos, seja para fins de consumo caseiro ou de comercialização. Assim, julga-se relevante realizar uma pesquisa que avalie a atividade de diferentes substratos na fermentação do kefir de água, determinando padrões de pH, teor de sólidos solúveis, acidez do meio e crescimento dos grãos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais da pesquisa

As análises de pH, teor de sólidos solúveis, acidez, teor de crescimento, taxa de água e ativação dos grãos foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa, no Laboratório de Bebidas Fermentadas e Destiladas. A etapa de fermentação foi realizada no Laprobqi – Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos, no Departamento de Tecnologia de Alimentos – UFV. As análises dos grãos por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia por energia dispersiva (EDS) foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise (NMM) - UFV. A análise de cor foi realizada no Laboratório de Embalagens, do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV.

4.2 Obtenção dos grãos e açúcares

Os grãos foram obtidos por doação de produção artesanal da cidade de Viçosa, Minas Gerais, disponíveis em comércio local.

Os açúcares foram adquiridos em supermercados locais. As marcas de açúcar de coco e açúcar refinado foram escolhidas de acordo com a disponibilidade para compra e a marca do açúcar de mascavo foi definida a partir da leitura de artigos publicados sobre o assunto que indicaram a melhor opção em relação ao crescimento de biomassa e formação de produtos.

4.3 Ativação dos grãos

Os grãos foram doados embalados em pequenos sacos plásticos e congelados. O descongelamento foi feito em água em temperatura média de 25° C por 24 h, de acordo com a sugestão do produtor cultivador dos grãos adquiridos. Após esse período, os grãos estavam completamente descongelados e prontos para seguirem para a etapa de ativação. Esta etapa consistiu em inocular o conteúdo dos sacos plásticos (cerca de 5g de grãos) em 500 mL de água mineral com 2 colheres de açúcar mascavo (cerca de 30 g – 6 % m/v) por 7 dias, sendo que a solução açucarada foi trocada a cada 24 h (ALVES et al., 2021). Ao final dos 7 dias, era possível verificar a formação de bolhas na superfície da solução indicando que os grãos já estavam em atividade e que, a partir daquele momento, a fermentação poderia ser iniciada.

4.4 Fermentação

Após a ativação, os grãos já estavam prontos para incubação. A água mineral foi utilizada para as fermentações, uma vez que a água deve ser isenta de cloro, composto que pode inibir o crescimento da cultura de microrganismos. Os açúcares foram peneirados para que qualquer outra partícula não fosse adicionada ao processo e, antes de serem dissolvidos na água, cada tipo de açúcar foi pesado.

O volume de água foi calculado a partir da quantidade disponível de grãos para cada fermentação, tendo como base 10 % m/v. Para cada fermentação, estavam disponíveis 26 g de grãos, portanto, foram utilizados 260 mL de água mineral.

Em cada recipiente foi adicionada a água em temperatura média de 24°C, e em seguida os açúcares, cerca de 30 g. Com as soluções homogêneas foi medido o teor de sólidos solúveis (TSS) de cada uma. O padrão inicial foi de um teor de sólidos solúveis de 9 °Brix e não houve uma considerável variação na quantidade de cada tipo de açúcar. Ao conferir o TSS, caso estivesse abaixo do estipulado, mais açúcar deveria ser adicionado até atingir o valor desejado.

Com o TSS padronizado, os grãos previamente pesados foram adicionados à solução. O recipiente foi coberto com tecido de material respirável e preso com elástico.

A incubação foi feita em Incubadora B.O.D. – Nova Ética®, modelo 411 D –, na temperatura controlada de 27 °C, e os recipientes utilizados foram suqueiras de vidro devidamente higienizadas com capacidade de três litros, com torneira na parte inferior para recolhimento das amostras.

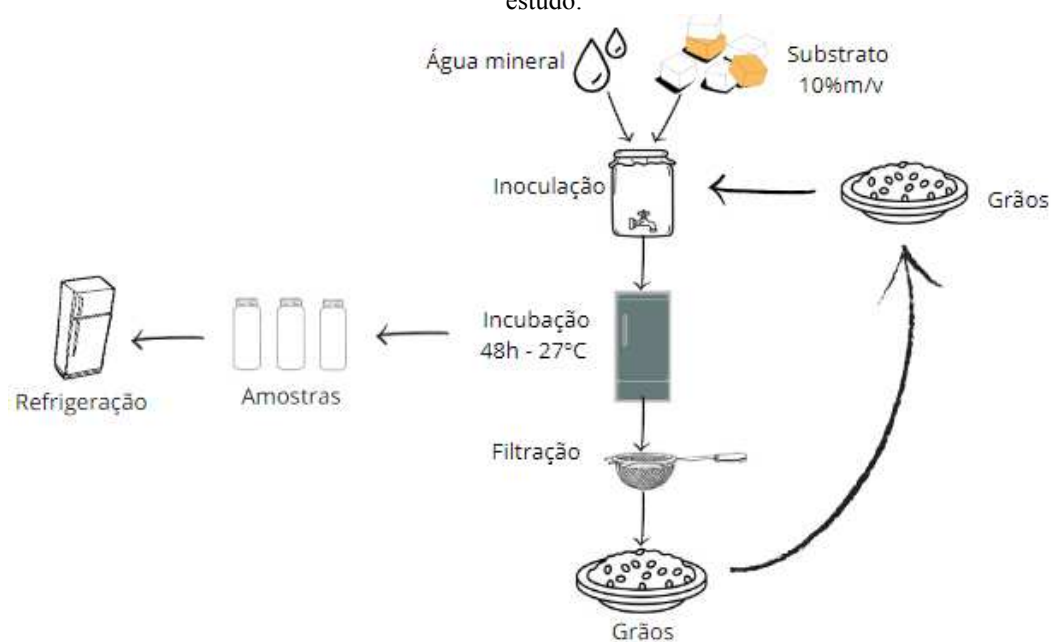
Figura 12 – Recipientes de vidro (suqueiras) contendo água, açúcar e os grãos, armazenados na estufa em processo de fermentação.



Fonte: O autor.

As fermentações foram feitas em sistema de batelada, sendo que cada batelada constituiu de uma fermentação para cada açúcar, ou seja, 3 fermentações por batelada. Foram realizadas 5 bateladas de fermentações, portanto, cada açúcar teve 5 repetições de fermentação. Uma única batelada teve duração de 48 h, totalizando ao final das 5 repetições, 10 dias de processo.

Figura 13 – Esquema da metodologia de produção do kefir de água utilizada para a realização do presente estudo.



Fonte: O autor.

4.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi caracterizado como um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), também conhecido como Planejamento Completamente Aleatorizado, sendo ele um delineamento experimental de simples execução. Os experimentos são chamados de experimentos inteiramente ao acaso e se aplicam em situações de uniformidade dos dados obtidos em repetição em que são separados pela igualdade ou diferença entre as repetições dos tratamentos, ao acaso (STOCHERO; JACOBI; LÚCIO, 2020).

Durante as 5 repetições do processo fermentativo, o recolhimento de amostras foi feito imediatamente após a inoculação dos grãos no meio, e a cada 12 h a partir do início até completadas 48 h de fermentação. Levando em conta que na etapa de ativação foi utilizado o açúcar mascavo e, portanto, os grãos estavam adaptados àquele meio, a primeira batelada de

fermentação (F1) foi denominada o pré-inóculo, ou seja, não foi considerada nas análises dos resultados. Os dados foram analisados a partir da F2.

As análises de pH, TSS e acidez titulável foram realizadas em triplicata. As demais análises foram realizadas apenas uma vez para cada repetição.

Para as análises dos grãos, houve recolhimento apenas ao final de cada fermentação, e todas as análises foram realizadas uma única vez por repetição.

Análises de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, considerando nível de 5% de significância ($p < 0,05$), foram feitas utilizando o software Minitab Statistics®. Além disso, no software Prism - GraphPad® foram feitas as regressões lineares referentes às análises de pH, teor de sólidos solúveis e acidez total.

4.6 Análises

Com o intuito de acompanhar o processo fermentativo em um intervalo regular, as amostras para as análises foram retiradas a cada 12 h e armazenadas em potes de acrílico com capacidade de 23 mL, os quais foram mantidos em congelador até a realização da análise de cor. Para cada análise (pH, teor de sólidos solúveis e acidez), um pote de acrílico foi devidamente identificado com a numeração da respectiva fermentação (F_n), qual o açúcar utilizado como substrato (C, M, R), a hora em que a amostra foi recolhida (0 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h) e por último, o nome da análise a ser realizada com aquela amostra.

Para a análise de cor foram recolhidos 18 mL, totalizando três recipientes para cada açúcar que foram armazenados em congelador. Para as análises de pH, teor de sólidos solúveis e acidez total, realizadas logo após recolhimento da amostra e sem necessidade de armazenamento posterior, foram recolhidos 30 mL no total.

Em relação às análises referentes aos grãos, para taxa de crescimento, os grãos foram pesados imediatamente após finalização de cada fermentação em balança analítica - Bioscale® FA2204B-BI. Para teor de água, foram pesados 5 g de grãos, também nos potes de acrílico de capacidade de 23 mL, e armazenados em refrigerador por cerca de 2 dias até a pesagem. Além disso, dois grãos provenientes da fermentação de cada tratamento foram recolhidos após a finalização do processo fermentativo e armazenados de acordo com o protocolo de preparação de amostra (descrito no ponto 4.6.2.3) até realização da análise de microscopia eletrônica de varredura e de espectroscopia por energia dispersiva.

4.6.1 Análises da bebida

4.6.1.1 Análises físico-químicas

As análises de pH, teor de sólidos solúveis e de acidez foram realizadas imediatamente após o recolhimento das amostras a fim de ser possível a detecção de qualquer intercorrência durante a fermentação, tal como, o pH ou acidez muito baixo repentinamente ou o teor de sólidos solúveis que não abaixou em 12 h de processo, podendo indicar falta da atividade dos grãos presentes na fermentação.

Utilizando o medidor de pH devidamente calibrado com as soluções tampão – MS Tecnopon®, modelo RS 232 – o eletrodo foi inserido na amostra a ser analisada e o valor de pH mostrado no display do equipamento foi lido e anotado (IAL, 2008). O resultado lido pelo equipamento pode ter variação de 0,1 para mais ou para menos.

Para avaliar o teor de sólidos solúveis da amostra, uma gota do líquido foi colocada no prisma do equipamento refratômetro analógico portátil – SBR-0032, fechando com a tampa de acrílico e posteriormente fazendo a leitura do nível de concentração de açúcar na bebida por meio do visor (IAL, 2008). De forma geral, a análise de TSS é útil para que se avalie a fermentação a partir do consumo do substrato principal, que neste caso, é a sacarose. Portanto, considera-se que a fermentação está correndo de acordo com o esperado quando o teor de sólidos solúveis da solução analisada cai ao longo do tempo do processo, apontando que os microrganismos daquela fermentação estão em plena atividade

Na análise de acidez total ou acidez titulável seguiu-se a metodologia do método titulométrico padronizada pelo Instituto Adolfo Lutz (2008), em que 10 mL de amostra junto de 100 mL de água destilada foram adicionados em um erlenmeyer de 150 mL para serem titulados com NaOH 0,1 mol/L, com fator de correção 0,998. Foram adicionadas de 3 a 4 gotas de indicador fenolftaleína nas amostras para que fosse possível identificar o ponto de viragem no momento da neutralização pela titulação.

A equação utilizada para determinação da acidez em solução molar por 100 mL:

$$\frac{V \times M \times f \times 100}{v} \quad (1)$$

Onde:

V é o volume gasto de NaOH 0,1 mol/L;

M é a molaridade da solução de NaOH;

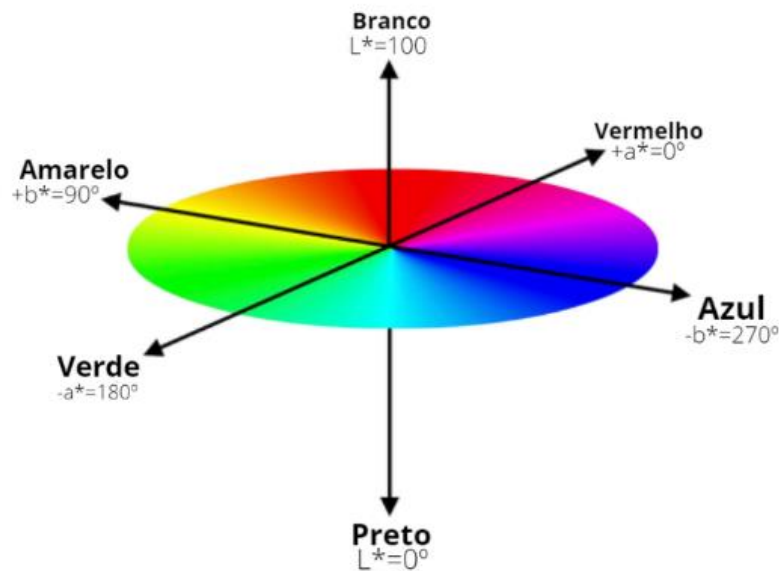
f é o fator de correção do titulante;

v é o volume da amostra em mL.

4.6.1.2 Análise colorimétrica

Com o intuito de verificar a mudança da cor das amostras de kefir de água ao longo de uma fermentação foi feita a análise colorimétrica realizada no ColorQuest XE - HunterLab®, por meio do método CIE (Comission Internationale de L'Eclairage) que tem como fundamento expressar as cores de forma numérica, que deve ser interpretada a partir de um diagrama de colorimetria nos espaços $L^*a^*b^*$ e L^*C^*h (Figura 14). Foram analisadas amostras nos 5 tempos (0 h, 12 h, 24 h, 36 h e 48 h) das 5 fermentações executadas para cada substrato, através das cubetas preenchidas com 5 mL de amostra. Para a análise de cor das amostras, o iluminante padrão definido no equipamento foi o D65 que corresponde à luz natural do dia (MORE, 2019).

Figura 14 - Diagrama para interpretação da análise colorimétrica.



Fonte: Adaptado de Belasco et al. (2020).

Para melhor compreender o sistema CIE $L^*a^*b^*$, faz-se necessário conhecer o que ele representa e apresenta como resultados. Tem-se que o sistema indica três parâmetros referentes ao espectro do iluminante utilizado em relação à reflectância do objeto em questão. Portanto, no diagrama são indicadas as cores assim como sua posição no espectro, em que a luminosidade varia do preto (total de absorção) até o branco (total de reflexão) pelo valor de L^* no eixo

vertical. O parâmetro a^* mede a cromaticidade, que representa a intensidade do vermelho (+) até o verde (-) e b^* , considerando o mesmo conceito, porém do amarelo (+) ao azul (-). O parâmetro C^* representa a saturação e h a tonalidade (BELASCO et al., 2020; DESTRO, 2017; MORE, 2019).

O equipamento então identifica os parâmetros L^* , a^* , b^* e disponibiliza os valores no sistema. Os demais parâmetros (h e C^*) foram obtidos de acordo com as Equações 2 e 3, e a diferença total de cor (ΔE) considerando as cores nos diferentes tempos analisados dentro de uma mesma fermentação foi calculada a partir da equação 4 (DESTRO, 2017):

$$h = \arctan \frac{(b^*)}{(a^*)} \quad (2)$$

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (3)$$

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + \Delta b^*)^2]^{0,5} \quad (4)$$

4.6.2 Análises dos grãos

4.6.2.1 Taxa de crescimento

Para avaliar a taxa de crescimento dos grãos, após cada fermentação, os grãos foram peneirados, levemente secos com papel toalha e pesados em balança eletrônica com duas casas decimais – Even®, BL-3200AS-BI – seguindo metodologia de Alcides; Oliveira; Bagagli (2020). A Equação 5 a seguir foi aplicada ao cálculo da taxa de crescimento dos grãos, em base úmida, apresentado em porcentagem.

$$\% \text{Ganho de massa} = \frac{(m_f - m_i)}{m_i} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

m_i é a massa inicial dos grãos antes da fermentação;

m_f é a massa final dos grãos depois de fermentados.

Figura 15 - Grãos fermentados em solução de açúcar de coco, mascavo e refinado, respectivamente.



Fonte: O autor.

4.6.2.2 Teor de água e massa seca

Para calcular o teor de água e massa seca dos grãos, cerca de 5 g de grãos (m_1) foram recolhidos após cada fermentação e armazenados em potes de 23 mL de acrílico. Os grãos foram acondicionados em refrigerador até que todas as amostras estivessem disponíveis para realização da análise. Portanto, ao fim dos 10 dias de processo, os grãos foram adicionados em cadinhos de porcelana e levados para estufa de secagem – BIOPAR®, S3SSD – permanecendo por 48 h em 105 °C, de acordo com metodologia de Laureys; De Vuyst (2017), exceto a etapa de lavagem em solução salina. Os cadinhos foram pesados vazios (m_3), depois pesados com os grãos e finalizada a etapa de secagem, foi feita a pesagem dos cadinhos com os grãos secos (m_2), e dessa forma foi possível obter o teor de massa seca, utilizando a Equação 6 e em seguida, o teor de água (Equação 7).

A equação utilizada para cálculo do teor de massa seca dos grãos foi:

$$\%ms = \frac{(m_2) - (m_3)}{m_1} \times 100 \quad (6)$$

$$\%água = 100 - \%ms \quad (7)$$

Figura 16 - Cadinhos contendo os grãos na estufa para secagem; grãos secos.



Fonte: O autor.

4.6.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva

Para a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS), foi necessário que os grãos passassem por etapas de preparação (CESÁRIO et al., 2022). Inicialmente é feita a fixação dos grãos em glutaraldeído 2,5 % diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por aproximadamente 24 h em refrigerador, em potes de acrílico. O volume do fixador deve ser cerca de 10 vezes o volume do material a ser fixado e esta etapa serve para manter a estrutura interna do material intacta, fazendo com que não haja mais atividade no seu interior e seja possível visualizar sua composição.

Após a etapa de fixação, os grãos foram lavados 6 vezes por 10 min em cada lavagem, em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 para manter o equilíbrio osmótico do grão, dificultando o ganho ou perda de água para o meio. Em seguida, foi feita a desidratação em série dos grãos, por 10 min, em etanol 30, 50 e 70 %, sendo que após esta última desidratação, é possível armazenar o material por períodos de tempo maiores, com a amostra imersa no próprio etanol. Para finalizar a etapa de desidratação, a sequência continua com etanol 80, 95 e por último, 100%, três vezes por 10 min cada.

Em seguida, foi feita a secagem em ponto crítico - (CPD) 030 Balzers. Finalizada a secagem, os grãos são fixados em stubs devidamente identificados e revestidos com fita dupla-face condutora, e cobertos com uma fina camada de ouro (15-25 nm) no metalizador - (“Sputter Coater”) Quorum Technologies®, Q150RS. Por último, é feita a observação, sob vácuo, no MEV - Leo, 1430VP, acoplado a sonda de raio-X (EDS) (BARÃO et al., 2019; CESÁRIO et al., 2022; LAUREYS et al., 2021).

Os grãos de kefir de água são estruturas que têm a capacidade de reter íons metálicos em soluções aquosas contendo açúcar e possuem atividade metabólica variável dependendo de fatores relacionados ao meio em que os grãos de kefir de água estão inseridos, como tempo de fermentação, temperatura, açúcar, pH e proporção grãos/íons de metal (VOLPI et al., 2019). Por isso, a técnica utilizada no EDS acoplado ao MEV consistiu em identificar os compostos químicos que compunham os grãos de kefir de água fermentados em diferentes substratos, a partir do espectrômetro de raios X a partir da dispersão de energia (LIMA, 2021), a fim de diferenciá-los quanto à sua composição química e verificar qual deles é constituído por mais minerais e compostos benéficos à saúde humana.

Para a determinação dos elementos a serem identificados foi tido como base a literatura consultada que indica quais os principais elementos químicos presentes nos açúcares usados como substrato. Todos foram identificados através da prévia seleção no software do equipamento utilizado para que houvesse comparação das energias devolvidas ao espectro. A partir disso, os elementos escolhidos foram: C, N, O, Na, Mg, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Cu e Zn (CHEMELLO, 2005; DESTRO et al., 2019; GUERRA; MUJICA, 2010; SOUZA et al., 2018).

Para a leitura em EDS, a configuração no equipamento foi ajustada aumentando a aceleração do feixe de elétrons de 12 kV (utilizada no MEV) para 20 kV para atingir a amostra. Por ser um método de análise que danifica a amostra pela quantidade e velocidade do feixe de elétrons, foi recomendado que as fotos da microscopia eletrônica de varredura fossem feitas antes do método de espectroscopia, já que após o EDS a amostra é descartada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises na bebida

5.1.1 pH

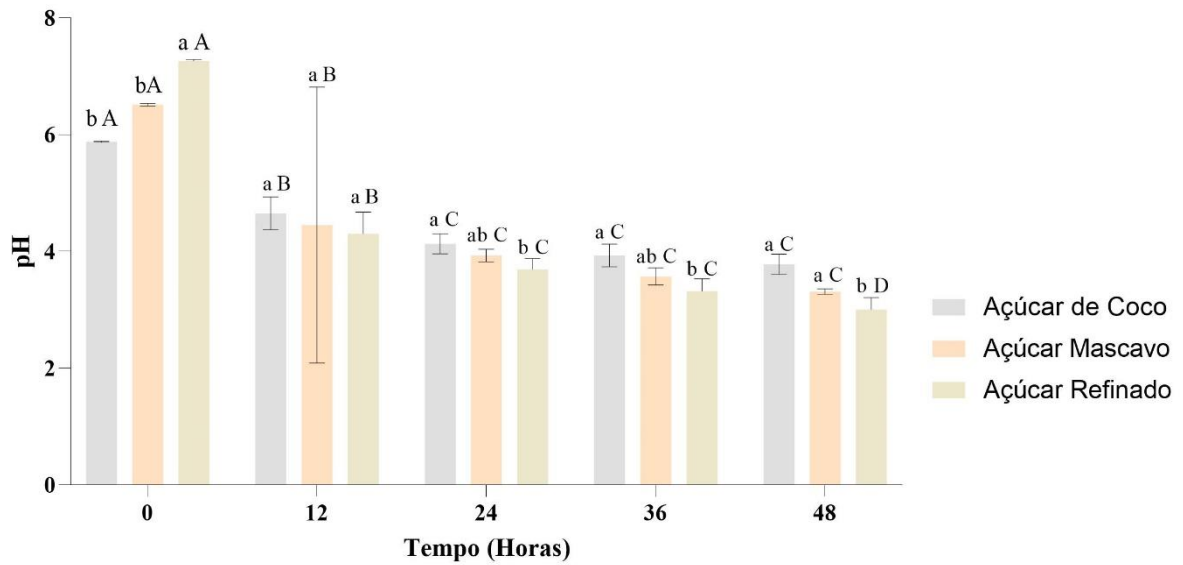
O kefir de água é uma bebida ligeiramente ácida e o seu pH pode variar dependendo de fatores como o tempo de fermentação, quantidade e qualidade do açúcar e demais ingredientes adicionados (VOLPI et al., 2019). A partir dos valores analisados de pH durante as 48 horas de fermentação dos grãos de kefir de água em diferentes substratos foi possível observar o perfil esperado para uma fermentação.

Nas primeiras 24 h as três fermentações apresentaram queda no valor do pH nos substratos de açúcar de coco e mascavo e para o açúcar refinado observou-se a queda mais relevante nas primeiras 12 h. O resultado observado é relacionado ao consumo dos substratos na fermentação, produzindo os ácidos orgânicos no meio.

No estudo realizado por Magalhães *et al.* (2010), foi feita a fermentação dos grãos de kefir de água em açúcar mascavo na concentração de 5 % durante 24 h. Nas primeiras 12 h de acompanhamento do processo foi percebida a maior produção de ácido lático e, assim como neste estudo (para o açúcar mascavo), a maior redução de pH ocorreu nas primeiras 24 h, o que os autores relataram ter relação com a produção inicial de ácidos, uma vez que posteriormente, foi notada queda nessa produção. Além de o alto valor de pH observado no final da fermentação ($4,1 \pm 0,01$) em 24 h.

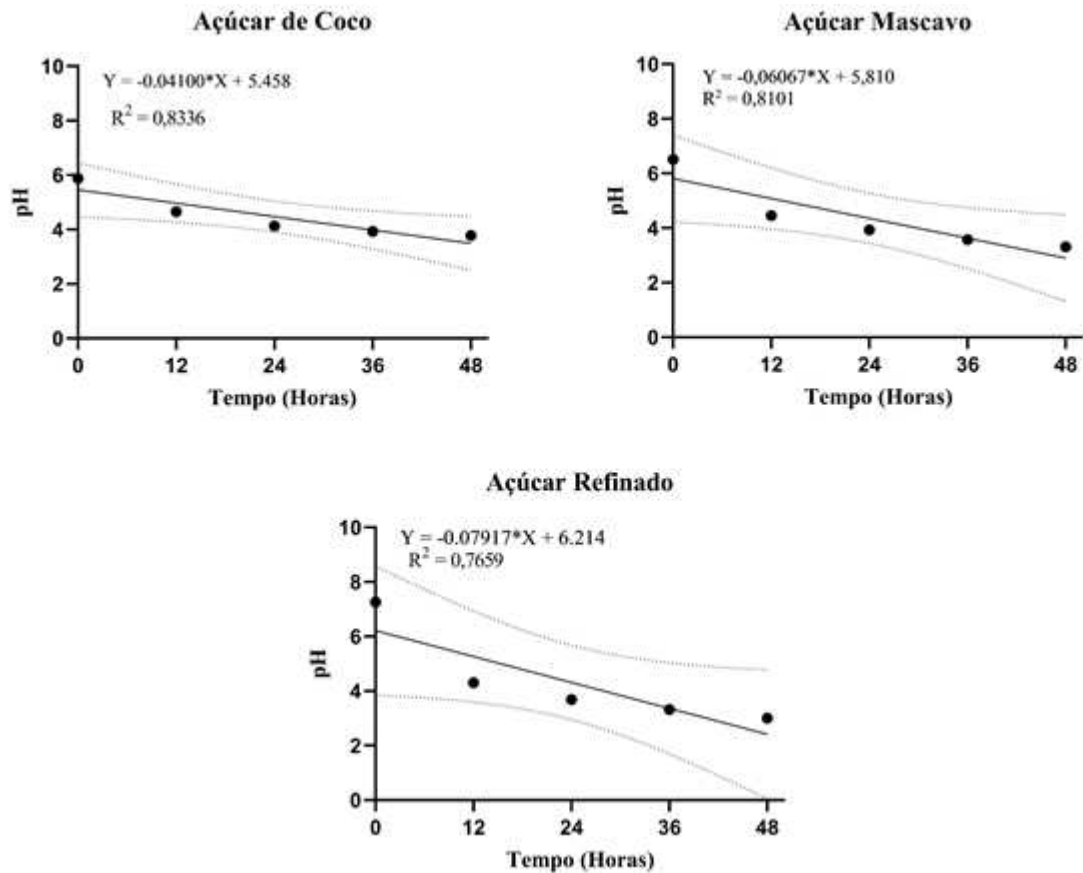
Segundo o gráfico a seguir (Figura 17), em que estão apresentados os valores de pH em barras verticais da aplicação da Análise de Variância (ANOVA), observou-se diferença estatisticamente significativa entre os valores de pH em 0 h para o açúcar refinado, assim como em 48h, em que o valor chegou a 3.

Figura 17 - Gráfico de barras verticais indicando os valores de pH ao longos das horas de fermentação e as diferenças significativas observadas.



A seguir, então representadas as equações das regressões lineares aplicadas nos valores das médias para cada tempo de fermentação em relação ao pH, em cada meio com os diferentes açúcares. A partir do R^2 observado para cada uma das expressões, pode-se notar que o maior valor é no caso do açúcar mascavo.

Figura 18 - Gráficos referentes às regressões lineares feitas a partir das médias dos valores de pH.



Segundo publicado por Fiorda *et al.* (2017), para que não haja a possibilidade de desnaturação das proteínas do meio causando instabilidade contra a deterioração da bebida além de prejudicar nas características sensoriais finais, os valores considerados desejáveis de pH para a fermentação dos açúcares pelos microrganismos nos grãos variam de 4,0 a 4,5, em um período de até 24 h. Ainda quando esse valor fique acima de 4,5, pode haver a conservação do sabor porém a bebida pode ficar mais líquida do que o desejado, no caso das fermentações em extratos vegetais (SANTOS *et al.*, 2019).

Considerando, então, o parâmetro pH, percebe-se que nesse caso, o tempo de 12 h de fermentação se aproxima do ideal para o processo a fim de promover um ambiente favorável para os microrganismos. Ou seja, em algum momento entre o período de 12 a 24 h o pH atingiria a faixa ótima e a partir disso poderiam ser avaliados os demais parâmetros envolvidos no processo. Como neste estudo o acompanhamento da fermentação foi realizado apenas a cada 12 h, se a metodologia fosse alterada para a verificação dos parâmetros para cada seis horas, a análise poderia ser mais conclusiva em relação ao tempo ideal para a fermentação dos grãos nas condições especificadas.

Em resultados publicados por Oliveira, Kawashima e Veras (2018) em relação à fermentação dos grãos de kefir de água em açúcar mascavo e açúcar refinado em diferentes concentrações, os valores de pH referentes à 10% de substrato foram similares (mascavo: 4,04; refinado: 3,43) aos valores encontrados neste trabalho (mascavo: 3,93; refinado: 3,69). No entanto, a temperatura utilizada no estudo não foi controlada e especificada (foi considerada temperatura “ambiente”), assim como houve variação no tempo de fermentação (de 18 a 24 h) e na concentração de grãos inoculados (2 a 10 %).

No estudo de Alves (2020), em que foi utilizado o extrato hidrossolúvel de coco adicionado de inulina como substrato, a fermentação ocorreu durante 48 h porém a partir dos dados de pH, foi concluído que 24 h seria o tempo mais adequado para a produção da bebida já que foi o ponto em que os valores ficaram próximos de 4,5. Foi, então, observada pelo autor maior acidez na bebida final com pH igual ou menor que 4,0, concluindo que pode ter havido maior produção de ácido acético no meio, agregando características semelhantes à do vinagre.

Utilizando açúcar mascavo e melaços puros, Gamba *et al.* (2019) observou valores iniciais de pH entre 6,01 e 6,59 e após 24 horas de fermentação, mediu-se valores entre 3,78 e 4,00. Considerando que os microrganismos utilizam o açúcar como fonte de carbono para a fermentação, foi possível acompanhar os valores de pH caindo proporcionalmente à diminuição da concentração de sólidos solúveis no meio.

Laureys e de Vuyst (2014) fermentaram 15 g grãos de kefir de água em 6g de açúcar mascavo em que o pH no tempo 0 era de $4,85 \pm 0,01$ e em 72 h de processo, o valor caiu para 3,45. Os autores acompanharam a fermentação até 192 h e o pH atingiu o valor de 3,35. Em relação aos valores encontrados no presente trabalho, os valores de pH obtidos em 36h e 48h se assemelham aos valores obtidos a 72 h e 192 h do estudo citado. Tal semelhança pode ser atribuída à concentração de grãos inoculados para consumir uma menor concentração de açúcar no meio, assim como demais fatores como composição dos grãos e forma de cultivo.

5.1.2 Teor de sólidos solúveis

Inicialmente, destaca-se que a medição dos sólidos solúveis de uma solução por meio de refratômetro portátil analógico não é considerado um método preciso devido aos erros inerentes do equipamento, assim como erro humano, devendo ser complementado com outras análises, como cromatografias. O acompanhamento deste parâmetro é utilizado para a

verificação de que o processo fermentativo está ocorrendo de acordo com o desejado ou se há a chance de existir uma contaminação.

O teor de sólidos solúveis (TSS) inicial foi previamente estabelecido em 9 °Brix e notou-se maior queda nos teores de sólidos solúveis em açúcar de coco, seguido do açúcar mascavo, indicando que os microrganismos dos grãos do kefir de água estavam consumindo consideravelmente o substrato fornecido; porém ocorreu menor variação em açúcar refinado.

Figura 19 - Gráfico de barras verticais representando o perfil do valor de teor de sólidos solúveis (°brix) em relação as horas e cada açúcar utilizado na fermentação

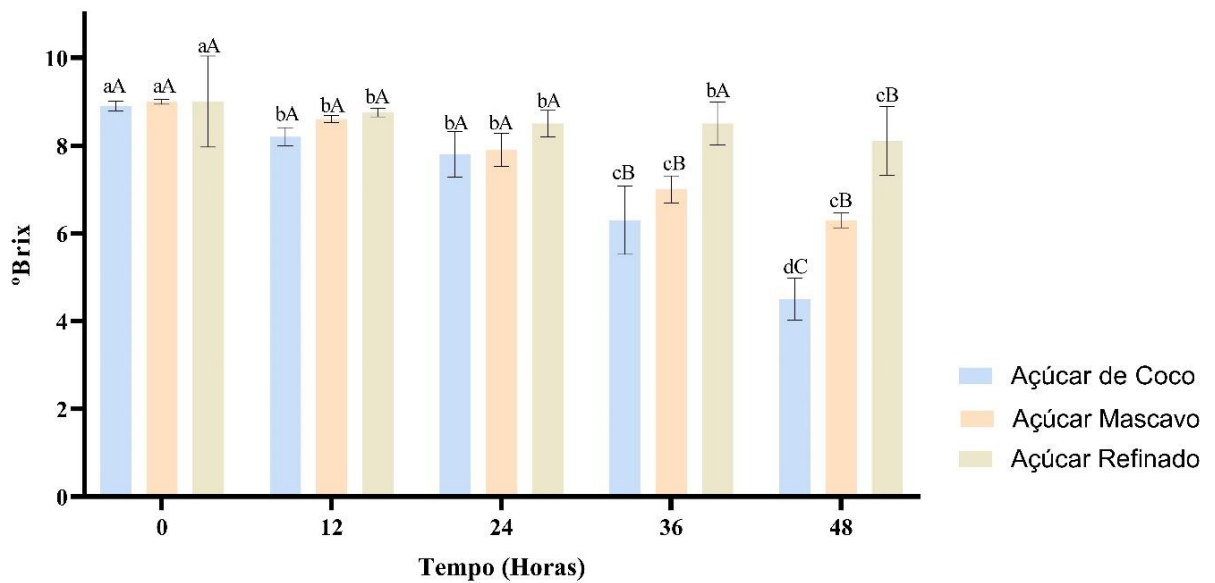
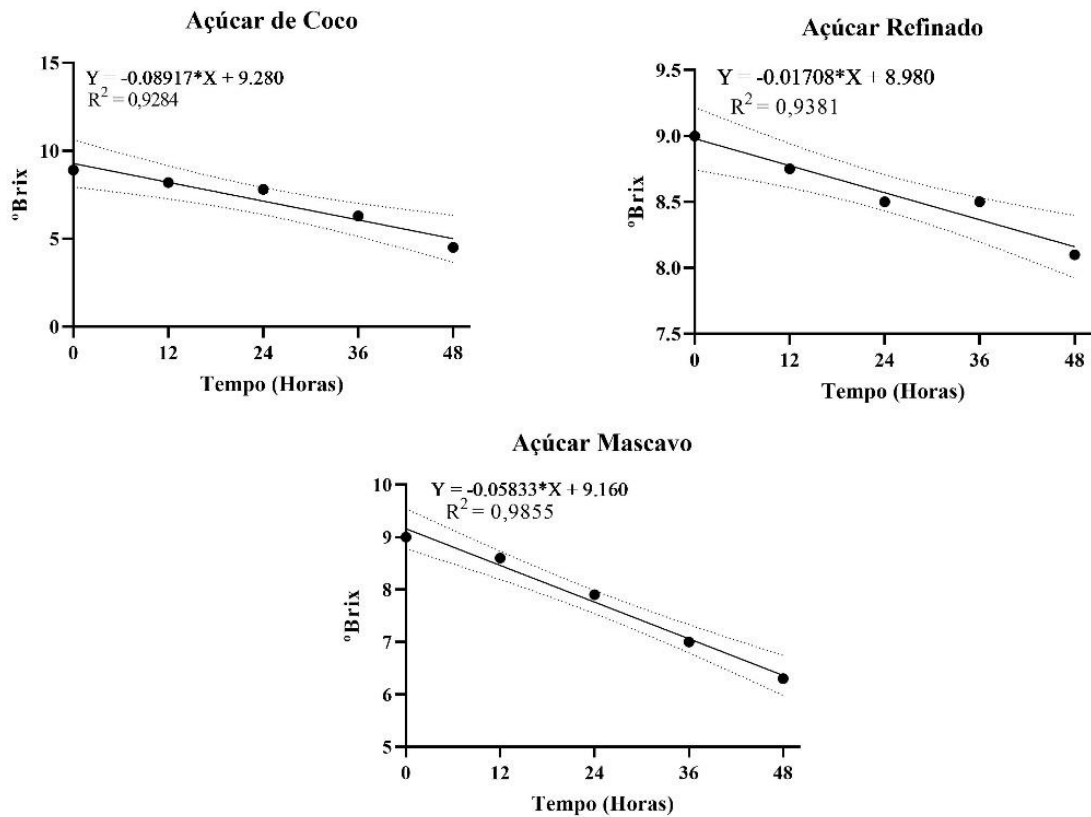


Figura 20 - Gráficos de regressão linear criados a partir das médias dos valores de teor de sólidos solúveis calculados para cada fermentação.



Em estudo feito por Alves (2020), foi citada a pesquisa de Tu *et al.* (2019) em que grãos de kefir de água foram fermentados em soro de soja e apresentaram variação do teor de sólidos solúveis de 9,2 °Brix para 4,43 °Brix em 48 h de processo fermentativo. Ainda para Alves (2020), foram produzidas formulações de açúcar de coco com inulina e goma xantana em diferentes concentrações. Na formulação contendo 10 % de açúcar de coco, 2 % de inulina e 0,26 % de goma xantana, por meio da análise de TSS realizada, constatou-se a queda de 9 °Brix iniciais para aproximadamente 7,3 °Brix em 48 horas. Assim, o autor observou uma diminuição considerável nas primeiras 24 h de fermentação, relacionando à presença de substrato disponível no meio.

Na publicação de Oliveira, Kawashima e Veras (2018), o valor encontrado de TSS para açúcar mascavo foi de 8,1 °Brix em até 24 h (semelhante ao medido neste trabalho) e para açúcar refinado 5,3 °Brix.

Apesar de, ao decorrer do tempo, a concentração de substrato ser menor para o consumo dos grãos, no caso do presente estudo, a queda mais considerável se deu nas últimas 24 h de fermentação, principalmente nos açúcares de coco e mascavo. Isto pode ter ocorrido em decorrência da atividade dos microrganismos dos grãos que podem ter levado maior tempo para

se estabilizar no meio com substrato, demorando para metabolizar os açúcares disponíveis. Além disso, deve-se levar em consideração a composição microbiológica de cada cultura em relação às leveduras e bactérias presentes para realizar o processo, o que pode interferir na correlação dos valores de pH com o de TSS encontrados para o açúcar refinado.

5.1.3 Acidez total

A acidez é um parâmetro importante de ser acompanhada, pois ela tem relação com a preservação e a vida de prateleira de bebidas como o kefir uma vez que atua como um conservante (ALVES, 2020).

Na figura 21 abaixo estão apresentados os valores obtidos para as amostras analisadas e em seguida (figura 22), está o gráfico em que estão representadas as equações obtidas a partir da regressão linear dos valores da acidez total de cada fermentação para cada açúcar utilizado.

Figura 21 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentados os valores obtidos de acidez total das fermentações ao longo das horas

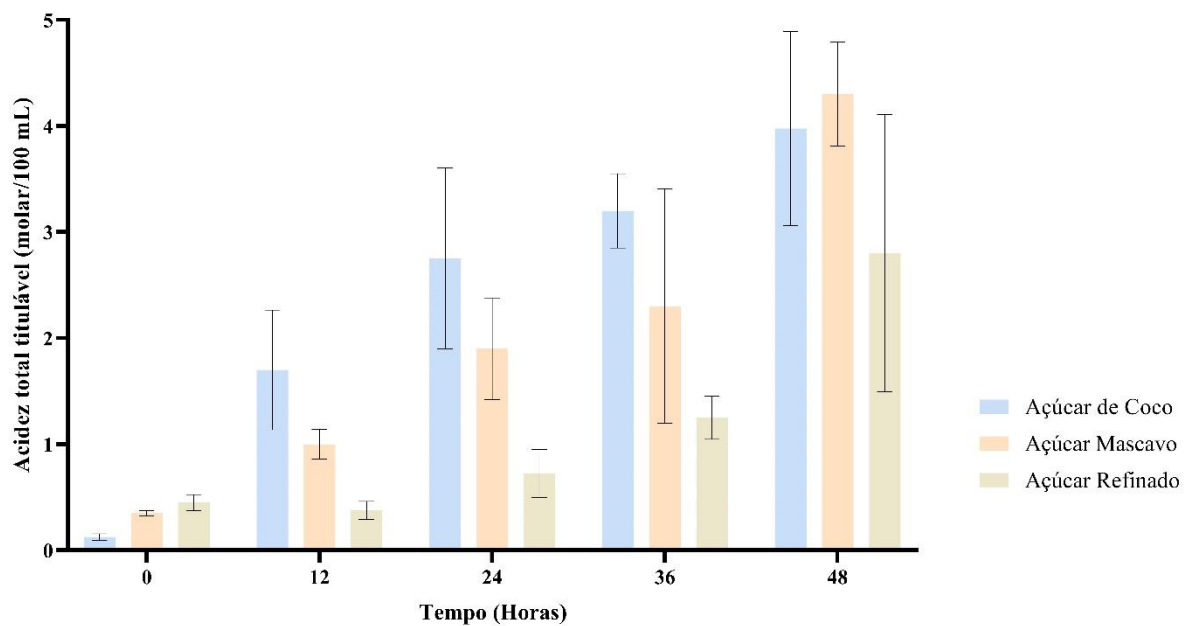
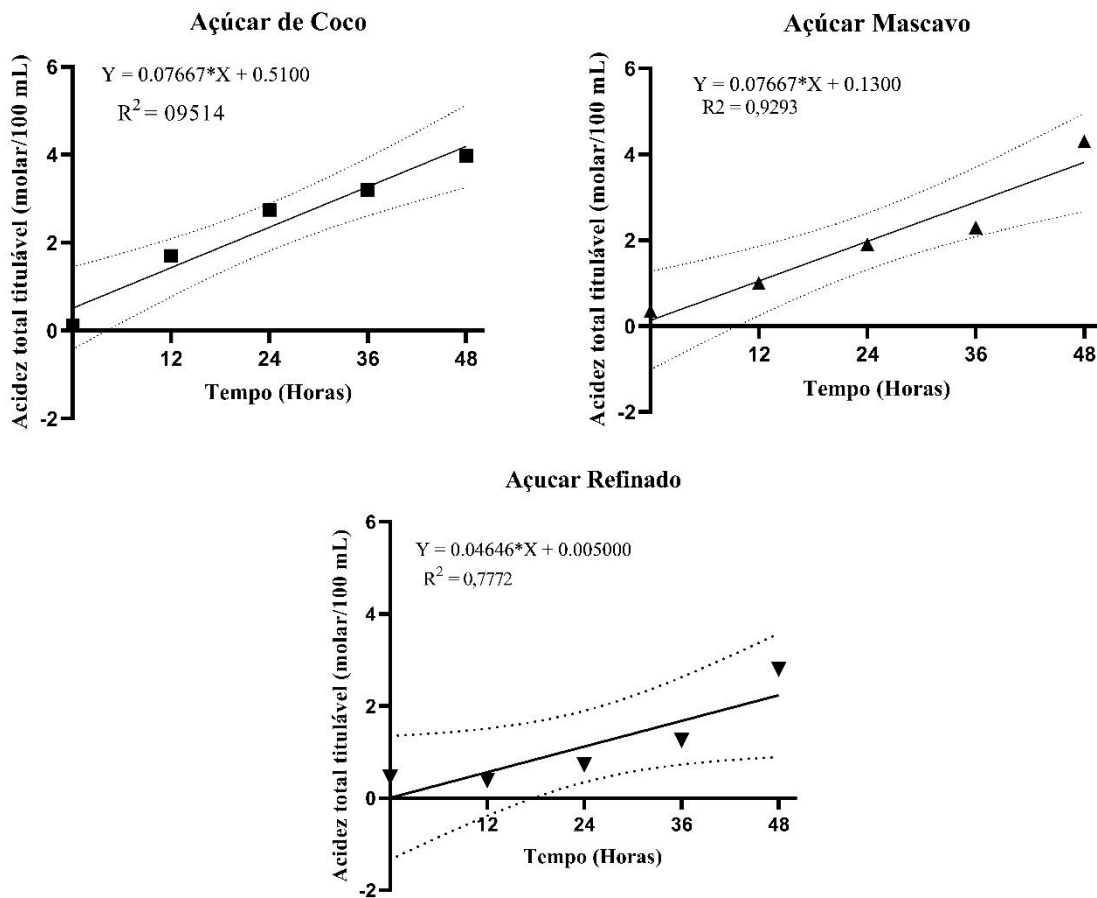


Figura 22 - Gráficos de regressão linear em que estão expressas as equações obtidas e seus respectivos coeficientes em relação à acidez total das fermentações



A acidez total titulável obtida por Magalhães *et al.* (2010), em 24 horas de fermentação, foi de 0,02 até 0,07 g/100 mL na concentração de 5 % de sacarose. Em relação à concentração do ácido láctico nas formulações produzidas com extrato hidrossolúvel de coco, Alves (2020) observou variação de 0,68 a 1,01 g/mL em 24 h de processo.

Conceição (2012) produziu bebidas de kefir de água em solução de açúcar mascavo a 5 %, 10 % e 20 %, inoculando a mesma massa de grãos (35 g) para todas as concentrações de açúcar por até 7 dias. Foi então observado o teor de acidez maior ao fim do sétimo dia na formulação com menor concentração de açúcar mascavo utilizado. A autora, então, associou o valor ácido do meio ao consumo do substrato pelos microrganismos de forma mais rápida nas primeiras 24h, considerando a menor quantidade de substrato disponível para a mesma massa de grãos inoculados.

Monar *et al.* (2014) realizaram estudos das fermentações dos grãos de kefir de água em mel de abelha, rapadura e açúcar branco em 24 h, 48 h e 72 h. Os resultados apresentaram aumento da acidez ao longo do processo, como esperado para uma fermentação; no entanto, o

maior valor de acidez obtido foi da fermentação em mel de abelha. Os autores concluíram que os valores se deram devido ao fato de o mel de abelha possuir maior concentração de frutose e glicose em relação aos outros açúcares que serviram de substrato para as bactérias responsáveis pela produção do ácido lático. Assim, a partir da análise de contagem de microrganismos, observou-se que havia significativa presença de bactérias ácido lácticas do gênero *Leuconostoc*, confirmando a hipótese dos autores.

Por se tratar de um processo fermentativo e observando os resultados da literatura consultada, a conclusão é que o kefir produzido, de forma geral, possui perfil ácido e tal característica pode apresentar diferenças significativas dependendo dos substratos utilizados. Neste trabalho, observou-se uma maior acidez total no kefir fermentado em açúcar de coco e mascavo, açúcares que possuem maior concentração de frutose e glicose, portanto, forneceram maior quantidade de substrato para a produção de metabólitos (essencialmente o ácido lático) pelas bactérias ácido lácticas. O que se deve levar em consideração, no entanto, são as características sensoriais da bebida atribuídos aos ácidos orgânicos e outros metabólitos produzidos a partir dos diferentes substratos. Para o açúcar refinado, a acidez final se diferiu significativamente dos outros dois açúcares, possibilitando a suposição de que houve menor produção de ácidos na sua fermentação.

5.1.4 Cor

A cor dos produtos fermentados pode variar durante o processo dependendo dos metabólitos formados ou a degradação de moléculas ao longo do tempo. Um parâmetro considerável na avaliação da cor é a luminosidade que no caso do kefir de água cultivado em açúcar mascavo, pode aumentar durante a fermentação em razão do consumo do açúcar pelos microrganismos que compõem os grãos (COSTA et al., 2018). No Apêndice C, na Tabela C1 são detalhados os valores médios do parâmetro luminosidade (L^*) de cada amostra em 0h, 12h, 24h, 36h e 48h nas cinco fermentações nos três tipos de açúcar. Considerando a citação de Costa et al. (2018) acima, podendo-se sugerir que o açúcar foi consumido ao longo do tempo de processo fermentativo, uma vez que os valores aumentaram, ou seja, a luminosidade foi ficando maior e a cor mais clara podendo indicar um maior consumo de açúcar. Os valores médios para os açúcares de coco e mascavo foram baixos (próximos de 0 – espectro preto) considerando que são amostras escuras e para o açúcar refinado os valores médios foram em torno de 16 a 19 (valores mais altos – entre 0, preto, e 50, cinza) caracterizando a bebida como mais clara.

Considerando o parâmetro a^* (Apêndice C, Tabela C2), foram observados valores positivos para a bebida produzida a partir dos açúcares de coco e mascavo que sugerem que as cores estão no espectro vermelho. Para a bebida produzida a partir do açúcar refinado, valores negativos (porém mais próximos de 0) que indicam cor neutra, notando-se a queda dos valores médios ao longo do processo. Já referente ao parâmetro b^* (Apêndice C, Tabela C3), valores positivos para as bebidas produzidas a partir dos açúcares de coco e mascavo, sugerindo posição no espectro amarelo e para refinado, valores negativos (próximos de 0) que indicam cor neutra, com tendência ao aumento ao longo da fermentação.

Estudos realizados por Harder, Canniatti-Brazaca e Arthur (2007), Corona *et al.* (2016) e Randazzo *et al.* (2016) avaliaram tais parâmetros em suas bebidas fermentadas em diferentes sucos de vegetais comparando os valores entre si (não foi feita a avaliação ao longo do tempo de fermentação). Os parâmetros a^* e b^* em suco de melão para Corona *et al.* (2016) foram semelhantes aos valores para açúcar refinado. Para L^* , em tais estudos, os valores foram significativamente maiores do que os obtidos neste trabalho.

O parâmetro relacionado à saturação (C^*) (Apêndice C, Tabela C4) aumentou durante o período da fermentação, assim como os valores médios de h (tonalidade) (Apêndice C, Tabela C5), exceto para o açúcar refinado que apresentou menor valor de h que o inicial. Para Alves *et al.* (2021) os valores de C^* para suas formulações fermentadas em extrato hidrossolúvel de coco e inulina, também aumentaram com o tempo, mas h diminuiu, assim como para o açúcar refinado.

Tabela 1 - Valores que representam as diferenças de cor (ΔE) entre as formulações das fermentações em diferentes açúcares em cada tempo.

	Tempo das fermentações (h)				
	0	12	24	36	48
Coco e Mascavo	4,7439	8,3576	8,8233	7,9464	6,8616
Coco e Refinado	12,7263	12,9520	13,0610	13,8750	13,7557
Refinado e Mascavo	9,7722	10,6074	11,8909	11,9363	11,5784

As diferenças de cores (ΔE – Tabela 1) foram maiores na bebida com açúcar refinado que as demais. A diferença entre as bebidas produzidas a partir dos açúcares de coco e refinado foi a maior em todos os tempos, seguido da diferença entre o mascavo e o refinado e a menor diferença entre coco e mascavo.

A turbidez das bebidas não foi analisada, porém visualmente foi possível notar diferença entre os três fermentados (das cinco repetições). No caso do açúcar de coco e mascavo não foi

observada nenhuma precipitação no fundo dos recipientes, tanto da fermentação quanto da amostra recolhida. Entretanto, no caso do açúcar refinado, foi possível notar a presença de partículas no fundo dos recipientes que se assemelhavam às células dos grãos se desfazendo ao longo da fermentação e um meio mais turvo do que no começo da fermentação.

5.2 Análises nos grãos

5.2.1 Ganho de massa

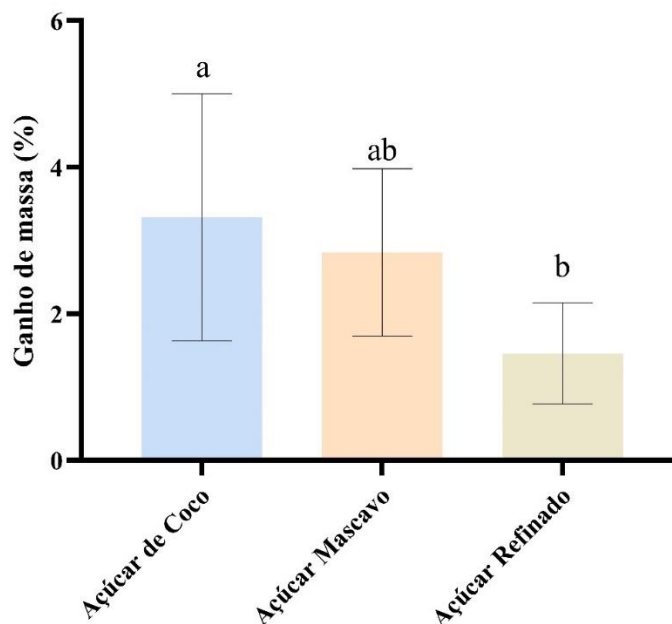
De acordo com Graça *et al.* (2018), os sólidos solúveis inicialmente disponibilizados pelos substratos são de forma geral açúcares e são utilizados durante a fermentação para favorecer o crescimento celular dos grãos, assim como para a produção de ácidos. Comprovando tal situação, Alves (2020) constatou que uma de suas formulações com maior crescimento celular foi a que apresentou menor acidez e, de forma contrária, a formulação com maior acidez foi a com menor crescimento celular.

No presente estudo essa relação não foi observada. Na fermentação em açúcar de coco, o teor de sólidos solúveis apresentou maior queda em relação aos outros açúcares, e maior acidez nos tempos 12 h e 24 h, os grãos cultivados neste substrato apresentaram maior ganho de massa. Ou seja, os açúcares disponíveis inicialmente no açúcar de coco podem ter sido consumidos e utilizados tanto na produção de exopolissacarídeo capaz de aumentar a massa dos grãos e multiplicá-los, como na produção de ácidos. No caso dos outros açúcares, o consumo dos açúcares foi menor assim como a taxa de crescimento dos grãos.

A acidez por titulação pode agregar diversos erros, desde a formulação do titulante até a observação do seu volume gasto, e como não foi realizada a análise cromatográfica para identificação dos ácidos presentes nas bebidas produzidas, não foi possível comprovar o teor de acidez.

Nesta pesquisa não foram realizados ensaios de fermentação incluindo variação na concentração de substrato, uma vez que o intuito foi identificar o comportamento dos grãos em diferentes substratos. No entanto, Conceição (2012) testou concentrações de açúcar mascavo em fermentações dos grãos de kefir de água em 1, 3 e 7 dias, à temperatura de 28 °C, e identificou o maior aumento da biomassa dos grãos a 20 % de substrato durante 7 dias. Houve aumento significativo da massa em 10 % de açúcar, também no dia 7 e em 5 % de concentração do açúcar mascavo, não foi observada diferença significativa na massa dos grãos.

Figura 23 - Gráfico de barras verticais em que estão indicados os valores de ganho de massa obtidos ao longo das fermentações.



O ganho de massa dos grãos, além da multiplicação dos microrganismos e aumento da massa de EPS, inclui a capacidade do polímero de glicose, dextrana, de reter água do meio (CONCEIÇÃO, 2012). Portanto, sugere-se que grãos com maior massa final apresentam maior retenção de água, o que leva a crer que a quantidade de dextrana produzida, também é maior.

Nascimento *et al.* (2022) avaliou a fermentação de grãos de kefir de água em biomassa de spirulina em menor e maior concentração por 48 h, comparada com a fermentação em açúcar mascavo. O resultado observado foi o maior crescimento na presença de mais biomassa de spirulina (aproximadamente 160 %), na menor quantidade de spirulina o aumento foi de 127 % e para o cultivo em açúcar mascavo, 77 %. A conclusão foi que a biomassa de spirulina é uma opção viável para o crescimento dos grãos de kefir de água, além de ter apresentado conteúdo de proteína em cerca de 48 %.

Laureys e De Vuyst (2014) obtiveram aumento na massa dos grãos, em 24 h de fermentação, de 16,4 g para aproximadamente 28 g (cerca de 70 % de aumento), permanecendo constante até o final das 192 h consideradas. Gamba *et al.* (2019) observou crescimento da biomassa dos grãos de kefir de água em 3,94 vezes para 5 % (m/v) de açúcar mascavo por 24 h.

Os valores de taxa de crescimento obtidos neste trabalho foram considerados significativamente baixos quando comparados à literatura. Fatores relacionados à origem e

condição de cultivo podem ter influenciado tal resultado, como proporção de açúcar, água e grãos, temperatura, tempo de fermentação e lavagem excessiva dos grãos entre uma fermentação e outra.

5.2.2 Taxa de massa seca e teor de água

O teor de água calculado nos grãos de kefir de água são referentes à composição dos grãos associada com a retenção da dextrana produzida. A massa seca consiste em $5,6 \pm 1$ % de proteínas e $10,1 \pm 2,5$ % de carboidratos, na estrutura do grão em si, incluindo matriz polissacarídica e massa microbiana (GARROTE, ABRAHAM; DE ANTONI, 2001).

Os valores de massa seca e de teor de água obtidos neste estudo estão representados, respectivamente, nas figuras 24 e 25 a seguir:

Figura 24 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de massa seca calculadas nos grãos.

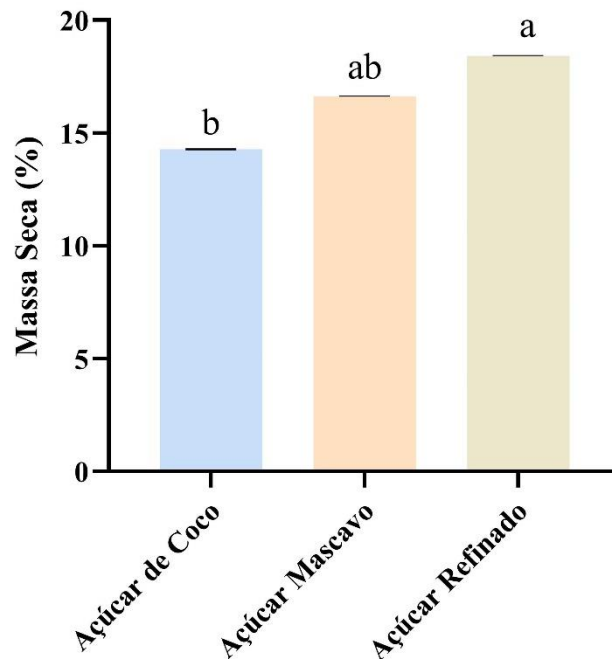
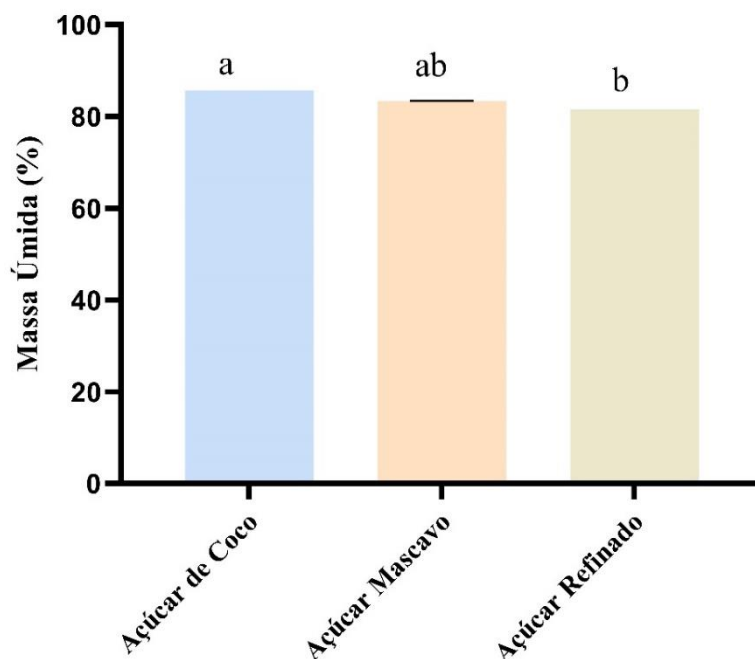


Figura 25 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de teor de massa úmida nos grãos nas diferentes fermentações.



Os valores calculados de teor de massa seca e teor de massa de água foram compatíveis com os resultados apresentados na literatura consultada por alguns autores. Destaca-se a porcentagem de massa seca em torno de 13% até cerca de 17%. Para o teor de massa úmida, verificou-se a faixa entre 80% e cerca de 97%.

Magalhães *et al.* (2010) realizaram fermentações dos grãos de kefir de água em 5 % de açúcar mascavo e observaram aumento da umidade (80,5 para 91,5 %) e do teor de massa seca (13,1 para 22,1 %) em 24 h de processo.

Laureys e De Vuyst (2014) avaliaram o crescimento de 13,8% para 16,7 % da massa seca dos grãos cultivados em açúcar mascavo após 3 h de fermentação; no restante do processo, a massa seca caiu e permaneceu estável entre 13 e 14 % (m/m).

Para Dwiloka, Rizqiyati e Sentiani (2020), na fermentação dos grãos em água de coco, foi concluído que o tempo de processo teve efeito significativo na taxa de água, uma vez que em 48h, a taxa de água chegou a 97,35 % e nos tempos menores a taxa de água também foi menor, como 97,14 % em 12 h.

5.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A aplicação desta técnica foi relevante para comprovar a presença de diversos microrganismos no interior do grão de kefir de água, sendo observada a partir das imagens obtidas, então, a presença de microrganismos dependendo do substrato utilizado na fermentação. As fotos escolhidas de diferentes fermentações não causaram prejuízo na análise dos resultados, uma vez que não houve diferença aparente entre as estruturas observadas nas fotos entre uma fermentação e outra.

A partir das fotos produzidas pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (Figuras 17 a 20) foi possível observar distinções entre as estruturas e distribuição dos grãos das fermentações nos açúcares utilizados.

Em uma análise representativa, os grãos inteiros (figura 17) apresentam superfícies igualmente irregulares, sendo possível notar que a estrutura do grão cultivado em açúcar de coco apresentou rachaduras profundas e aparentes provavelmente decorrentes do processo de preparo na etapa da desidratação ou, considerando a multiplicação e formação de outros grãos a partir de um, esta pode ter sido uma etapa anterior à separação do grão que foi descontinuada durante a preparação do material para a análise. No grão de açúcar mascavo, notou-se também a presença de rachaduras, porém de forma superficial em relação ao grão de açúcar de coco, podendo-se entender que este é um grão ainda longe do processo de multiplicação ou menos danificação pelo preparo para a análise. Em ambos os grãos cultivados em açúcar de coco e mascavo foi observada uma superfície inteiriça, diferente do que se pôde avaliar no grão de açúcar refinado que apresentou uma estrutura com aspecto despedaçado em determinados pontos, indicando desintegração do grão ao longo da fermentação.

Na figura 18 estão dispostas as imagens dos grãos no aumento de 3.000x em que é evidenciada a presença de microrganismos na superfície externa.

No estudo realizado por Bueno *et al.* (2021), a microscopia foi utilizada como análise complementar e as imagens dos grãos de kefir de água fermentados por 24 h em açúcar mascavo tornaram possível concluir que na parte externa dos grãos existia uma associação complexa entre os microrganismos presentes, identificando-os como leveduras esféricas e com formato de limão e bactérias lácticas curtas e longas, sem prevalência de qualquer espécie, já que todos os microrganismos estavam uniformemente dispostos na superfície do grão.

Nas imagens abaixo, percebe-se a presença de microrganismos como bactérias e leveduras no exterior dos grãos de açúcar de coco e mascavo melhor distribuídos, enquanto há uma maior quantidade leveduras na parte de fora do grão de açúcar refinado, porém dispostos de forma mais espaçada.

Mesmo avaliando os grãos de kefir cultivado em leite, Oliveira *et al.* (2020) cita estudo realizado por Friques *et al.* (2015) que confirmam a semelhança da característica probiótica do kefir de leite com o cultivado em água a partir da observação da presença de leveduras e bacilos curtos e longos associados à matriz polissacarídica dos grãos avaliados.

Apesar das observações a partir das imagens corroborarem com as informações analisadas da literatura consultada, não é possível afirmar que isso ocorre em toda a superfície destes e do restante dos grãos, sendo também necessário considerar que a microscopia, em diversos estudos, é utilizada como análise complementar.

As fotos que mostram os microrganismos observados no interior dos grãos nas fotos obtidas neste estudo (figura 19) tiveram imagem aproximada de 5.000 x e apresentam características diferentes entre os grãos. No cultivo em açúcar de coco, foi notado equilíbrio entre a presença de leveduras e diferentes espécies de bactérias, enquanto no grão cultivado em açúcar refinado, há predominância observada de leveduras com pouca presença de bactérias. No caso do açúcar mascavo, as bactérias presentes identificadas possuem menor tamanho do que as bactérias no grão de açúcar de coco, porém ainda assim, estão mais notáveis do que as bactérias no açúcar de coco.

Çevik *et al.* (2019) utilizaram melaço de uva, açúcar mascavo, açúcar refinado e mel como substratos para produção das bebidas que foram analisadas microbiologicamente por meio de plaqueamento. Os resultados apontaram que o fermentado de melaço de uva continha elevada quantidade de microrganismos, seguido do fermentado de mel, em seguida o fermentado de açúcar mascavo, e por fim, o kefir de água produzido a partir da fermentação dos grãos em açúcar refinado. Os autores, por fim, concluíram que o açúcar refinado afetou de forma negativa a população microbiana dos grãos do kefir de água, e apesar de não ter sido realizada a análise no MEV dos grãos utilizados no estudo, pode se considerar que os grãos em si não possuíam grande variedade e quantidade de microrganismos dispostos na sua estrutura para realizar uma fermentação desejável.

Gamba *et al.* (2021) escolheram açúcar mascavo e melaços puros de cana para sua fermentação e a partir de seus resultados sugerem que o ácido acético e/ou o etanol no kefir de água modulam a predominância e sucessão de bactérias ácido lácticas específicas dando exemplo da diversidade na sucessão de bactérias ácido acéticas. Os autores citam três espécies de bactérias ácido lácticas encontradas nos grãos (*L. nagelii*, *L. hilgardii/diolivorans* e *L. casei/paracasei*) que, apesar de ter a contagem diferente nas fermentações com diferentes tipos de açúcar, consideram que o ácido acético ou o etanol em conjunto com a tolerância a esses

compostos, interferiu na sucessão dessas espécies dominantes no meio fermentativo. Os autores ainda sugerem um estudo em relação às leveduras presentes para entender melhor as relações dos microrganismos com os compostos presentes.

Magalhães *et al.* (2010) descrevem os grãos nas fotos obtidas através da microscopia como grãos constituídas de superfície suave no interior sem constatação da presença de bactérias e paredes externas revestidas por agrupamentos de microrganismos que foram caracterizados como “células de leveduras com forma de limão crescendo em associação com bactérias (longas e curvadas)” enquanto apresentaram relevante distribuição de leveduras no interior. Em resultados de plaqueamento e de outras análises microbiológicas, os autores identificaram as bactérias ácido lácticas *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc citreum* que não foram observadas nas fotos do MEV. A hipótese utilizada foi de que houve baixa adesão dessas bactérias aos grãos podendo ter resultado na perda desses microrganismos para o meio durante o processo de fermentação.

Laureys *et al.* (2021) visualizou os grãos de kefir de água no MEV e observou a superfície externa coberta por microrganismos em uma mistura de leveduras e bactérias ácido lácticas. Em outras áreas observadas foi possível encontrar agrupamentos compostos exclusivamente de leveduras ou somente de bactérias ácido lácticas. No entanto, ao observar o interior dos grãos cortados, os autores não definiram os microrganismos presentes nas superfícies.

Estudos afirmam que a contagem de microrganismos no kefir de água podem variar dependendo da temperatura e do tempo de fermentação, tipo e concentração do açúcar utilizado e também tempo de armazenamento, tanto da bebida quanto dos grãos (ÇEVIK *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2021; OZCELIK; AKAN; KINIK, 2021). Como exemplo, Gamba *et al.* (2019) fermentou seus grãos em diferentes soluções de açúcar observando considerável diversidade da composição microbiana, diferença que também foi constatada entre os grãos e as bebidas produzidas.

Neste estudo, foi observada presença de leveduras (notavelmente em maior quantidade no grão de açúcar refinado), bactérias ácido lácticas (*Lactobacilos* em grande concentração tanto no grão em açúcar de coco quanto no grão em açúcar mascavo) e bactérias ácido acéticas (possivelmente do gênero *Acetobacter*).

Um fator importante a ser levado em consideração é o preparo das amostras para a análise que conta com uma etapa de lavagem dos grãos. Essa etapa, quando realizada em excesso ou de forma inapropriada, pode acarretar na perda de microrganismos dos grãos,

prejudicando a avaliação das imagens. Além disso, o pH mais baixo observado nas amostras fermentadas em açúcar refinado sugerem que o ambiente ácido fornecido aos microrganismos foi desfavorável para algumas espécies de bactérias não resistentes ao meio de acidez elevada, considerando também a existência de competição entre leveduras e bactérias, que neste meio, as leveduras podem ter se sobressaído. Enquanto nas fotos dos microrganismos observados nos grãos em açúcar de coco e mascavo, é possível identificar bastões de bactérias presentes no seu interior.

A dextrana também foi observada nas imagens capturadas pelo MEV (figura 20) por ser caracterizada como o principal polissacarídeo que compõe e possui a função de agrupar os microrganismos nos grãos de kefir.

Nas fotos acima consegue-se identificar a presença mais predominante nos grãos de açúcar de coco e de açúcar mascavo, ao contrário do grão em açúcar refinado, em que é possível constatar a formação do EPS, porém em menor quantidade e de maneira irregular. Tal consequência pode ser atribuída ao fato de que a produção do EPS é relacionada à presença de bactérias ácido lácticas nos grãos de kefir (WANG et al., 2022) e, uma vez que não foi possível identificar razoável presença dessas espécies de bactérias nas fotos obtidas do grão de açúcar refinado, conclui-se que a produção de EPS neste caso foi menos intensa do que nos demais grãos.

De acordo com autores que realizaram microscopia dos grãos de kefir de água confirma-se a observação de um biofilme bem estruturado e organizado na superfície externa dos grãos diferentemente da porção interna que é formada por uma estrutura desorganizada porém aparentemente resistente que é capaz de agrupar e aderir os microrganismos nas paredes dos grãos (MAGALHÃES et al., 2010; NEVE; HELLER, 2002).

Hsieh *et al.* (2012) avaliou grãos de kefir de água fermentados em leite de vaca e cabra, e pelas imagens por MEV constatou a presença de uma camada de EPS que foi responsável pela aderência dos microrganismos daquela microbiota. Os autores ainda afirmam que o EPS produzido envolve, protege e mantém a estabilidade dos microrganismos que compõem o grão.

Ao final das fermentações realizadas neste estudo, era observada a presença de precipitado apenas nos recipientes que continham açúcar refinado e a integridade dos grãos retirados do meio estava comprometida. Relacionando esta informação ao fato de que a presença do EPS protege a estrutura dos grãos e que no grão de açúcar refinado o exopolissacarídeo não foi identificado em notável quantidade, pode-se concluir que o grão de

kefir de água fermentado em açúcar mascavo teve menor estabilidade e menos possibilidade de se manter íntegro ao longo das fermentações.

Figura 26 - Imagens dos grãos de kefir de água inteiros gerados pelo MEV, em aproximação de 100x. A) grão inteiro resultante da fermentação em açúcar de coco; B) grão resultante da fermentação em açúcar mascavo; C) grão cultivado em açúcar refinado.

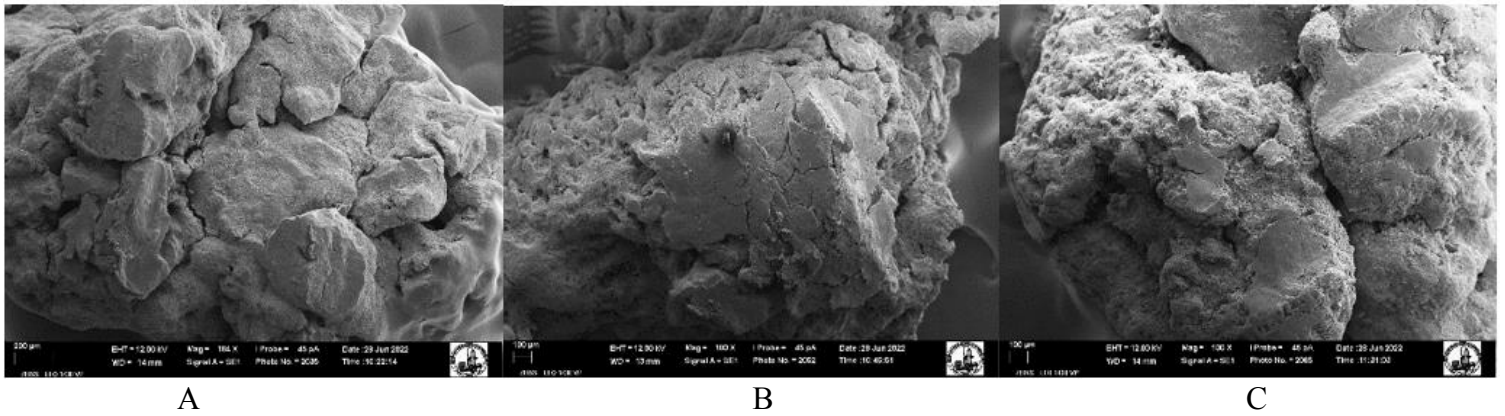


Figura 27 - Imagens da superfície externa dos grãos de kefir de água aproximada em 3.000x. A) grão cultivado em açúcar de coco; B) grão cultivado em açúcar mascavo; C) grão cultivado em açúcar refinado.

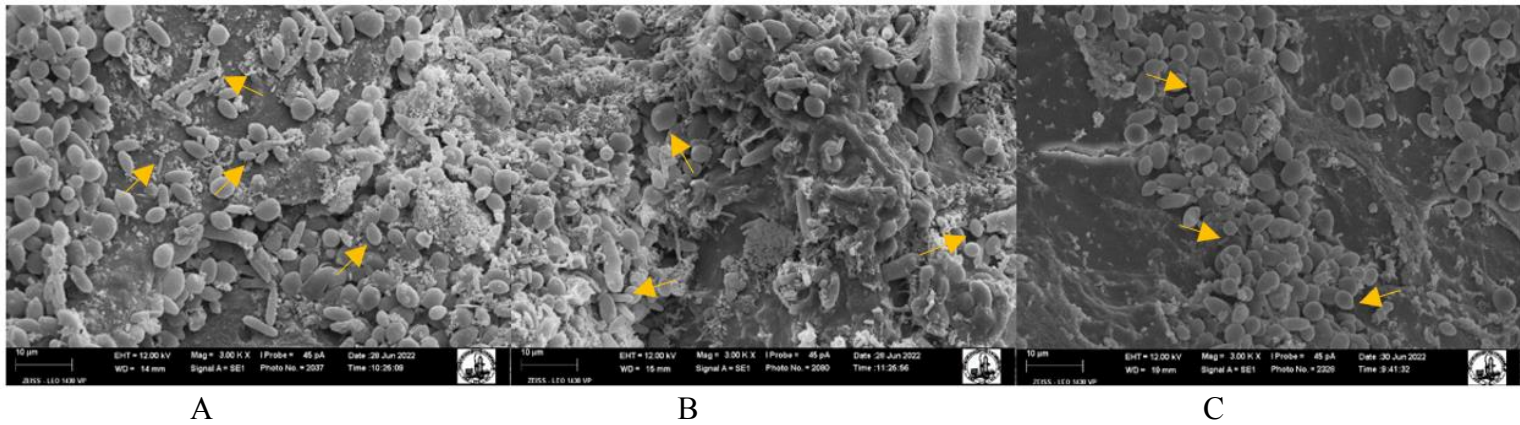


Figura 28 - Microrganismos observados no interior dos grãos avaliados no MEV. A) grão cultivado em açúcar de coco com zoom de 5.000x; B) grão resultante da fermentação em açúcar mascavo com zoom de 3.000x; C) grão cultivado em açúcar refinado com zoom de 3.000x.

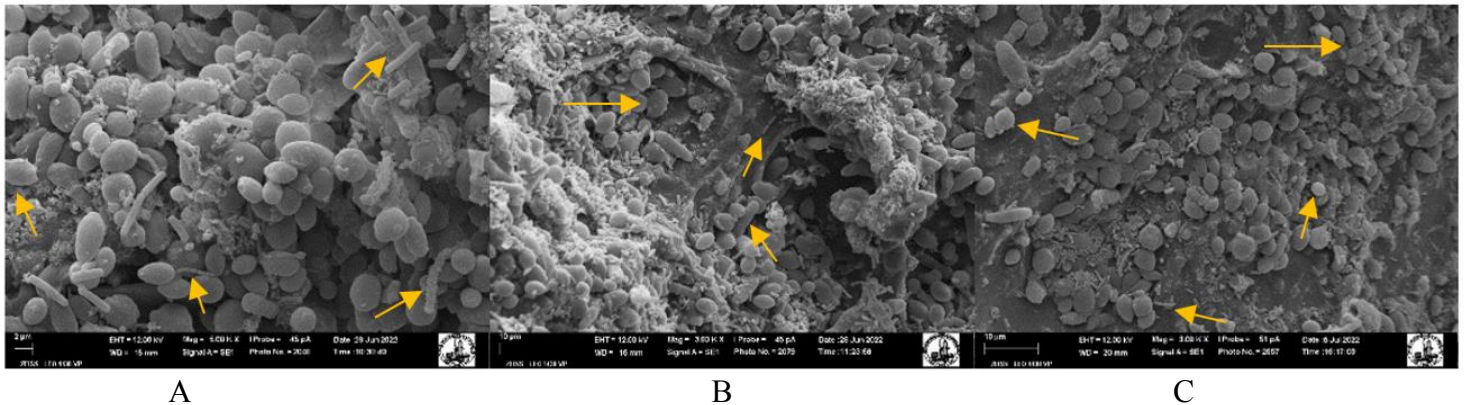
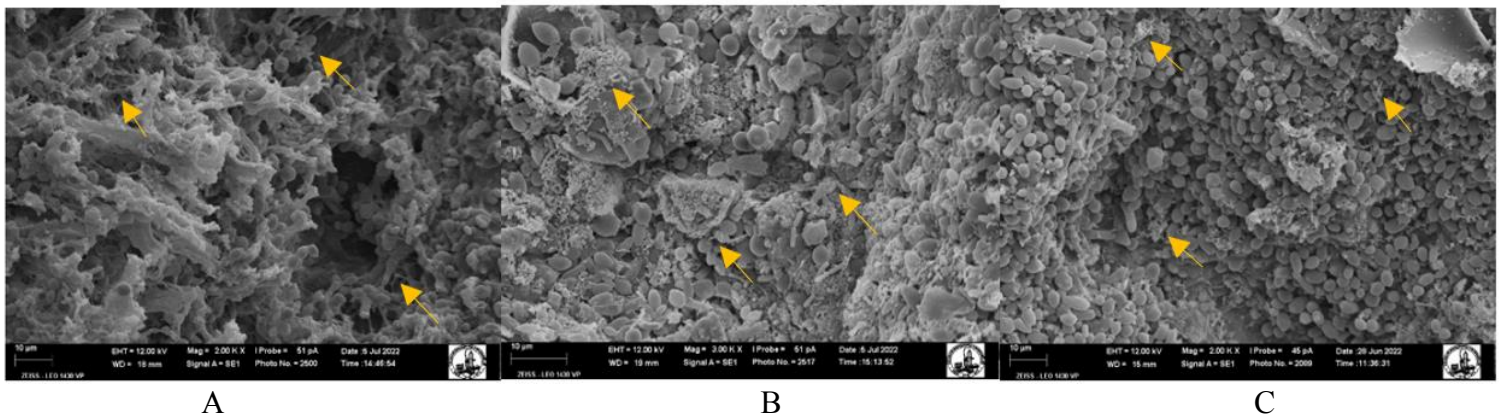


Figura 29 – EPS observado nas fotos obtidas por meio do MEV. A) grão cultivado em açúcar de coco com aproximação de 2.000x; B) grão cultivado em açúcar mascavo com aproximação de 3.000x; C) grão cultivado em açúcar refinado com aproximação de 2.000x.



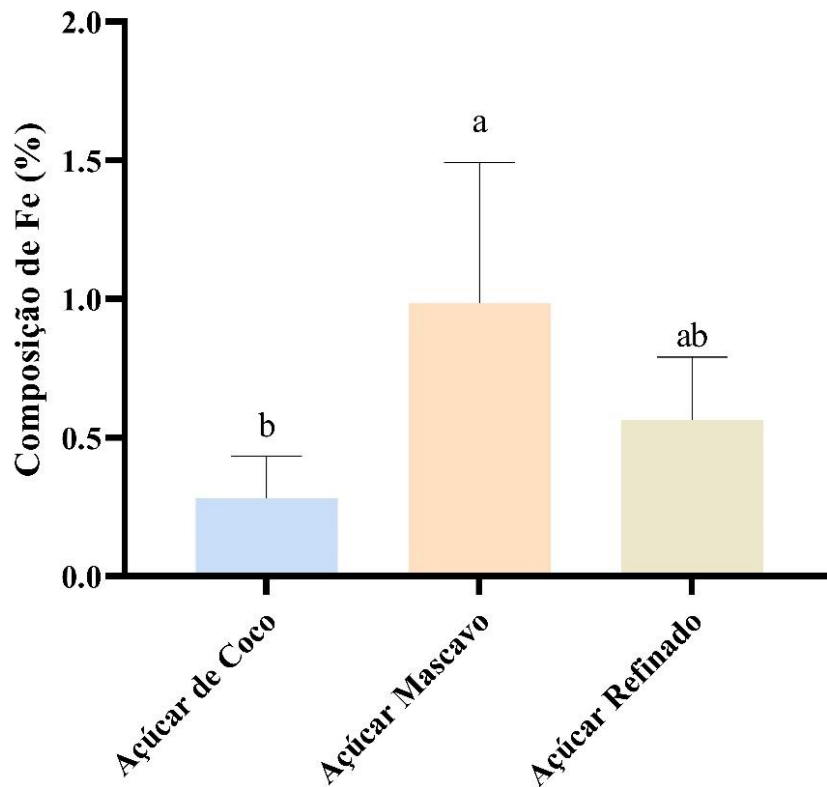
5.2.4 Espectroscopia de Energia Dispersiva

Na literatura, não foram encontrados trabalhos que utilizaram o método de espectroscopia de raios X por energia dispersiva para caracterizar os grãos de kefir de água quanto aos compostos químicos que os formam. Porém, no estudo de Destro (2017) foi realizada a análise dos componentes da bebida produzida, e não dos grãos, utilizando espectro de emissão atômica com fonte de plasma. Tal método se diferente da análise realizada neste estudo assim como a amostra analisada, no entanto, considerou-se válida a utilização dos resultados para complementação deste estudo.

Dentre todos os elementos detectados pelo método EDS acoplado ao MEV, de acordo com a ANOVA, apenas nos dados referentes ao elemento ferro (Fe) houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras. A diferença identificada foi em relação às médias das

amostras de grãos de kefir de água fermentados em açúcar de coco e mascavo, enquanto para o açúcar refinado não houve diferença entre os demais.

Figura 30 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de Ferro presentes na composição dos grãos analisados após cada fermentação nos diferentes açúcares.



De acordo um estudo realizado por Guitel (2018), os valores que foram apresentados em uma tabela nutricional dos açúcares de coco, mascavo e refinado a partir do publicado pelo Philippine Food and Nutrition Research Institute, são referentes às partes do macronutriente por 1 milhão de partes de açúcar, e para o ferro, a concentração no açúcar de coco é de 22 ppm e para os açúcares mascavo e refinado, o valor é 0,6 ppm, ou seja, significativamente superior.

Neste estudo, no entanto, as médias de valores (em porcentagem) apresentados nas amostras de grãos que foram utilizados na fermentados em açúcar de coco foram menores do que nos outros açúcares.

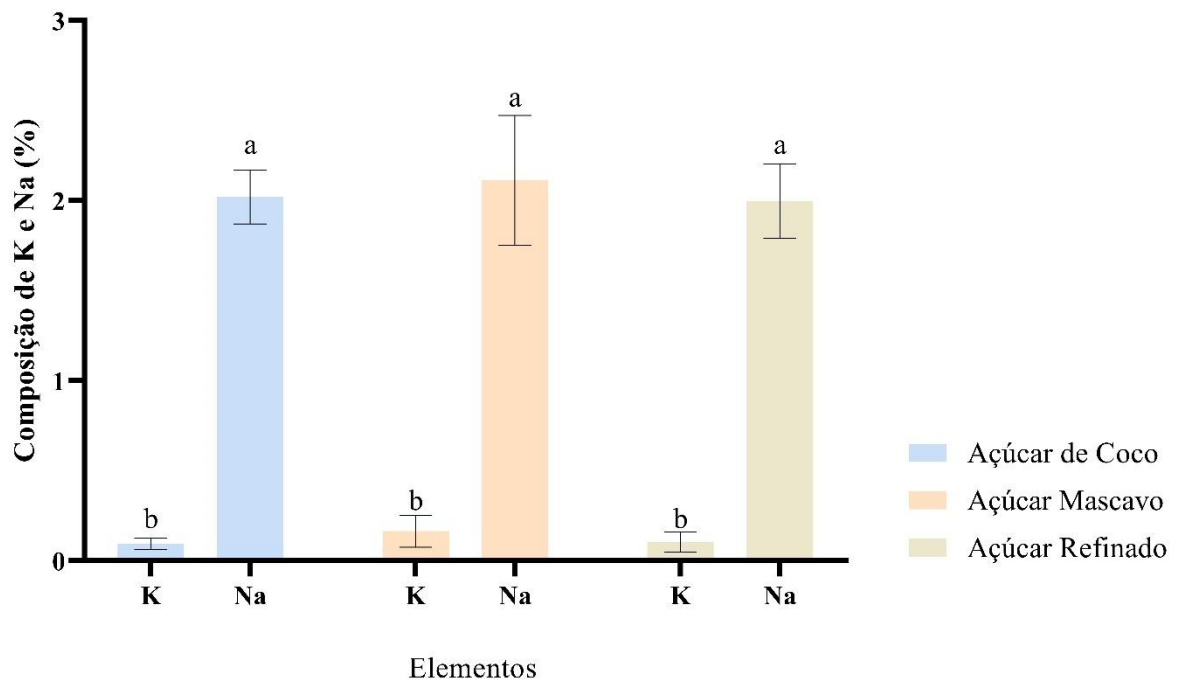
Segundo Wrage et al. (2019), o processo produtivo do açúcar de coco não possui padronização estabelecida e, portanto, a composição do açúcar pode ser diferente quando métodos distintos de produção são utilizados (assim como acontece com o kefir de forma geral).

Outro fator de relevância é o metabolismo dos microrganismos que constituem os grãos de kefir. Os nutrientes fornecidos pelos substratos são consumidos pelos microrganismos para

seu crescimento sendo importantes, por exemplo, para a respiração celular. O ferro faz parte desse processo (MADIGAN et al., 2016 apud DESTRO, 2017) e então, considerando que sua disponibilidade foi inicialmente maior do açúcar de coco, pode ter ocorrido maior consumo por parte dos seus microrganismos.

Além da diferença observada entre os valores encontrados pela metodologia de EDS e a tabela nutricional para o ferro, os demais elementos indicados apresentam diferenças significativas nas composições dos açúcares, o que não ocorreu neste estudo. Como para potássio e sódio (Figura 31), que em açúcar de coco apresentam valores significativamente maiores do que nos demais açúcares, porém tal diferença não foi observada pela análise em EDS nos grãos.

Figura 31 - Gráfico de barras verticais em que estão apresentadas as porcentagens de K e Na na composição dos grãos analisados após as fermentações utilizando os diferentes açúcares.



Destro (2017) produziu bebidas utilizando açúcar mascavo orgânico, convencional e com polpa de jabuticaba e analisou a bebida produzida por espectrômetro de emissão atômica com fonte de plasma, porém não fez a identificação dos compostos nos grãos. Dos gráficos dispostos pela autora no seu estudo é possível observar o mineral Fe em maior quantidade no fermentado de açúcar mascavo em 0 h de processo e após 56 h de fermentação, o teor de ferro decaiu na amostra. Ocorrendo de forma contrária com o potássio que em 0h apresentou nível menor que quando avaliado em 56 h de processo.

Um estudo feito por Volpi *et al.* (2019) avaliou o potencial dos grãos de kefir de água de absorver íons de metais pesados a fim de reduzir a poluição das águas de forma segura e eficiente. Os autores verificaram que na presença de sacarose, favorecendo condições ácidas, a atividade metabólica foi capaz de reter os íons metálicos nas superfícies dos grãos, absorvendo particularmente íons de Cr, Cu, Mn, Ni e Pb. Por fim, foi concluído que o valor inicial ideal de pH para o resultado desejado é de 4,5 depois de 24 h de fermentação, considerando que em um pH inicial de 3,5 não ocorreu absorção dos íons que permanecem na solução, e um valor inicial de 6,0 causou a absorção imediata dos íons no meio.

Apesar das diferenças observadas, a comparação entre a composição do açúcar e do grão fermentado não devem ser levadas em consideração quando o intuito for verificar qual substrato favoreceu mais para a produção de uma bebida melhor em termos de nutrientes. Neste caso, o correto seria comparar com outros estudos que realizaram a mesma análise, ou analisar a bebida final produzida em relação aos seus componentes. Com este espectro geral seria possível concluir qual dos açúcares favoreceu uma fermentação com resultado mais “saudável”.

6 CONCLUSÃO

As bebidas produzidas pela fermentação dos grãos de kefir de água em açúcar de coco, mascavo e refinado não foram idênticas, apresentando diferenças significativas.

De forma geral, as bebidas produzidas apresentaram perfil ácido dentro do esperado para os açúcares de coco e mascavo, já para o açúcar refinado, os valores se diferiram dos demais. O teor de sólidos solúveis apresentou queda a partir das primeiras 24h de fermentação até as 48h finais do processo.

O ganho de massa dos grãos foi maior quando usado o açúcar de coco. Os grãos fermentados em açúcar refinado apresentaram menor taxa de ganho de massa podendo ser relacionado ao observado nas imagens produzidas pela análise de microscopia eletrônica de varredura, que os grãos neste substrato apresentaram menor formação de exopolissacarídeo com menor presença de microrganismos aderidos a ele. Os grãos em açúcar mascavo mantiveram um nível médio entre os outros açúcares.

Por meio das imagens obtidas por MEV foi possível concluir que os grãos de açúcar mascavo apresentaram melhor formação de exopolissacarídeo em seu interior, assim como em algumas fotos obtidas dos grãos em açúcar de coco. Nos grãos em açúcar refinado, a quantidade de EPS observada foi menor e a presença de leveduras foi maior do que nos outros grãos que possuíam diversidade de bactérias na sua colônia.

Com relação aos minerais identificados nos grãos, houve diferença significativa apenas para o ferro. Os demais minerais (Cu, Zn, P, K, Mg, Mn, C, O, N, Na, Cr, Co e Ca) não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre eles.

De forma geral, a produção da bebida kefir a partir da fermentação dos grãos em água açucarada pode ser realizada nos três substratos utilizados neste trabalho, dependendo do objetivo, apresentando pequenas variações em relação às características físico-químicas esperadas. A composição microbiológica das bebidas pode ter sido diferente umas das outras, porém, sem prejuízo no objetivo do consumo do kefir que é ingerir um produto probiótico. No entanto, não foi avaliada a questão sensorial das bebidas que é um fator determinante para a aceitabilidade do kefir de água, uma vez que não existe padrão de qualidade e identidade do produto.

Portanto, o trabalho cumpriu seu objetivo que foi caracterizar as bebidas e grãos produzidos a partir de diferentes fontes de sacarose a fim de ser útil para uma futura elaboração do Padrão de Identidade e Qualidade do kefir de água. Além disso, foi possível constatar que a

utilização do açúcar refinado pode prejudicar a microbiota e a estrutura dos grãos ao longo do tempo, confirmando que a utilização do açúcar mascavo e até o açúcar de coco são melhores opções avaliando qualidade dos grãos e resultado da bebida produzida.

7 SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

Com o intuito de continuar os estudos neste assunto, agregando mais conhecimento nas diversas áreas envolvidas na produção do kefir de água, sugere-se os seguintes tópicos para futuras pesquisas:

- Realizar análise sensorial das bebidas produzidas com açúcar de coco, mascavo e refinado;
- Realizar estudo cinético das fermentações;
- Identificar os ácidos orgânicos e compostos aromáticos formados e substrato consumido ao longo da fermentação por meio de cromatografia;
- Identificar os minerais presentes nos açúcares utilizados e nas bebidas produzidas;
- Realizar análise de cinzas dos grãos para cada substrato utilizado, assim como umidade e proteínas;
- Identificar os microrganismos prevalentes nos grãos para cada substrato e nas bebidas;
- Realizar a extração e caracterização do EPS produzidos a partir de cada substrato.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AÇIK, M. et al. Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: Sugary kefir. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 3, p. 523–531, 2020.

ALCIDES, M.; OLIVEIRA, L. A. DE; BAGAGLI, M. P. Estudo da produção de exopolissacarídeo solúvel de kefir de água. **Rev. Bras. de Iniciação Científica (RBIC)**, v. 7, n. 4, p. 87–106, 2020.

ALSAYADI, M. et al. Evaluation of Anti-Hyperglycemic and Anti-Hyperlipidemic Activities of Water Kefir as Probiotic on Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Journal of Diabetes Mellitus**, v. 04, n. 02, p. 85–95, 2014.

ALVES, V. **Desenvolvimento de bebida fermentada com kefir de água em extrato vegetal hidrossolúvel de coco (Cocos nucifera L.) com adição de inulina**. [s.l.] Universidade Federal da Fronteira Sul, 2020.

ALVES, V. et al. Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (Cocos nucifera L.) with inulin addition. **Lwt**, v. 145, n. January, 2021.

ARAÚJO, J. DA C. et al. Desenvolvimento de kefir em leite de coco babaçu. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2020.

ARAÚJO, M. F. et al. Kefir de água e leite: Composição físico-química em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 13, n. 80, p. 645–651, 2019.

BARÃO, C. E. et al. Growth kinetics of kefir biomass: Influence of the incubation temperature in milk. **Chemical Engineering Transactions**, v. 75, n. July, p. 499–504, 2019.

BARROS, S. M. A. **Bebida à base de água de kefir saborizada com abacaxi e maracujá: Elaboração, avaliação físico-química, microbiológica e sensorial**. [s.l.] Universidade Federal do Maranhão, 2019.

BELASCO, R. et al. The Effect of Hydration on Urine Color Objectively Evaluated in CIE L*a*b* Color Space. **Frontiers in Nutrition**, v. 7, n. October, p. 1–9, 2020.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**. Instrução Normativa nº 46, de 23/10/2007. Diário Oficial da União, Seção 1, p. 4-7. Brasília, 24 out.2007.

BUENO, R. S. et al. Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya. **LWT - Food Science and Technology**, v. 140, n. December 2020, 2021.

CAMPOLINA, G. A.; AURÉLIO, M.; CARVALHO, N. B. Elaboração e caracterização físico-química de antepastos funcionais utilizando kefir e semente de chia. **Caderno de Ciências**

Agrárias, v. 9, n. 3, p. 24–31, 2017.

CESÁRIO, C. DO C. et al. Biochemical and morphological characterization of freshwater microalga *Tetradismus obliquus* (Chlorophyta: Chlorophyceae). **Protoplasma**, v. 259, n. 4, p. 937–948, 13 jul. 2022.

ÇEVIK, T. et al. The Effect of Different Sugars on Water Kefir Grains. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 7, n. sp1, p. 40, 2019.

CHEMELLO, E. . A Química na Cozinha apresenta: O Açúcar. **Revista Eletrônica ZOOM da Editora Cia da Escola**, v. 4, p. 1–30, 2005.

CHEN, Z. et al. Effect of lactic acid bacteria and yeasts on the structure and fermentation properties of Tibetan kefir grains. **International Dairy Journal**, v. 114, n. 104943, p. 1–8, 2021.

CONCEIÇÃO, R. B. DA. **Caracterização do processo fermentativo e da microbiota envolvida na produção do kefir de água**. [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2012.

CORDEIRO, N. A. O. **Kefir de água BIONAT-I: Análise metagenômica dos grãos, obtenção e caracterização estrutural do exopolissacarídeo consorciana e seu potencial biotecnológico**. [s.l.] Universidade de Pernambuco, 2018.

CORONA, O. et al. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572–581, 2016.

COSTA, M. R. DA et al. Characterization of the kefir beverage produced from yam (*Colocasia esculenta* L.), sesame seed (*Sesamum indicum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 12, p. 4851–4858, 2018.

CREMA, L. C. **Clarificação por flotação com ar dissolvido (FAD) da calda de açúcar cristal para produção de açúcar refinado**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2012.

DA COSTA, M. R. et al. Characterization of the kefir beverage produced from yam (*Colocasia esculenta* L.), sesame seed (*Sesamum indicum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 55, n. 12, p. 4851–4858, 2018.

DESTRO, T. M. **Kefir De Água Fermentado a Partir De Açúcar Mascavo Orgânico Ou Convencional E Jaboticaba**. [s.l.] Universidade Estadual de Londrina, 2017.

DESTRO, T. M. et al. Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 43, p. 17, 2019.

DWILOKA, B.; RIZQIATI, H.; SETIANI, B. E. Physicochemical and sensory characteristics of green coconut (*Cocos nucifera* L.) water kefir. **International Journal of Food Studies**, v. 9, n. 2, p. 346–359, 2020.

EGEA, M. B. et al. A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1536–1552, 2020.

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

FIORDA, F. A. **Development of New Potentially Probiotic Honey Beverage Fermented By Kefir Grains: Functional Properties, Molecular Microbiological Characteristics and Technological Aspects**. [s.l.] Federal University of Paraná, 2016.

FIORDA et al. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 690–697, 2016a.

FIORDA, F. A. **Development of New Potentially Probiotic Honey Beverage Fermented By Kefir Grains: Functional Properties, Molecular Microbiological Characteristics and Technological Aspects**. [s.l.] Federal University of Paraná, 2016.

FIORDA, F. A. et al. Evaluation of a potentially probiotic non-dairy beverage developed with honey and kefir grains: Fermentation kinetics and storage study. **Food Science and Technology International**, v. 22, n. 8, p. 732–742, 9 dez. 2016b.

FIORDA, F. A. et al. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86–95, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; **World Health Organization**. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Roma: Fao, 2006. 56 p.

GAMBA, R. R. et al. Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. **Food Science and Technology Research**, v. 25, n. 2, p. 303–312, 2019.

GAMBA, R. R. et al. Changes in Microbiota During Multiple Fermentation of Kefir in Different Sugar Solutions Revealed by High-Throughput Sequencing. **Current Microbiology**, v. 78, n. 6, p. 2406–2413, 2021.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 4, p. 639–652, 2001.

GRAÇA, A. P. O. DA et al. Cupuassu as a potential substrate for fermentation using kefir grains. **European International Journal of Science and Technology**, v. 7, n. 6, p. 9–20, 2018.

GUERRA, M. J.; MUJICA, M. V. Physical and chemical properties of granulated cane sugar “panelas”. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 250–257, 2010.

GUITEL. **Flor do açúcar de coco** (2018). Disponível em <https://www.rainforestherbs.com.my/organic-coconut-sugar/>. Acesso em 18 de abril de 2022.

GULITZ, A. et al. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284–288, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., WYFFELS, J. T., SEYDIM, A. C., and GREENE, A. K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **Int. J. Dairy Technol.** 58, 25–29, 2005.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; GÖKIRMAKLI, Ç.; GREENE, A. K. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. **Trends in Food Science and Technology**, v. 113, p. 42–53, 2021.

HARDER, M. N. C.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; ARTHUR, V. Avaliação quantitativa por colorímetro digital da cor do ovo de galinhas poedeiras alimentadas com urucum (*Bixa orellana*). **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 563–564, p. 339–342, 2007.

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

HUNTERLAB. (1996), CIE L*a*b* color scale. Applications. Disponível em: www.hunterlab.com/application-notes. Acesso em: 28 de julho de 2022.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4ª ed. (1ª Edição digital), p. 1020, 2008.

JAMBASSI, J. R. **Aspectos da qualidade do açúcar: Impactos de diferentes condições de armazenamento e método de classificação por espectroscopia Raman**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.

JANUÁRIO, J. G. B. et al. Desenvolvimento de Bebidas Kefir: Padronização dos parâmetros de processo. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 7, n. 2, p. 80–95, 2016.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564–2572, 2014.

LAUREYS, D. et al. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1281–1286, 2016.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 719–732, 2017.

LAUREYS, D. et al. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir

fermentation process. **Food Microbiology**, v. 73, p. 351–361, 2018.

LAUREYS, D. et al. The Type and Concentration of Inoculum and Substrate as Well as the Presence of Oxygen Impact the Water Kefir Fermentation Process. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n. February, p. 1–13, 11 fev. 2021.

LIMA, G. V. **Desenvolvimento de eletrodo de pasta de carbono modificado para a quantificação do teor alcoólico em amostras de uísque**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2021.

LIMA, G. V. **Desenvolvimento de eletrodo de pasta de carbono modificado para a quantificação do teor alcoólico em amostras de uísque**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2021.

LOPES, B. A. **Kefir de água saborizado com jamelão (*Syzygium cumini*): inovação e segurança microbiológica para o consumo humano**. [s.l.] Universidade Federal da Paraíba, 2019.

LYNCH, K. M. et al. An update on water kefir_ Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109–128, 2021.

MAGALHÃES, K. T. et al. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 7, p. 1241–1250, 2010.

MIGUEL, M. G. DA C. P. et al. Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1875–1884, 2011.

MONAR, M. et al. Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kefir. **Avances en Ciencias e Ingenierías**, v. 6, n. 1, p. 60–66, 2014.

MORE, J. C. R. S. **Produção e caracterização do kefir saborizado com polpa de cagaita (*Eugenia dysenterica*)**. [s.l.] Universidade Federal de Goiás Área, 2019.

NEVE, H.; HELLER, K. J. The microflora of water kefir: A glance by scanning electron microscopy. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v. 54, n. 4, p. 337–349, 2002.

OLIVEIRA, F. C. S. DE et al. Características físico-químicas e sensoriais de queijos frescos fermentados com kefir de leite e kefir de água. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 4, p. e153943015, 21 mar. 2020.

OLIVEIRA, T. G. DE; KAWASHIMA, L. M.; VERAS, K. M. DE A. Avaliação de bebida fermentada produzida por grãos de kefir cultivados em diferentes meios. **Revista Científica UMC Edição**, n. 2018, p. 1–3, 2018.

OSTADRAHIMI A, et al. Effect of probiotic fermented milk (kefir) on glycemic control and lipid profile in type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo- controlled clinical trial. **Iran J Public Health**. 2015;44(2):228-37

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54–59, 2003.

OZCELIK, F.; AKAN, E.; KINIK, O. Use of Cornelian cherry, hawthorn, red plum, roseship and pomegranate juices in the production of water kefir beverages. **Food Bioscience**, v. 42, n. February, p. 101219, 2021.

PCA - Philippine Coconut Authority. **Coconut processing technologies**: coconut sap sugar. Leaflet, p.5, 2015.

PEDRO, L. R. C. Efeitos da suplementação de kefir em mulheres com queixas gastrointestinais. 2019. 66f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia de Alimentos). Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional (CTDR), da **Universidade Federal da Paraíba**, João Pessoa, 2019.

PENDÓN, M. D. et al. Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. **Journal of Applied Microbiology**, n. November, p. 1–19, 2021.

PERES, M. C. Microbiota e benefícios a saúde, quanto ao kefir como alimento funcional. **Revista Farol**, v. 8, n. 8, p. 451–470, 2019.

PIDOUX, M. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. **MIRCEN Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 223–238, 1989.

PRADO, F. C. et al. Development and evaluation of a fermented coconut water beverage with potential health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 489–497, 2015a.

PRADO, M. R. et al. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. OCT, p. 1–10, 2015.

RANDAZZO, W. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40–51, 2016.

SANTOS, D. C. DOS et al. Optimization of soymilk fermentation with kefir and the addition of inulin: Physicochemical, sensory and technological characteristics. **Lwt**, v. 104, n. January, p. 30–37, 2019.

SANTOS, F. L. et al. Kefir: Uma nova fonte alimentar funcional? **Diálogos & Ciência (Online)**, v. 10, p. 1–16, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**.

Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica, v. 2, p. 541, 2001.

SILVEIRA, C. M. M. **Efeito do kefir de água no estresse oxidativo, na inflamação e na esteatose hepática em ratos wistar**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2017.

SOUTO, C. S.; SILVA, P. P.; NEIF, É. M. Kefir e seu potencial probiótico. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 12, n. 1, p. 24–34, 2020.

SOUZA, E. C. et al. Condições sanitárias de açúcar mascavo, demarara e de coco comercializados a granel na cidade de Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v. 32, p. 99–103, 2018.

STOCHERO, E. L. M.; JACOBI, L. F.; LÚCIO, A. D. Imputação de dados na análise de variância em experimentos no Delineamento Inteiramente Casualizado. **Ciência e Natura**, v. 42, p. e37, 2020.

TAVARES, P. P. L. G. et al. Fermentation of kefir grains in different brazilian raw cane sugar commercial brands. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 17004–17012, 2020.

UGALDE, M. L. et al. Bebida à base de kefir de água. In: VIERA, V. B.; PIOVESAN, N. (Eds.). **Avanços e desafios da nutrição 3**. 3. ed. Ponta Grossa: Atena Editora, 2019. v. 3p. 165–171.

VEECK, I. C. DE A. et al. Bebida Fermentada De Kefir De Água E Yacon. **6º Simpósio de Segurança Alimentar**, p. 172–177, 2019.

VOLPI, G. et al. Pollution abatement of heavy metals in different conditions by water kefir grains as a protective tool against toxicity. **Journal of Chemistry**, v. 2019, p. 27–30, 2019.

WANG, X. et al. The Microbial Diversity and Biofilm-Forming Characteristic of Two Traditional Tibetan Kefir Grains. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1–19, 2022.

WRAGE, J.; BURMESTER, S.; KUBALLA, J.; ROHN, S. Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 112, p. 108-227, 2019.

YAMAN, H.; ELMALI, M.; KAMBER, U. Observation of Lactic Acid Bacteria and Yeast Populations During Fermentation and Cold Storage in Cow's, Ewe's and Goat's Milk Kefirs. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 16, n. A, p. 113–118, 2010.

ZONGO, O. et al. Physicochemical composition and fermentation kinetics of a novel Palm Sap-based Kefir Beverage from the fermentation of *Borassus aethiopicum* Mart. fresh sap with kefir grains and ferments. **Scientific African**, v. 10, p. e00631, 2020.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Tabelas referentes às análises físico-químicas que contém as médias, desvio-padrão e análise estatística que serviram de base para a construção dos gráficos expostos no texto do trabalho.

Tabela A1 – Valores de pH apresentados como média \pm desvio padrão

Tempos de fermentação (h)					
	0	12	24	36	48
Coco	5,88 \pm 0,0082 ^{aA}	4,65 \pm 0,2810 ^{aB}	4,13 \pm 0,1708 ^{aC}	3,93 \pm 0,1967 ^{aC}	3,78 \pm 0,1751 ^{aC}
Mascavo	6,51 \pm 0,023 ^{aA}	4,45 \pm 2,3652 ^{aB}	3,93 \pm 0,1055 ^{abC}	3,57 \pm 0,1454 ^{abC}	3,31 \pm 0,0457 ^{aC}
Refinado	7,26 \pm 0,0287 ^{bA}	4,30 \pm 0,3712 ^{aB}	3,69 \pm 0,1829 ^{bC}	3,32 \pm 0,2075 ^{bC}	3,00 \pm 0,2065 ^{bD}

Letras minúsculas se diferem na mesma coluna e letras maiúsculas se diferem na mesma linha representando diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela A2 - Valores de teor de sólidos solúveis (°Brix)

Teor Sólidos Solúveis					
	0h	12h	24h	36h	48h
Coco	8,9 \pm 0,1155 ^{aA}	8,2 \pm 0,2062 ^{bA}	7,8 \pm 0,5123 ^{bA}	6,3 \pm 0,7789 ^{cB}	4,5 \pm 0,4761 ^{dC}
Mascavo	9,0 \pm 0,0577 ^{aA}	8,6 \pm 0,0816 ^{bA}	7,9 \pm 0,3786 ^{bA}	7,0 \pm 0,3109 ^{cB}	6,3 \pm 0,1708 ^{cB}
Refinado	9,0 \pm 4,4851 ^{aA}	8,75 \pm 0,0957 ^{bA}	8,5 \pm 0,3 ^{bA}	8,5 \pm 0,4856 ^{bA}	8,1 \pm 0,7848 ^{bB}

Letras minúsculas se diferem na mesma coluna e letras maiúsculas se diferem na mesma linha representando diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela A3 - Valores de acidez total calculados para as fermentações em diferentes açúcares.

Acidez total titulável (molar/100 mL)					
	0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
Coco	0,125 \pm 0,02886 ^{aA}	1,7 \pm 0,5642 ^{bB}	2,75 \pm 0,8539 ^{bB}	3,2 \pm 0,35 ^{cB}	3,975 \pm 0,9156 ^{cC}
Mascavo	0,35 \pm 0,025 ^{aA}	1,00 \pm 0,1414 ^{bB}	1,9 \pm 0,4787 ^{bB}	2,3 \pm 1,1048 ^{cC}	4,3 \pm 0,4898 ^{cC}
Refinado	0,45 \pm 0,075 ^{aA}	0,375 \pm 0,0854 ^{aA}	0,725 \pm 0,225 ^{aA}	1,25 \pm 0,20414 ^{bB}	2,8 \pm 1,3053 ^{cB}

Letras minúsculas se diferem na mesma coluna e letras maiúsculas se diferem na mesma linha representando diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela A4 - Médias dos valores de teor de ganho de massa (média \pm desvio padrão).

Ganho de massa (%)		
Coco	Mascavo	Refinado
3,3179 \pm 1,6882 ^a	2,8384 \pm 1,1399 ^{ab}	1,4593 \pm 1,39899 ^b

Médias que não apresentam a mesma letra são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela A5 - Médias dos valores de teor de massa seca e teor de massa úmida (média \pm desvio padrão).

Massa seca (%)			Massa de água (%)		
Coco	Mascavo	Refinado	Coco	Mascavo	Refinado
14,27 \pm 0,0037 ^a	16,62 \pm 0,0102 ^{ab}	18,42 \pm 0,0111 ^b	85,73 \pm 0,0037 ^a	83,39 \pm 0,0102 ^{ab}	81,58 \pm 0,0111 ^b

*Valores da tabela são referentes às medias dos valores encontrados para cada fermentação, uma vez que não foi feita triplicata em cada fermentação para cada açúcar e não houve diferença significativa entre uma fermentação e outra.

**Letras diferentes representam diferenças significativas entre as médias de massa seca dos grãos ($p < 0,05$).

Tabela A6 - Médias dos valores de Ferro nas amostras de grãos de kefir de água identificados por EDS em cada substrato utilizado.

Fe identificado por EDS (%)		
Coco	Mascavo	Refinado
0,2820 \pm 0,1518 ^a	0,984 \pm 0,5073 ^b	0,5640 \pm 0,2265 ^{ab}

Letras diferentes na tabela são referentes aos valores que se diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Tabela A7 - Elementos identificados por EDS (K e Na) que apresentaram diferença significativa em relação aos demais elementos e entre os açúcares.

Elementos identificados por EDS (%)			
	Coco	Mascavo	Refinado
K	0,0940 \pm 0,0321 ^a	0,1640 \pm 0,0885 ^a	0,1040 \pm 0,0569 ^a
Na	2,0200 \pm 0,1495 ^b	2,114 \pm 0,3597 ^b	1,9980 \pm 0,2059 ^b

Letras diferentes na tabela são referentes aos valores que se diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

APÊNDICE B – Gráficos dos resíduos gerados a partir da regressão linear aplicada para pH, teor de sólidos solúveis e acidez total.

Figura B1 - Resíduos das regressões lineares realizadas para a análise de pH.

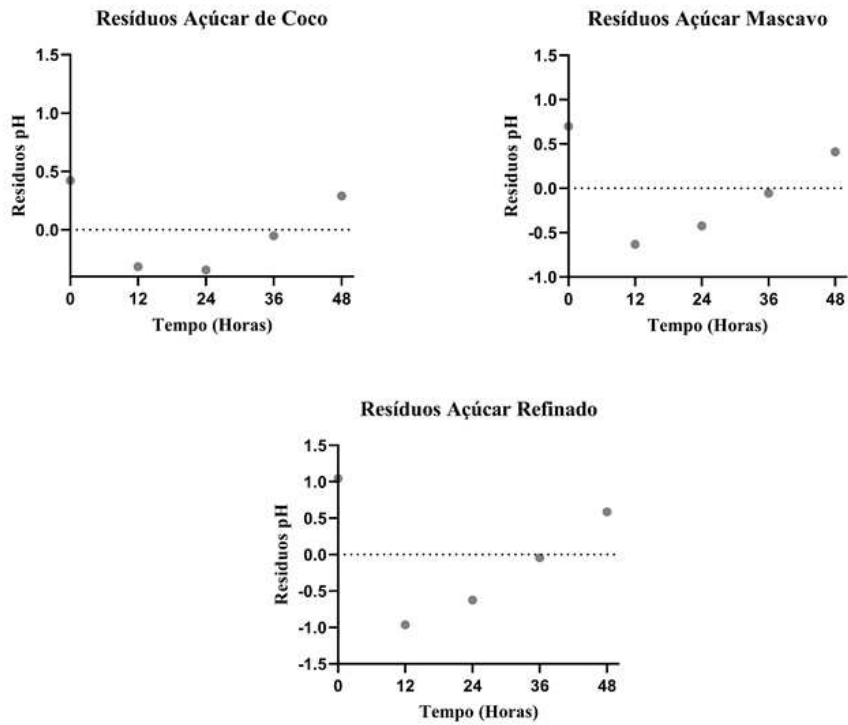


Figura B2 - Resíduos das regressões lineares realizadas para análise de teor de sólidos solúveis.

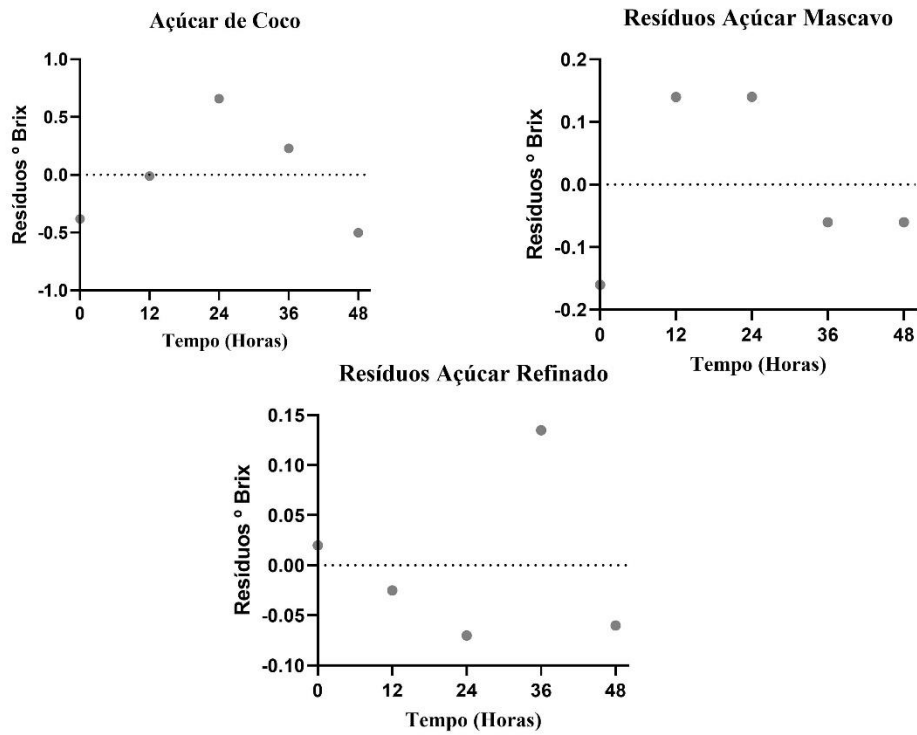
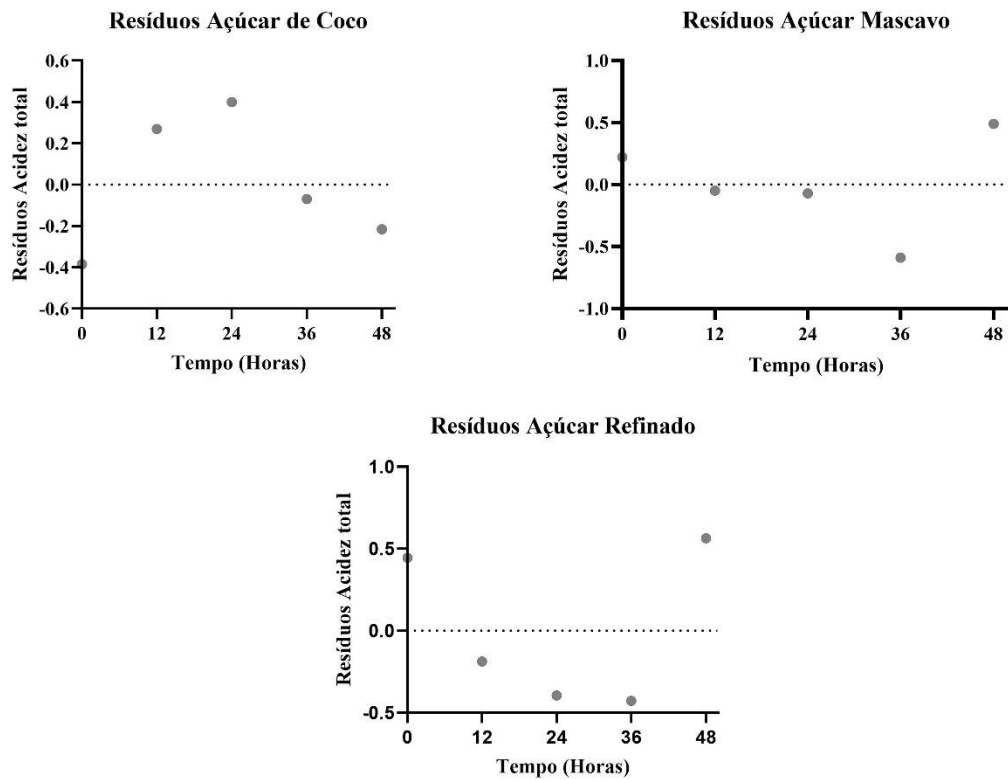


Figura B3 - Resíduos das regressões lineares realizadas para a análise de acidez total



APÊNDICE C – Valores dos parâmetros relacionados à cor das amostras de kefir de água para cada batelada a partir dos açúcares de coco, mascavo e refinado.

*Considerando letras minúsculas que se diferem na mesma coluna e letras maiúsculas que se diferem na mesma linha representando diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela C1 – Valores correspondentes ao parâmetro L* (luminosidade)

L*					
	0h	12h	24h	36h	48h
Coco	4,84 ^{aA}	4,97 ^{aA}	5,35 ^{aA}	5,44 ^{aA}	7,58 ^{aB}
Mascavo	8,75 ^{bA}	11,44 ^{bB}	11,78 ^{bB}	11,47 ^{bB}	13,26 ^{bC}
Refinado	16 ^{cA}	16,78 ^{cA}	16,96 ^{cA}	18,01 ^{cB}	19,62 ^{cC}

Tabela C2 – Valores correspondentes ao parâmetro a* (coordenada vermelho/verde)

a*					
	0h	12h	24h	36h	48h
Coco	4,24 ^{aA}	3,77 ^{aB}	3,93 ^{aA}	3,51 ^{aB}	3,22 ^{aB}
Mascavo	2,16 ^{aA}	2,4 ^{aA}	2,54 ^{aA}	2,33 ^{aA}	2,09 ^{aA}
Refinado	0,13 ^{bA}	-0,02 ^{bB}	0,01 ^{bC}	-0,08 ^{bB}	-0,16 ^{bB}

Tabela C3 – Valores correspondentes ao parâmetro b* (coordenada amarelo/azul)

b*					
	0h	12h	24h	36h	48h
Coco	4,46 ^{bA}	3,53 ^{bB}	4,23 ^{bA}	4,43 ^{bA}	5,91 ^{bA}
Mascavo	6,16 ^{aC}	8,64 ^{aB}	10,11 ^{aA}	9,47 ^{aA}	9,59 ^{aA}
Refinado	-0,07 ^{cB}	-0,2 ^{cC}	-0,29 ^{cC}	-0,22 ^{cC}	0,18 ^{cA}

Tabela C4 – Valores correspondentes ao parâmetro C* (saturação)

C*					
	0h	12h	24h	36h	48h
Coco	6,1538 ^{aA}	5,1647 ^{bB}	5,7739 ^{bB}	5,6520 ^{bB}	6,7303 ^{bA}
Mascavo	6,5277 ^{aD}	8,9671 ^{aC}	10,4242 ^{aA}	9,7524 ^{aB}	9,8151 ^{aB}
Refinado	0,1476 ^{bC}	0,2001 ^{cB}	0,2902 ^{cA}	0,2341 ^{cA}	0,2408 ^{cA}

Tabela C5 – Valores correspondentes ao parâmetro h (tonalidade)

h					
	0h	12h	24h	36h	48h
Coco	0,8107 ^{aB}	0,7525 ^{bB}	0,8221 ^{aB}	0,9008 ^{aA}	1,0719 ^{aA}
Mascavo	1,2335 ^{aA}	1,2998 ^{aA}	1,3247 ^{aA}	1,3295 ^{aA}	1,3562 ^{aA}
Refinado	-0,4939 ^{bC}	1,4711 ^{aA}	-1,5363 ^{bE}	0,0176 ^{bB}	-0,8442 ^{bD}

APÊNDICE D – Fotos da Microscopia Eletrônica de Varredura

Figura D1 - Fotos dos grãos de açúcar de coco

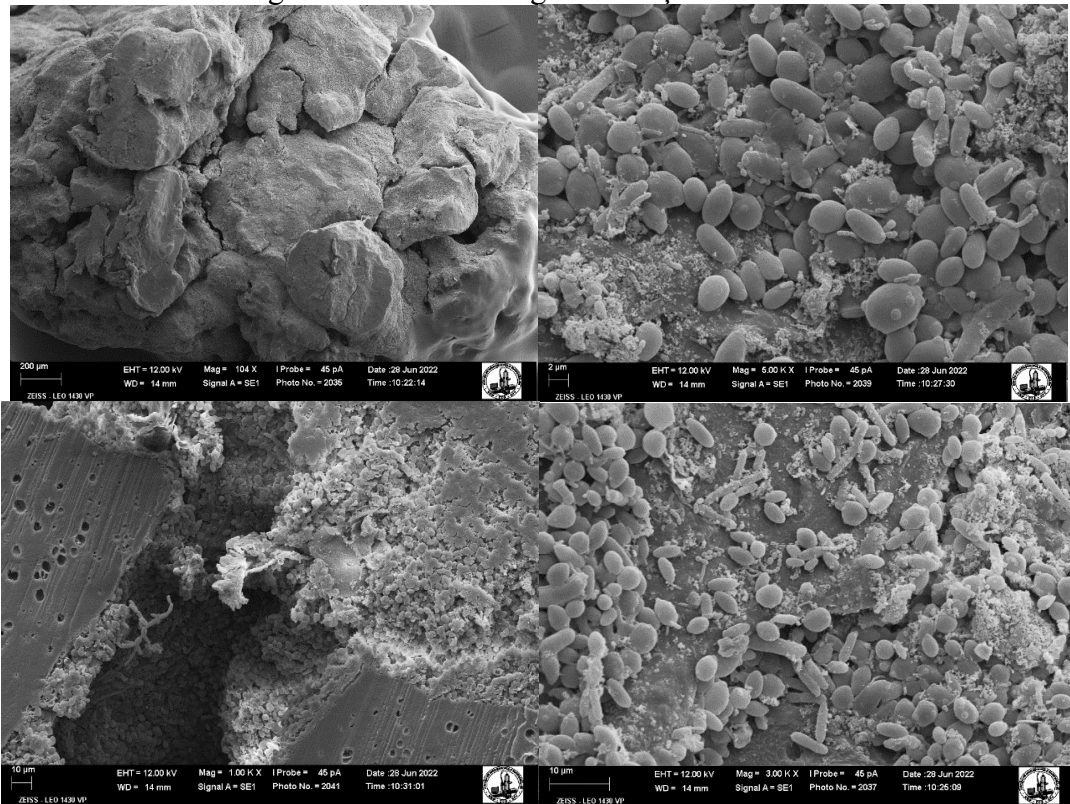


Figura D2 - Fotos dos grãos fermentados em açúcar mascavo

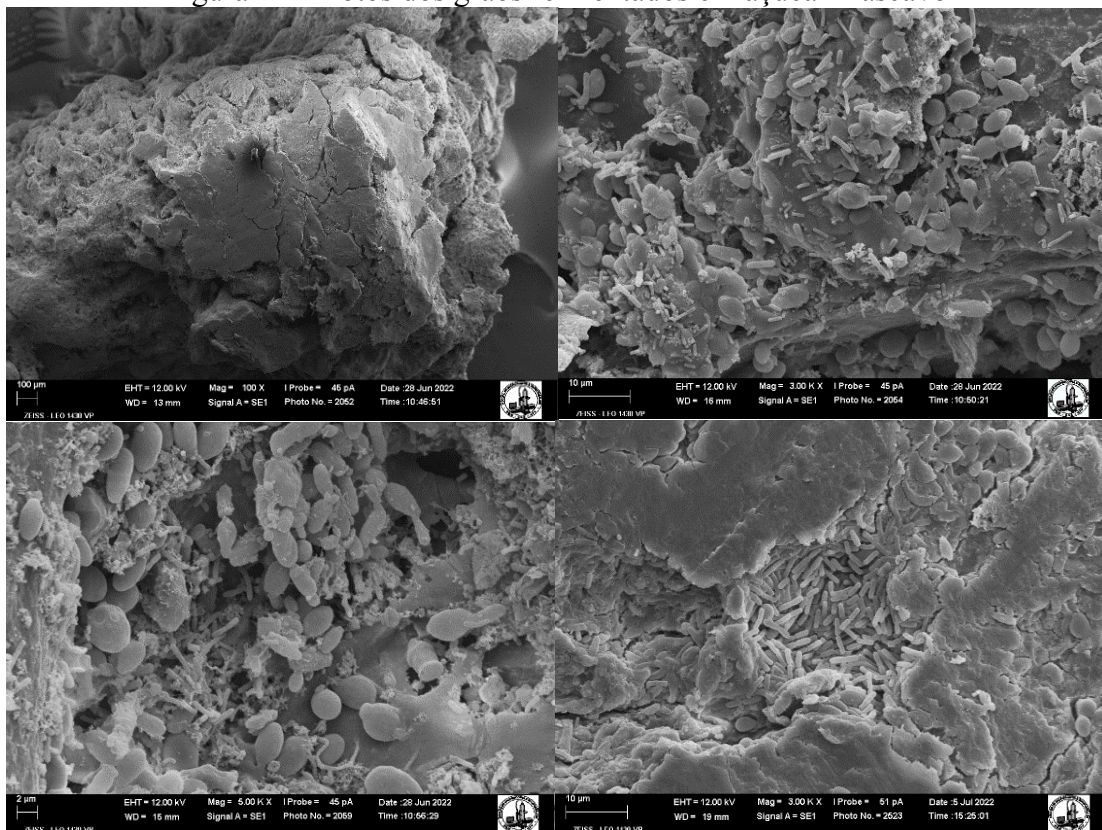
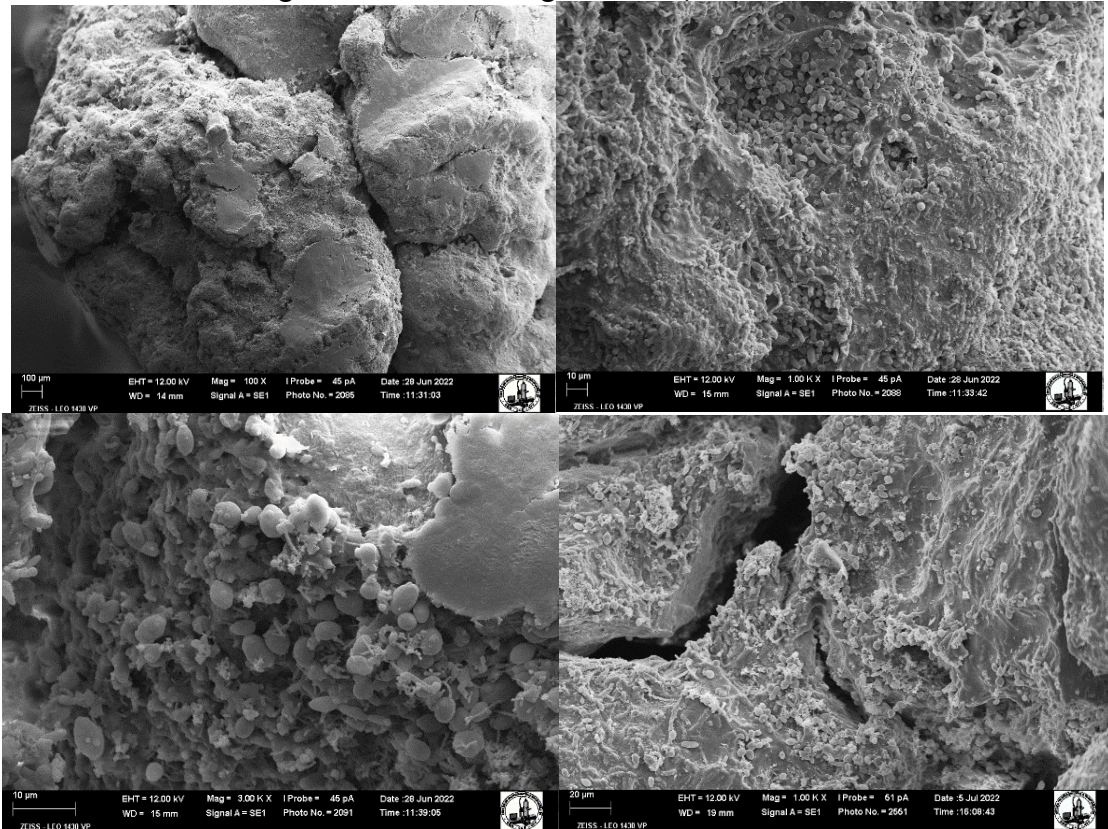


Figura D3 - Fotos dos grãos em açúcar refinado



APÊNDICE E – Espectros dos elementos nos grãos de açúcar de coco, mascavo e refinado

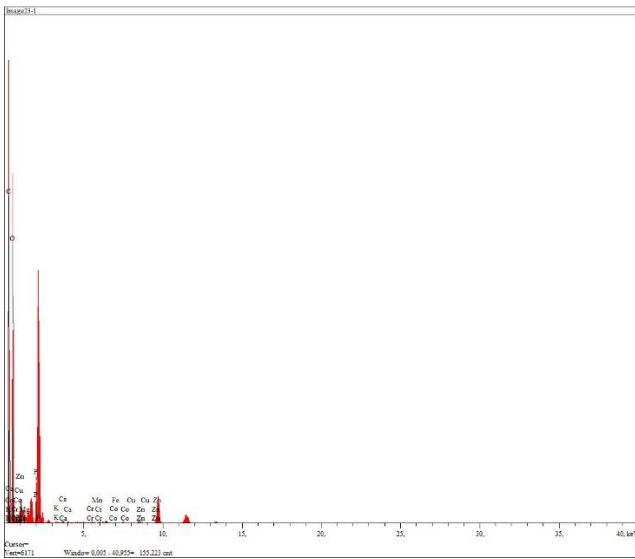


Figura E1 - Espectro do grão de açúcar de coco

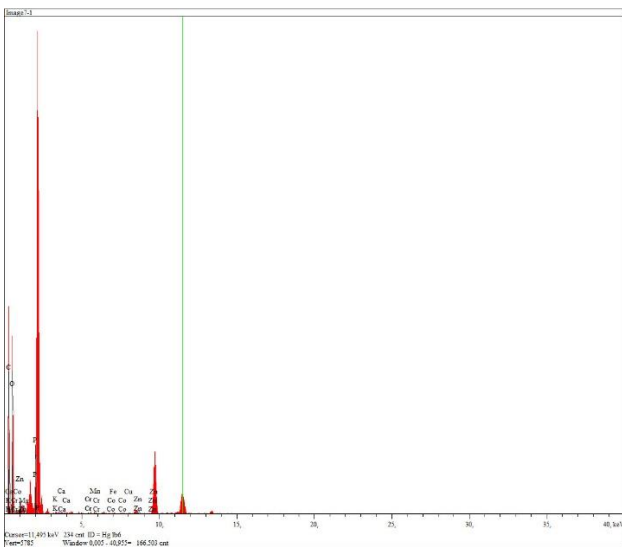


Figura E2 – Espectro do grão de açúcar mascavo

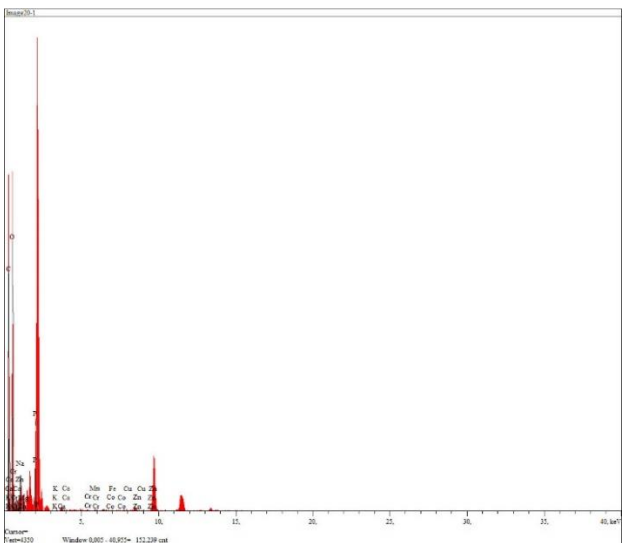


Figura E3 – Espectro do grão de açúcar refinado