



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TAINÁ MIRANDA DESTRO

**KEFIR DE ÁGUA FERMENTADO A PARTIR DE AÇÚCAR  
MASCADO ORGÂNICO OU CONVENCIONAL ADICIONADO  
DE JABUTICABA**

TAINÁ MIRANDA DESTRO

**KEFIR DE ÁGUA FERMENTADO A PARTIR DE  
AÇÚCAR MASCAVO ORGÂNICO OU CONVENCIONAL  
ADICIONADO DE JABUTICABA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa.

Coorientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Destro, Taina.

Kefir de água fermentado a partir de açúcar mascavo orgânico ou convencional adicionado de jaboticaba / Taina Destro. - Londrina, 2017.

128 f. : il.

Orientador: Wilma Spinosa.

Coorientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.

Inclui bibliografia.

1. tífico - Tese. 2. cultura mista - Tese. 3. fermentação - Tese. 4. Plinia jaboticaba - Tese. I. Spinosa, Wilma . II. Garcia, Sandra. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. IV. Título.

TAINÁ MIRANDA DESTRO

**KEFIR DE ÁGUA FERMENTADO A PARTIR DE AÇÚCAR  
MASCAVO ORGÂNICO OU CONVENCIONAL ADICIONADO DE  
JABUTICABA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Wilma Aparecida Spinosa  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Karla Bigetti Guergoletto  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Patrícia de Miranda Brusantin  
Iglézias  
Universidade Paulista - UNIP

Londrina, 25 de setembro de 2017.

À valorização de todas as formas de vida.

Aos meus familiares e companheiros de vida, meu avô Murillo Marcos Esberard Miranda, Zaíde da Conceição Affonso, meus pais Deonísio Destro e Lilian Azevedo

Miranda e minha irmã Potira Miranda Destro.

A todas as pessoas permacultoras, agrofloresteiras, desbravadoras de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC), agricultoras e sonhadoras que fazem da terra fonte de vida.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – DCTA/UEL e da Universidade Estadual de Londrina (UEL), que de alguma maneira participaram de minha formação como Mestre, incluindo os professores, técnicos e a secretária Sandra Resende. Especialmente à Dr<sup>a</sup>. Wilma Aparecida Spinosa pela orientação e Dr<sup>a</sup>. Sandra Garcia pela co-orientação.

À equipe da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzana Lucy Nixdorf, do Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação e Metodologia Analítica da UEL, principalmente pelo apoio de Tiago Madeira e Lycio Watanabe e pela disponibilidade do cromatógrafo.

À equipe do Prof. Dr. Admilton Gonçalves de Oliveira Junior, do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise da Universidade Estadual de Londrina (LMEM/ PPPG-UEL), incluindo a excelente assessoria dos técnicos Osvaldo Capelo e Edson Henrique Mota Moreti.

À Dr<sup>a</sup>. Denise da Fontoura Prates, pelas contribuições no laboratório, na revisão do texto e pela amizade.

Aos colegas do grupo de biotecnologia, que com muito carinho compartilharam seu tempo e conhecimentos, incluindo Giovana Piveta, Fernanda Silva Farinazzo, Vitor Hugo Tsuru, Roberto Nunes, Marcela Moreira Terhaag, Rodrigo José Gomes, Mariana Assis de Queiroz e Tamara Maciel Machado, para citar alguns.

Ao Prof. Dr. Guilherme Biz, do Departamento de Estatística/CCE/UEL, ao Prof. Dr. Leandro Simões Azeredo Gonçalves, ao doutorando Odair e graduanda Juliana do curso de Agronomia/CCA/UEL pela valiosa cooperação nas análises estatísticas realizadas.

Ao Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas e sua equipe, do Laboratório de Genética e Taxonomia de Bactérias – Bioinseticida (UEL), pelo compartilhamento de experiências.

Ao Planeta Verde, especialmente ao Sr. Emilio Lutz, ao gerente industrial Paul Bruning e à Denise Belmiro, pelo acolhimento e fornecimento dos açúcares.

À DeMarqui de São Paulo (SP) e à sua representação, em Cornélio Procópio (PR), pelo fornecimento da polpa de jabuticaba.

Ao LaborSolo pela valiosa colaboração na análise de minerais, especialmente ao professor Dr. José Carlos Vieira de Almeida e, em nome de todos os funcionários, à Juliane de Castro Araújo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo para realização do mestrado.

Aos meus amigos, incluindo Helio de Souza Junior, Tamires Firmino, Jônatas Lima Candido, Heder Valencia e Carlos Henrique Lopes da Silva. Aos familiares e companheiro Elias Cesar Oliveira de Freitas, por todo o fundamental apoio.

Ao NEAGRO – Núcleo de Estudos em Agroecologia da UEL, pela oportunidade de convivência e aprendizados.

DESTRO, Tainá Miranda. **Kefir de água fermentado a partir de açúcar mascavo orgânico ou convencional adicionado de jaboticaba**. 2017. 128p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2017.

## RESUMO

O kefir de água é considerado um alimento funcional probiótico, de fácil manipulação e pode ser produzido tanto em ambiente doméstico quanto industrial. A jaboticaba é uma fruta semelhante à uva, rica em compostos fenólicos e nativa do Brasil. Objetivou-se avaliar o efeito do açúcar mascavo orgânico e convencional na fermentação de kefir de água adicionados ou não de polpa de jaboticaba, frente a parâmetros físico-químicos, perfil de carboidratos, ácidos orgânicos e composição de minerais. O processo fermentativo foi conduzido em duas etapas, as primeiras 24 h com os grãos de kefir em contato com cada substrato e as 24 h posteriores com o fermentado filtrado direto nas garrafas com tampas "flip-top". O processo fermentativo foi monitorado a cada 8 h totalizando 56 h de fermentação. Foi realizada microscopia eletrônica de varredura dos grãos de kefir decorridas 24 h de fermentação. As principais diferenças nos padrões físico-químicos ocorreram em até 40 h de fermentação. As bebidas finais tinham característica ácida, com redução do pH inicial em aproximadamente 30% para os substratos sem jaboticaba e 12% nos com jaboticaba. Esta redução do pH decorre, principalmente, da produção dos ácidos láctico, acético e succínico. Os teores de açúcares totais tiveram uma redução em torno de 30% ao longo do processo, independentemente do tipo de substrato. O teor de sacarose foi reduzido em 93% na formulação com açúcar orgânico e com as demais uma média de 81%. Já os teores de glicose e frutose aumentaram. A utilização de açúcar orgânico influenciou na composição dos minerais no produto final. Os teores de P, K, Cr, Ca, Mg, Na e Cu aumentaram, sendo que para os 3 primeiros houve maior aumento para as formulações contendo açúcar convencional. Já os teores de Zn, Mn, S, Fe, B e Ni, foram reduzidos, tendo maior redução nos 3 primeiros, nas bebidas com açúcar orgânico. Os valores obtidos para as características relacionadas à cor apresentaram tendência de aumento ao longo dos oito tempos avaliados, sendo que no período de 0 a 8 horas de fermentação o aumento foi mais pronunciado. É interessante produzir bebida fermentada por grãos de kefir de água utilizando como substrato açúcar mascavo orgânico ou convencional e polpa de jaboticaba, como alternativa saudável, pois substitui bebidas processadas, como refrigerantes, apresentando vantagens por apresentar características de probióticos, ser sem conservantes, com menor teor de açúcares, além de poder ser produzido artesanalmente.

**Palavras-Chave:** Tibico. Nutrição. Cultura mista. Probiótico. *Plinia jaboticaba*.

DESTRO, Tainá Miranda. **Water kefir fermented from organic or conventional brown sugar and jaboticaba**. 2017. 128 p. Dissertation (MSc. in Food Science) - Department of Food Science and Technology, Londrina State University, Londrina-PR, 2017.

## ABSTRACT

Water kefir is considered a functional probiotic food, easy to handle and can be produced in both domestic and industrial environments. Jaboticaba is a fruit similar to grape, rich in phenolic compounds and native to Brazil. In this project, the production of water kefir through the fermentation of organic or conventional brown sugar plus jaboticaba pulp was studied. The fermentation process was conducted in two stages. Scanning electron microscopy was performed on water kefir grains. During the process were determined pH, titratable total acidity, organic acids, total soluble solids (°Brix), sugars and color parameters. In the beverage at times 0 h and 56 h, and in the raw materials the mineral composition was evaluated. Final beverages were acidic. The contents of total soluble solids and sucrose decreased. The glucose and fructose contents increased. The total sugar contents had a reduction of about 50% throughout the process. All beverages obtained showed variation in the mineral content during the fermentation process. In all samples evaluated, the chromium contents were highlighted. Values obtained for color-related characteristics showed a tendency to increase over the eight evaluated times, and in the period from 0 to 8 hours of fermentation the increase was more pronounced for all the characteristics. The products without jaboticaba, presented values always superior to the products with jaboticaba, except for the characteristic a \*, where the formulation with conventional sugar presented lower values in practically all the times of evaluation. In general, most reactions occurred within 40 h of fermentation. It is interesting to produce beverage fermented by water kefir grains using as substrate organic or conventional brown sugar and jaboticaba pulp, as a healthy alternative of processed beverages, like soft drinks.

**Keywords:** Tibico. Nutrition. Mixed culture. Probiotic. *Plinia jaboticaba*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 -</b>	Grãos de kefir de água .....	29
<b>Figura 2 -</b>	Micrografias eletrônicas de varredura de um grão de kefir de água.....	30
<b>Figura 3 -</b>	Micrografias eletrônicas de varredura de grão de kefir de água.....	31
<b>Figura 4 -</b>	Fluxograma hipotético de carbono durante uma fermentação em Kefir de água, a partir da sacarose, mostrando os principais produtos metabólicos .....	34
<b>Figura 5 -</b>	Síntese por desidratação e hidrólise da sacarose .....	35
<b>Figura 6 -</b>	Jaboticabeiras e jaboticabas.....	46
<b>Figura 7 -</b>	Avaliação da agricultura orgânica em relação à agricultura convencional nas quatro principais áreas de sustentabilidade .....	49
<b>Figura 8 -</b>	Matérias primas utilizadas no experimento .....	55
<b>Figura 9 -</b>	Fluxograma da metodologia de trabalho.....	56
<b>Figura 10 -</b>	Diagrama tridimensional de Colorimetria – CIELab .....	61
<b>Figura 11 -</b>	Teores de parâmetros relacionados à acidez, em 4 formulações fermentadas por kefir de água monitoradas em oito tempos .....	64
<b>Figura 12 -</b>	Consumo dos substratos em 4 formulações e oito tempos .....	69
<b>Figura 13 -</b>	Teores dos minerais analisados em kefir de água, para 4 formulações, nos tempos 0 e 56 horas de fermentação .....	73
<b>Figura 14 -</b>	Valores dos parâmetros relacionados à corem 4 formulações de kefir de água, em 8 tempos .....	78
<b>Figura 15 -</b>	MEV de grão de kefir cultivado com açúcar mascavo .....	79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Resumo das bactérias isoladas de kefir de água e leite.....	22
<b>Tabela 2 -</b>	Resumo das leveduras isoladas de kefir de água e leite.....	26
<b>Tabela 3 -</b>	Formulações de kefir de água .....	38
<b>Tabela 4 -</b>	Valores médios dos parâmetros físico-químicos de açúcares .....	41
<b>Tabela 5 -</b>	Composição nutricional em 100g de diversos produtos açucarados .....	43
<b>Tabela 6 -</b>	Composição nutricional em 100g da polpa crua de jaboticaba .....	47
<b>Tabela 7 -</b>	Formulação dos tratamentos (produtos).....	57
<b>Tabela 8 -</b>	Percepção humana para diferentes valores de $\Delta E$ empregada pela indústria de tintas (Norma DIN 6174, 1979).....	75
<b>Tabela 9 -</b>	Comparação das diferenças totais de cores ( $\Delta E$ ) entre quatro formulações elaboradas por kefir de água, em oito diferentes tempos .....	76

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	14
2.1	Objetivo Geral .....	14
2.2	Objetivos Específicos.....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
3.1	Kefir de leite e kefir de água .....	15
3.1.1	Propriedades benéficas do kefir de água.....	17
3.1.2	Microbiota do kefir de água.....	20
3.1.3	Grãos de kefir de água.....	29
3.1.4	Fermentação por grãos de kefir de água .....	31
3.1.5	Elaboração do kefir de água .....	39
3.2	Açúcar.....	40
3.2.1	Processamento da cana .....	42
3.2.2	Consumo de açúcar .....	42
3.3	Jabuticaba.....	44
3.4	A dialética da agricultura.....	47
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
4.1	Material .....	57
4.2	Métodos .....	55
4.2.1	Elaboração da bebida fermentada por kefir de água .....	55
4.2.1.1	Primeira etapa da fermentação.....	56
4.2.1.2	Segunda etapa da fermentação.....	57
4.2.1.3	Refrigeração .....	57
4.2.2	Delineamento experimental, análise estatística e amostragem.....	60
4.2.3	Avaliações dos parâmetros físico-químicos .....	61
4.2.3.1	Ph.....	58
4.2.3.2	Acidez total titulável .....	58
4.2.3.3	Determinação de ácidos orgânicos .....	59

4.2.3.4	Sólidos solúveis totais (SST) .....	59
4.2.3.5	Carboidratos .....	59
4.2.4	Determinação de minerais .....	60
4.2.5	Análise colorimétrica .....	60
4.2.6	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	62
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
5.1	Monitoramento dos Parâmetros Físico-químicos Durante a Elaboração das Bebidas Fermentadas por Kefir de Água .....	63
5.1.1	Acidez .....	63
5.1.2	Perfil de Açúcares .....	67
5.1.3	Minerais .....	70
5.1.4	Cor .....	75
5.1.5	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	77
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS</b> .....	<b>83</b>
6.1	Conclusões .....	80
6.2	Considerações Finais.....	81
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>83</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>101</b>
Anexo A -	Composição química e pH da água mineral fluoretada utilizada no experimento. ....	102
Anexo B -	Exercício de rastreabilidade: açúcar mascavo orgânico. ....	100
Anexo C -	Exercício de rastreabilidade: açúcar mascavo convencional. ....	101
Anexo D -	Comparação dos açúcares utilizados. ....	101
Anexo E -	Controle de Qualidade. ....	102
Anexo F -	Ficha técnica da polpa de jabuticaba. ....	103
Anexo G -	Ficha de controle de qualidade da polpa de jabuticaba. ....	105
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>109</b>

Apêndice A -	Análise de variância (ANOVA) para as características relacionadas à acidez, avaliadas no kefir de água para as quatro formulações e em oito tempos. ....	110
Apêndice B -	Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de ácidos orgânicos e matérias-primas. ....	111
Apêndice C -	Médias para características relacionadas à acidez em kefir de água, para quatro formulações <sup>1</sup> , em oito tempos. ....	112
Apêndice D -	Sobreposição dos cromatogramas dos ácidos orgânicos em quatro formulações <sup>1</sup> de kefir de água em oito tempos. ....	113
Apêndice E -	Análise de variância (ANOVA) para as características relacionadas aos açúcares analisados no kefir de água para quatro formulações em oito tempos. ....	114
Apêndice F -	Médias para características relacionadas aos carboidratos em kefir de água, para quatro formulações <sup>1</sup> , em oito tempos. ....	115
Apêndice G -	Sobreposição dos cromatogramas dos carboidratos em quatro formulações de kefir de água em oito tempos. ....	117
Apêndice H -	Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de carboidratos e matérias-primas. ....	118
Apêndice I -	Análise de variância (ANOVA) para açúcares totais no kefir de água, para quatro produtos, em dois tempos. ....	119
Apêndice J -	Médias para açúcares totais em kefir de água, para quatro produtos <sup>1</sup> , dois tempos. ....	119
Apêndice K -	Análise de variância (ANOVA) para treze minerais analisados no kefir de água, para quatro formulações, em dois tempos. ....	120
Apêndice L -	Médias para treze minerais analisados em bebidas de kefir de água, para quatro formulações <sup>1</sup> , em dois tempos. ....	121
Apêndice M -	Análise de variância (ANOVA) para as características de cor analisadas no kefir de água, para 4 formulações, em 8 tempos. ....	123
Apêndice N -	Médias para características relacionadas à cor em kefir de água, para quatro formulações <sup>1</sup> , em oito tempos. ....	124
Apêndice O -	Imagens de grãos de kefir de água em MEV. ....	126

## 1 INTRODUÇÃO

As alterações de estilo de vida e escolhas alimentares inadequadas podem acarretar patologias como gastrite, obstipação, diarreia, diabetes, cáries dentárias e obesidade na população (BRASIL, 2014). Um dos reflexos dessas escolhas foi o aumento no consumo de produtos ultraprocessados de 20,8% para 25,4%, que pôde ser observado entre 2002-2003 e 2008-2009 (MARTINS et al., 2013).

Dentre as opções de obtenção de alimentos, a fermentação tem sido usada como uma forma de conservação de alimentos, pois é um meio barato de preservação, melhora a qualidade nutricional, assim como as características sensoriais, podendo facilitar a digestão e absorção de nutrientes, além de criar novos alimentos com a mesma matéria-prima (MARSH et al., 2014).

O crescente interesse na alimentação voltada para a melhoria da saúde tem impulsionado o consumo dos alimentos fermentados. Produzidos principalmente por meio de processos fermentativos, produtos à base de leite abrangiam 43% do mercado de bebidas funcionais em 2014. Englobado neste, o mercado probiótico é um setor em expansão na indústria de alimentos, com aumento de 1,5 vezes entre 2003 e 2010 no mundo (MARSH et al., 2014). Este mercado valia US\$ 62.6 bilhões em 2014, e a previsão é de que aumente para US\$ 96 bilhões em 2020 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2015).

Nesse contexto, o desenvolvimento de bebidas probióticas não lácteas é particularmente atraente, devido à ausência de alérgenos lácteos, de lactose, de colesterol e por serem aceitas por vegetarianos estritos (veganos). Tem havido pesquisas a partir de uma variedade de substratos, incluindo extrato de soja, cereais, vegetais e sucos de frutas. O desenvolvimento de tais produtos pode contribuir para possibilitar melhores escolhas alimentares ao invés da adoção de dietas monótonas, homogeneizadas e processadas, que podem ser descritas como ricas em pão branco, açúcar e leite (MORRIS et al., 2016).

Dentre as bebidas fermentadas não lácteas, o kefir de água apresenta-se como uma interessante opção, com a vantagem de ser de baixo custo, seguro e livre de efeitos colaterais negativos (ALSAYADI et al., 2013; FIORDA et al., 2016; MARSH et al., 2014).

O açúcar mascavo é o principal substrato utilizado para a fermentação do kefir de água. Considerando que alimentos orgânicos apresentam um maior valor

nutricional, comparados com os provenientes de cultivo convencional, além de serem isentos de agrotóxicos (BORGUINI; TORRES, 2006), nesta dissertação foi utilizado açúcar mascavo orgânico e açúcar mascavo convencional, provenientes da mesma região geográfica e processados na mesma indústria, com o intuito de comparar estas qualidades.

Como opção para diversificação e enriquecimento nutricional, é possível utilizar outros ingredientes para a confecção do kefir de água. Dentre estes, as frutas fornecem perspectivas promissoras, pois acrescentam nutrientes (vitaminas, fibras etc.), sabor e cor. A jabuticaba, brasileira de origem, foi eleita em caráter inédito para ser avaliada no presente trabalho.

Espera-se com esta pesquisa contribuir para o desenvolvimento de uma bebida que possa ser reproduzida em ambiente doméstico, com reduzido teor de açúcares, baixo custo, com características de um alimento funcional, e que pode ser um substituto de refrigerantes.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Objetivou-se avaliar o efeito do açúcar mascavo orgânico e convencional na fermentação de kefir de água adicionados ou não de polpa de jabuticaba.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Elaborar bebidas fermentadas por grãos de kefir de água, utilizando açúcar mascavo orgânico ou açúcar mascavo obtido de modo convencional, e polpa de jabuticaba.
- Monitorar as etapas do processo fermentativo por meio dos parâmetros físico-químicos (pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais), cor, e avaliar o perfil de carboidratos e de ácidos orgânicos ao longo das etapas de fermentação;
- Determinar a presença de minerais nas matérias-primas e nas formulações no tempo inicial e final e;
- Obter imagens dos grãos de kefir coletados a partir das formulações, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Kefir de leite e kefir de água

Kefir é uma palavra derivada de *Keif* ou *kef*, que teve origem na Turquia e significa “bem-estar”. É uma cultura *starter* em um sistema de sinergismo denominado de mutualismo, onde a eficiência global do conjunto de microrganismos é otimizada (ANFITEATRO, 2000). Essa interação fica evidenciada quando se nota que as culturas puras, quando isoladas, não se desenvolvem, ou têm uma diminuição em sua bioatividade (MONTANUCI, 2010). A simbiose se dá pelo fato do crescimento das leveduras ocorrer após a acidificação do meio pelas bactérias, que por sua vez, têm o crescimento estimulado pela produção de fatores de crescimento (vitaminas) e compostos nitrogenados solúveis por parte das leveduras (MONAR et al., 2014).

A simbiose entre bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras também ocorre na fermentação de outras bebidas tradicionais, como *Shubat*, a partir de leite de camelo, e *gari* e *cauim*, a partir da mandioca (MAGALHÃES et al., 2010).

Existem dois tipos principais distintos de kefir. O mais utilizado, conhecido e estudado, é o kefir onde se utiliza leite como substrato, e o segundo é o kefir de água. O primeiro tem origem estimada em 2000 AEC (Antes da Era Comum), com pastores das montanhas do Cáucaso, e seu uso foi difundido para outras regiões após chegar à Rússia em 1908. As bactérias e leveduras que compõem os grãos de kefir estão contidas em um polissacarídeo conhecido como kefiran e uma matriz protéica. Esses microrganismos são responsáveis pela fermentação ácido-alcoólica do leite, produzindo um produto lácteo fermentado com efeitos benéficos à saúde, o que contribuiu significativamente para o aumento do consumo. Comercialmente, é encontrado em países como Rússia, Turquia, Estados Unidos da América (EUA), Canadá e França. A bebida tem sido um sucesso, ganhando popularidade em diversas localidades no mundo, com o mercado anual estimado em 78,7 milhões de euros apenas nos EUA (MARSH et al., 2014). Kefir é bastante explorado, especialmente, no leste europeu. Por exemplo, na Rússia, o de leite bovino é processado por indústrias lácteas, tais como a Danone (“Activia Kefir” e “Danone Kefir”), a Samaralakto (“BioBalance”, “Prostokvashino” e “Dr. Brandt”), a

Ufamolagroprom (Veselyi molochnik) e Lianozovo (“Domik v derevne”) (ENIKEEV, 2012).

O kefir de leite tem sido estudado no ocidente desde o século passado e suas aplicações em diferentes áreas geraram pedidos de patentes. A primeira foi adquirida na Inglaterra em 1899. Posteriormente, em 2011, Japão, Rússia, Coréia do Sul, EUA, China, Inglaterra e Brasil possuíam 86, 58, 20, 20, 17, 12 e 8 patentes, respectivamente. Dentre essas, 49,22% eram destinadas à indústria de alimentos e 26,63% para a indústria farmacêutica (fármacos e cosméticos), havendo também ocorrência na área de agronomia, veterinária e processos químicos (MACHADO et al., 2012).

Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2007) dispõe sobre a Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal, adotando Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, onde, entre outras particularidades referentes ao produto, entende-se por Kefir:

[...] produtos obtidos através da fermentação de leite, adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microorganismos específicos. Estes microorganismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade, cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnispurus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*.

Os grãos de kefir de água são bastante semelhantes aos grãos de kefir de leite em termos de estrutura, sendo que as bactérias e leveduras que compõem os grãos de kefir de água estão contidas em um polissacarídeo conhecido como dextran. Os grãos são também conhecidos como tibi, tibicos, kefir de açúcar, abelhas da Califórnia, abelhas Africanas, bálsamo de Gilead, fermentado de cerveja, Bèbés, sementes de cerveja japonesa, cristais tibetanos, grãos de kefir açucarados,

grãos do profeta, entre outros, o kefir de água tem sua origem incerta. A primeira descrição científica foi dos “grãos de cerveja de gengibre”, publicada por Ward em 1892, os quais foram utilizados por soldados britânicos na Guerra da Criméia em 1855. Em 1899, Lutz descreveu os grãos denominados “tibi”, originários do México, como grânulos fermentados a partir da seiva do cactus *Opuntia* e foram recolhidos das folhas da planta, muito comum na região. Tradicionalmente, os grãos fermentam água adoçada, aos quais figos e limão são adicionados para acrescentar sabor e nutrientes (FIORDA et al., 2017; HORISBERGER, 1969; MARSH et al., 2014; MIGUEL et al., 2011; PIDOUX, 1989; STADIE et al., 2013; WALDHERR et al., 2010). Já foram realizadas pesquisas utilizando vários vegetais e sucos de frutas, tais como: soja, cebola, gengibre, cenoura, maçã, abacaxi, uva, marmelo, kiwi, pera, melão, morango, romã, tomate e coco (CORONA et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; RANDAZZO et al., 2016).

Os países com maior consumo de kefir de água incluem os EUA, México e Canadá, na América do Norte; Japão, Tailândia e Malásia, na Ásia; França, Grécia, Turquia, Romênia, Rússia, Reino Unido, Holanda, Noruega, Suécia, Espanha e Portugal, na Europa; e Brasil, Chile, Peru e Argentina, na América Latina (FIORDA et al., 2017).

### **3.1.1 Propriedades benéficas do kefir de água**

A literatura vem relatando as propriedades benéficas de alimentos funcionais fermentados, como o kefir de água, em virtude da interação da microbiota viva ingerida (efeito probiótico) e dos metabólitos bioativos formados durante a fermentação (efeito biogênico), como, por exemplo, vitaminas, peptídeos, ácidos orgânicos e ácidos graxos (STANTON et al., 2005).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), define alimento funcional como todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde (redução dos riscos de doenças crônicas não transmissíveis), devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica. Como conceito de propriedade funcional, alega-se que: “é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano”. As

Resoluções nº 18 e 19, de 30 de abril de 1999 da ANVISA estabelecem as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Entre os alimentos funcionais e compostos ativos reconhecidos, podem ser citados: os ácidos graxos ômega-3, as fibras vegetais, licopeno, luteína, zeaxantina, resveratrol, carotenoides, flavonoides, fosfolípidios, organossulfurados, polifenóis, fitoesteróis, quitosana, psilium, prebióticos e os probióticos (BRASIL, 2013).

O desenvolvimento de alimentos funcionais requer pesquisa interdisciplinar e a colaboração entre cientistas da academia e da indústria. Por ser um campo do conhecimento em expansão, a área de alimentos funcionais está sendo valorizada pelos profissionais tanto da área de alimentos quanto de outras áreas relacionadas, como: saúde, química, entre outras, e seus resultados são rapidamente apropriados pela sociedade (TOMAÉL et al., 2007).

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”. Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro/indivíduo (FAO/WHO, 2006). Para exercerem sua eficácia, devem atender a certos critérios, entre eles: ter origem de alimentos, da microbiota indígena humana, ou outra, desde que a segurança seja comprovada por meio de estudos de toxicidade e mutagenicidade; ausência de patogenicidade, virulência, efeitos adversos, riscos à saúde; além de resistência a antibióticos; resistência aos processos tecnológicos, adesão aos tecidos epiteliais, estabilidade na presença de ácido e bile, capacidade de persistir no ambiente gastrointestinal, de influenciar atividades metabólicas, modulando o sistema imunológico; demonstrar efeito em humanos que podem ser alegados como tendo propriedade funcional ou de saúde; ter a/as espécie/s e linhagem/s identificada/s; possuir a quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício. Algumas exigências adicionais podem ser requeridas no caso de linhagens destinadas às crianças menores de três anos e gestantes, inclusive envolvendo análise de parâmetros de crescimento e desenvolvimento (COSTA; ROSA, 2010; BRASIL, 2018a).

A efetividade de um probiótico depende da sua classe (presença de diferentes linhagens de microrganismos), da dose e do tipo de alimentação, principalmente (KANDASAMY et al., 2017).

Por meio da pesquisa, há evidências de que as propriedades e funcionalidades dos microrganismos vivos nos alimentos têm demonstrado que os probióticos desempenham um papel importante nas funções imunológica, digestiva e respiratória. Como reflexo, ocorreu crescente interesse por parte dos consumidores, dos profissionais de saúde e comerciantes – com aumento do número e tipos de alimentos probióticos e bebidas disponíveis (FAO/WHO, 2006).

Ao considerar os alimentos com ação probiótica, vale salientar que metade do peso úmido do material colônico deve-se à presença de células bacterianas, cujo número excede 10 vezes a quantidade de células dos tecidos que formam o corpo humano. Isso é consequência da presença de quase 500 espécies de microrganismos no trato digestório em um indivíduo, que competem continuamente por sobrevivência e mantêm um equilíbrio que confere proteção ao organismo do hospedeiro. Esse equilíbrio, porém, pode ser desfeito, por exemplo, por meio da dieta, infecções intestinais, tratamento com antibióticos, quimioterapia ou situações de estresse (COSTA; ROSA, 2010).

Os probióticos podem ser recomendados tanto para situações envolvendo desequilíbrio no microbioma ou disbiose no trato gastrointestinal, como obstipação, diarreias causadas por patógenos, infecção por *Helicobacter pylori*, e doenças inflamatórias, como por exemplo, colites e doença de Crohn, quanto fora do trato gastrointestinal, como doenças cardiovasculares, urogenitais, obesidade e alergia. Porém, deve-se redobrar a atenção em pessoas que apresentam um risco aumentando de sofrer efeitos adversos, tais como aqueles com comprometimento imunológico, bebês prematuros, pacientes com síndrome do intestino irritável, aqueles com cateteres venosos centrais e pacientes com doença valvar cardíaca (DORON; SNYDMAN, 2015; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015; GUERGOLETTO; MAURO; GARCIA, 2017).

Além desses fatores, vale ressaltar a questão levantada pela hipótese da higiene, descrita em 1989, a qual alega que, apesar do aumento nos cuidados de higiene terem permitido reflexos na qualidade de vida, como a redução da mortalidade infantil e expansão da expectativa de vida, ambientes muito limpos resultaram no aumento de doenças como alergias e asma. De acordo com essa conjectura, é importante que nosso sistema imunológico seja constante e apropriadamente desafiado pela exposição a microrganismos não patogênicos

(FORSYTHE, 2013; LAMBRECHT; HAMMAD, 2017). O consumo de kefir de água é uma opção de produto com essa função.

Apesar de alimentos tradicionais fermentados por meio de culturas mistas, como o kefir de água, não serem considerados probióticos, devido ao requerimento de comprovação do atendimento a uma gama de critérios, e por ser necessário conhecer os gêneros e, se possível, as espécies das estirpes probióticas, essas informações são úteis para o trabalho envolvido na avaliação científica durante a produção de um novo alimento (FAO/WHO, 2006). Nesse sentido, importantes bioatividades foram associadas ao consumo do kefir de água, como atividades antimicrobianas, antiedematogênicas, antiinflamatórias, antioxidantes, cicatrizantes e curativas (FIORDA et al., 2017).

Estudos recentes demonstraram a presença de bifidobactérias em amostras de kefir de água. Estas bactérias são amplamente conhecidas por sua participação na síntese de vitaminas do complexo B e vitamina K no intestino. Isso, por sua vez, protege o corpo das deficiências de nutrientes de importância vital, necessárias para melhorar a saúde óssea, prevenir fraturas e reduzir o risco de hemorragia associada ao uso de antibióticos em longo prazo. As bifidobactérias também aumentam as populações de organismos associados à diminuição das concentrações fecais de bactérias potencialmente patogênicas e à diminuição dos níveis de compostos cancerígenos e putrefativos no sistema digestório. Portanto, o consumo de uma bebida de kefir de água, pode ser ligado a características funcionais derivadas do metabolismo dos probióticos presentes neles (FIORDA et al., 2017; LAUREYS et al., 2016; LAUREYS; DE VUYST, 2014; LIU et al., 2006).

Dependendo do método de cultivo e da fonte do inóculo dos grãos de kefir, o produto final vai ter características diferenciadas em diversos aspectos, tais como: o crescimento do grão de kefir de água, as contagens dos microrganismos, o tempo até o esgotamento total de carboidratos presentes nos substratos, as concentrações finais de metabólitos e a diversidade de espécies microbianas (LAUREYS et al., 2017; LAUREYS; DE VUYST, 2017).

### **3.1.2 Microbiota do kefir**

A composição da população microbiana pode variar em função de fatores como: origem dos grãos, substratos e métodos de cultivo usados (MARSH et al., 2014; PIDOUX, 1989). Há predominância de bactérias do ácido láctico (BAL) e uma

menor quantidade de bactérias do ácido acético (BAA), que combinadas, representam uma proporção de 2 a 10 vezes em relação às células de leveduras (LAUREYS, DE VUYST, 2014). Laureys e de Vuyst (2017), ao trabalhar com três fontes diferentes de kefir de água, observaram que havia diferença relativa na quantidade de leveduras e bactérias, mas a razão entre elas era constante nos grãos.

Na Tabela 1 encontra-se um resumo das bactérias já isoladas de kefir de água e de leite. As BAL, apesar de constituir um grupo bastante heterogêneo, possuem em comum as seguintes características: são Gram-positivas, não esporuladas, catalase negativas, imóveis e fermentam carboidratos a compostos como ácido láctico, ácido acético, álcool e dióxido de carbono. Também ocorre a formação de peptídeos com ação bioativa de bacteriocinas. Preferem condições microaerófilas, porém, são aerotolerantes, portanto, anaeróbicos facultativos. Produzem enzimas glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, que transformam os nutrientes fundamentais dos alimentos em compostos com importantes propriedades sensoriais. *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* são considerados os principais gêneros. Alguns benefícios à saúde relacionados às BAL são: inibição de patógenos e estímulo do sistema imune, tratamento de intolerância à lactose e diarreias (MONAR et al., 2014; MOTTA; GOMES, 2015; SILVA et al., 2009).

A produção do ácido láctico pelas BAL pode gerar energia para as mesmas por meio da via homofermentativa, sendo o AL (ácido láctico) o principal metabólito resultante, ou heterofermentativa, onde além do AL, outros produtos são sintetizados. Os integrantes desse grupo são frequentemente associados ao preparo de alimentos fermentados, como iogurtes, queijos, leites, pães, manteiga, vinhos, carnes, embutidos, pickles, vegetais, silagem e outros. Além disso, são comumente encontrados em diversos nichos, desde as plantas até o trato gastrointestinal dos animais. Dentre esses membros das BAL, o *Lactococcus lactis* é considerado como modelo no estudo das mesmas. Novas aplicações das BAL são atualmente exploradas em pesquisas para a produção de proteínas de interesse biotecnológico, enzimas, como as lipases, vacinas orais etc. (AZEVEDO; MIYOSHI, 2004).

As BAA pertencem à família *Acetobacteraceae*, são estritamente aeróbias, Gram-negativas, catalase positivas e possuem a forma de bastonetes, podendo

ocorrer de forma única, em pares ou em cadeias. São também mesófilas e seu crescimento ótimo está situado entre 25 e 30 °C. Oxidam etanol ou açúcar (glicose) a ácidos orgânicos correspondentes, tais como ácido acético e ácido glucônico, na presença de oxigênio (CHEN et al., 2013).

**Tabela 1** - Resumo das bactérias isoladas de kefir de água e de leite.

Bactérias	Kefir de água	Kefir de leite	Referências
Gênero	Espécies	Espécies	
<i>Acetobacter</i>	<i>A. fabarium</i> , <i>A. lovaniensis</i> , <i>A. orientali</i>	<i>A. lovaniensis</i> , <i>A. orientalis</i> , <i>A. sicerae</i>	LAUREYS et al., 2016; BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016; GAROFALO et al., 2015; KORSAK et al., 2015; LI et al., 2014; MARSH et al., 2013; GAO et al., 2013; GULITZ et al., 2013, 2011; MAGALHÃES et al., 2010
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. aquikefiri</i>	<i>B. breve</i> , <i>B.</i> <i>choerinum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. pseudolongum</i>	LAUREYS et al., 2016; VUYST et al., 2016; MARSH et al., 2013; DOBSON et al., 2011
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L.</i> <i>casei</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>L. collinoides</i> <i>L. diolivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L.</i> <i>fructivorans</i> , <i>L. harbinensis</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. hordeii</i> , <i>L. kefirano-faciens</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. mali</i> , <i>L. nagelli</i> , <i>L. parabuchneri</i> <i>L. paracasei</i> , <i>L.</i> <i>parafarraginis</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. satsumensi</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L.</i> <i>brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudop-lantarum</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. curvatis</i> <i>L. delbrueckii</i> , <i>L.</i> <i>fermentum</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L.</i> <i>gasseri</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>L.</i> <i>intestinalis</i> , <i>L. kefirano-faciens</i> , <i>L. kefiri</i> , <i>L.</i> <i>kefirgranum</i> , <i>L. otakiensis</i> , <i>L.</i> <i>paracasei</i> , <i>L. parakefir</i> , <i>L.</i> <i>parabuchneri</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sake</i> , <i>L. satsumensis</i> <i>L. sunkii</i> , <i>L.</i> <i>viridescens</i>	LAUREYS; VUYST, 2017; FIORDA et al., 2016; BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016; LAUREYS et al., 2016; ZANIRATI et al., 2015; GULITZ et al. 2013; 2011; KESMEN, KACMAZ, 2011; MAGALHÃES et al. 2010; SABIR et al., 2010; WALDHERR et al., 2010; CHEN; WANG; CHEN; 2008; WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2004; SIMOVA et al., 2002; GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2001; GALLI et al., 1995; PIDOUX, 1989; MOINAS; HORISBERGER; BAUER, 1980
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. citreum</i> , <i>L. mesenteroides</i>	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L.</i> <i>pseudomesenteroides</i>	FIORDA et al., 2016; BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016; GAO et al., 2013; GULITZ et al., 2013; 2011; KESMEN, KACMAZ 2011; ; SABIR et al., 2010; MAGALHAES et al., 2010; WALDHERR et al., 2010; GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2001

<i>Lactococcus</i>		<i>L. cremoris</i> , <i>L. garvieae</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. raffinolactis</i>	BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016; GAO et al, 2013, MAGALHAES et al., 2011, KESMEN, KACMAZ, 2011; SABIR et al., 2010; YUKSEKDAG; BEYATLI; ASLIM, 2004
<i>Pediococcus</i>		<i>P. acidilactici</i> , <i>P. clausenii</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>P. dextrinicus</i> , <i>P. halophilus</i> , <i>P. lolii</i> , <i>P. pentosaceus</i>	NALBANTOGLU et al, 2014; SABIR et al., 2010
<i>Streptococcus</i>		<i>S. durans</i> , <i>S. thermophilus</i>	GAO et al, 2013; KESMEN, KACMAZ, 2011; CHEN; WANG; CHEN; 2008; YUKSEKDAG; BEYATLI; ASLIM, 2004; SIMOVA et al., 2002
Outras espécies	<i>Acinetobacter</i> , <i>Bifidobacterium psychraerophilum</i> , <i>Dekkera anomala</i> , <i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Dysgonomonas</i> , <i>Enterobacter hormachei</i> , <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Gluconobacter frateurii</i> , <i>Lysinibacillus sphaericus</i> , <i>Oenococcus kitaharae</i> , <i>Oenococcus oeni</i> , <i>Pelomonas</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Weissella</i> , <i>Zymomonas</i>		FIORDA et al., 2016; ZANIRATI et al., 2015; NALBANTOGLU et al., 2014; GULITZ et al., 2013; MARSH et al., 2013; GAO et al., 2013; WALDHERR et al., 2010

**Fonte:** Adaptado pela própria autora.

As BAA desempenham um importante papel na produção de alimentos e bebidas, como vinagre e Kombucha, mas podem ser deteriorantes em outros alimentos como vinho, cerveja e frutas. Também são utilizadas na produção de outros compostos, tais como: ácido glucônico, sorbose e celulose bacteriana (RASPOR; GORANOVIČ, 2008). As espécies pertencentes aos gêneros *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter* (atualmente denominado *Komagataeibacter*), são as principais responsáveis pela produção de vinagre devido à alta capacidade em oxidar o etanol a ácido acético (GOMES, 2017; YETIMAN; KESMEN, 2015).

As leveduras são fungos unicelulares, incluindo ascomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos (fungos imperfeitos). Apresentam reprodução assexuada por brotamento ou gemulação, com alta diversidade fisiológica, são quimioheterotróficas, obtendo sua energia a partir de compostos orgânicos, abrangendo uma ampla gama de fontes de carbono, incluindo carboidratos (mais importante em termos de serem aplicadas biotecnologicamente), álcoois, ácidos orgânicos, aminoácidos, n-alcanos e lipídios. Entre os monossacarídeos, o metabolismo das hexoses (glicose, frutose, manose) é realizado principalmente pela via glicolítica. A utilização de galactose exige a ação do caminho de Leloir. A utilização de pentose é restrita taxonomicamente e requer atividades de xilose redutase, xilitol desidrogenase, xiluloquinase e a via da pentose-fosfato. A utilização de oligossacarídeos e polissacarídeos é iniciada por hidrólise para disponibilizar seus componentes monossacarídeos e a expressão das hidrolases apropriadas pode também ser taxonomicamente restrita (QUEROL; FLEET, 2006).

O piruvato formado pela glicólise pode ser fermentado para etanol ou ser oxidado em CO<sub>2</sub> pelo ciclo do ácido cítrico. Em ambos os casos, o NADH produzido pela glicólise é reoxidado para NAD<sup>+</sup>. Na fermentação, o piruvato é clivado em acetaldeído e CO<sub>2</sub> pela piruvato descarboxilase. O acetaldeído então formado é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase. O acetaldeído também é utilizado na produção de acetil-coenzima A (ACoA), que é utilizada para a biossíntese de lipídios e aminoácidos. Portanto são aptas a serem utilizadas em uma vasta gama de produtos (QUEROL; FLEET, 2006).

Enquanto as leveduras compreendem menos de 0,1% da microbiota intestinal, são 10 vezes maiores do que os procaríotas e podem, assim, impedir a colonização de bactérias patogênicas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comum nos grãos de kefir, está associada com a produção de vitaminas do complexo B e alguns aminoácidos. *Saccharomyces boulardii* é uma levedura reconhecidamente probiótica (MARSH et al., 2014; MONAR et al., 2014).

O principal mecanismo de ação da *S. boulardii* é a sua capacidade de interferir com a colonização da mucosa pelos patógenos, prevenindo a infecção. Age, também, regulando a homeostase microbiana intestinal, modulando as respostas imunes humorais locais e sistêmicas, estabilizando a função da barreira gastrointestinal e induzindo a atividade enzimática, favorecendo a absorção e a nutrição (TOMIČIĆ et al., 2016). Estudos em camundongos apontam que esta

protege contra toxinas de *Clostridium difficile* e contra infecções por *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri* (COPPOLA; TURNES, 2004). Portanto, seu consumo é adequado para a maioria da população. Porém, há casos raros relatados de infecções sistêmicas, atividades metabólicas deletérias, excessivo estímulo imune, efeitos colaterais gastrointestinais, assim como transferência gênica (DORON; SNYDMAN, 2015). Portanto, em pacientes de risco, estes devem ter acompanhamento clínico e uso de planilha de monitoramento dos dados de segurança (SNYDMAN, 2008).

Leveduras e produtos derivados destas têm sido utilizadas pela indústria de alimentos e continua a ser uma área em rápido crescimento, com foco recente na melhoria da saúde humana, por meio de seu potencial nutracêutico. Apresentam como produtos vitaminas, esteróis, carotenoides, lipídios, enzimas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, além dos compostos química, física ou enzimaticamente modificados. Como derivados dos componentes das células de levedura encontram-se as proteínas modificadas quimicamente (aciladas, enzimas fosforiladas, encapsuladas, imobilizadas), fisicamente (parcialmente desnaturadas ou texturizadas), enzimaticamente, parcialmente digeridas por tratamento ácido ou enzimático (com aminoácidos, nucleotídeos e nucleosídeos ligados covalentemente). Além de substâncias aromatizantes, substitutos de sal ou saborizantes. Na Tabela 2 encontra-se um resumo das leveduras já isoladas de kefir de água e de leite.

Quanto à identificação de microrganismos, acreditava-se que menos de 1 % poderiam ser cultivados em meios específicos em condições laboratoriais (HUGENHOLTZ, 2013). Portanto, ao se identificar a presença de microrganismos apenas a partir de culturas cultiváveis, geralmente várias espécies podem ser excluídas. A identificação, com base em técnicas moleculares, tem sido realizada, há mais de 40 anos, baseada, por exemplo, em sequências do gene 16S rRNA, em nível de gênero, ou até de espécies. Diversos métodos podem ser empregados em conjunto para aumentar o poder discriminatório, como a hibridização DNA-DNA, o sequenciamento de genes codificadores de proteínas e alguns parâmetros taxonômicos específicos. Atualmente, métodos menos laboriosos, que utilizam técnicas de *DNA-fingerprinting*, baseados na reação da cadeia da polimerase (PCR), como a amplificação de elementos repetitivos do DNA bacteriano (rep-PCR), destacando a (GTG)<sub>5</sub>-PCR, gera um padrão de bandas de alta complexidade, sendo rápida e reprodutível para a distinção de espécies, subespécies e até linhagens

(FELIS; DELLAGLIO, 2007; GEVERS; HUYS; SWINGS, 2001; LEWIS et al., 2010; RUIZ et al., 2000).

Tabela 2- Resumo das leveduras isoladas de kefir de água e de leite.

Leveduras	Kefir de água	Kefir de leite	Referências
Gênero	Espécies	Espécies	
<i>Candida</i>	<i>C. kefir</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. valida</i>	<i>C. inconspicua</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lambica</i> , <i>C. maris</i> , <i>C. valida</i>	WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2005, 2004; SIMOVA et al., 2002; PIDOUX, 1989
<i>Sacharomyces</i>	<i>S. bayanus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. florentinus</i> , <i>S. pretoriensis</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. turicensis</i>	LAUREYS; VUYST, 2017; NCBI, 2017; FIORDA et al., 2016; LAUREYS et al., 2016; GULITZ et al., 2013, 2011; PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012; MAGALHAES et al., 2010; WALDHERR et al., 2010; WANG et al., 2008; SIMOVA et al., 2002; GALLI et al., 1995
<i>Pichia</i>	<i>P. kudriavzevii</i> , <i>P. membranifaciens</i>	<i>P. fermentans</i>	FIORDA et al., 2016, WANG et al., 2008
<i>Lanchancea</i>	<i>L. fermentati</i> , <i>L. meyericii</i>	<i>L. meyericii</i>	NCBI, 2017; FIORDA et al., 2016; GULITZ et al 2011; MAGALHAES et al., 2011; MAGALHAES et al., 2010,
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis</i> , <i>K. marxianus</i>	<i>K. lactis</i>	PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012; MAGALHÃES et al., 2011, 2010; WANG et al., 2008; GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2001
<i>Kazachstania</i>	<i>K. aerobia</i> , <i>K. unispora</i>		PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012; MAGALHAES et al., 2010
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. uvarum</i> , <i>H. yalbyensis</i>		FIORDA et al., 2016; GULITZ et al., 2011; FRANZETTI et al., 1998
Outras espécies	<i>Dekkera bruxellensis</i> , <i>Issatchenki aorientalis</i> , <i>Torulaspora</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i> , <i>Zygotorulaspora florentina</i>	<i>Cryptococcus humicolus</i> , <i>Geotrichum candidium</i> , <i>Zygosaccharomyces fermentati</i>	LAUREYS; VUYST, 2017; NCBI, 2017; FIORDA et al., 2016; LAUREYS et al., 2016; GULITZ et al 2011; WITTHUHN; SCHOEMAN; BRITZ, 2005; NEVE, HELLER, 2002

**Fonte:** Adaptado pela própria autora.

Estudos usando técnicas moleculares, como, por exemplo, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*

(ARDRA) e metagenômica, levaram a grandes avanços na compreensão da diversidade de leveduras e bactérias durante a fermentação do kefir de água (FIORDA et al., 2017).

Por meio de análises baseadas em sequenciamento genético independente das culturas, de amostras coletadas do Reino Unido, Canadá e EUA, um projeto inscrito no National Center for Biotechnology Information revela que a porção bacteriana de cada kefir de água e seus respectivos grãos foi dominada por *Zymomonas*, uma bactéria produtora de etanol, que não foi detectada em tal escala anteriormente. Os outros gêneros detectados foram representantes das BAL: *Lactobacillus* (presentes consistentemente em níveis consideráveis) e *Leuconostoc*; e as BAA: *Acetobacter* e *Gluconacetobacter* (presentes em baixas concentrações). Na análise do componente fúngico foi estabelecido que era composto pelos gêneros *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Torulasporeae* e *Lachancea* (NCBI, 2017).

### 3.1.3 Grãos de kefir de água

Os grãos de kefir geralmente não são comercializados no Brasil. Seu uso é difundido por meio de doação de pessoa a pessoa ou via correio. São compostos por uma matriz insolúvel de exopolissacarídeos (EPS) sintetizada por meio de enzimas extracelulares denominadas glicosiltransferases, que é constituída principalmente por com ligações glicosídicas  $\alpha$  1-6, chamado dextran – análogo ao kefiran produzido na cultura de kefir cultivada no leite. É importante na formação dos grãos, pois mantém unidas bactérias com as leveduras. O EPS é produzido pelas BAL, especialmente o *Lactobacillus hilgardii*, que também está presente na fermentação de vinhos e de cacau (LAUREYS; VUYST, 2014; MONAR et al., 2014).

Pesquisas indicam que *L. casei*, *L. hordei*, *Lactobacillus nagelii*, *L. hilgardii*, *L. mesenteroides*, *L. kefiranofaciens* e *L. satsumensis* foram capazes de produzir EPS tendo sacarose como fonte (GULITZ et al., 2011; PAIVA et al., 2016). A produção de EPS por BAA também pode ocorrer, como as dos gêneros *Komagataeibactere* *Gluconacetobacter* e é detectada pela formação de uma película gelatinosa produzida sobre a superfície de meios líquidos, quando cultivadas em condições estáticas, ou pelo surgimento de massas esféricas e/ou irregulares, de até 10 mm de tamanho, sob cultivo em condições agitadas (GU; CATCHMARK, 2012).

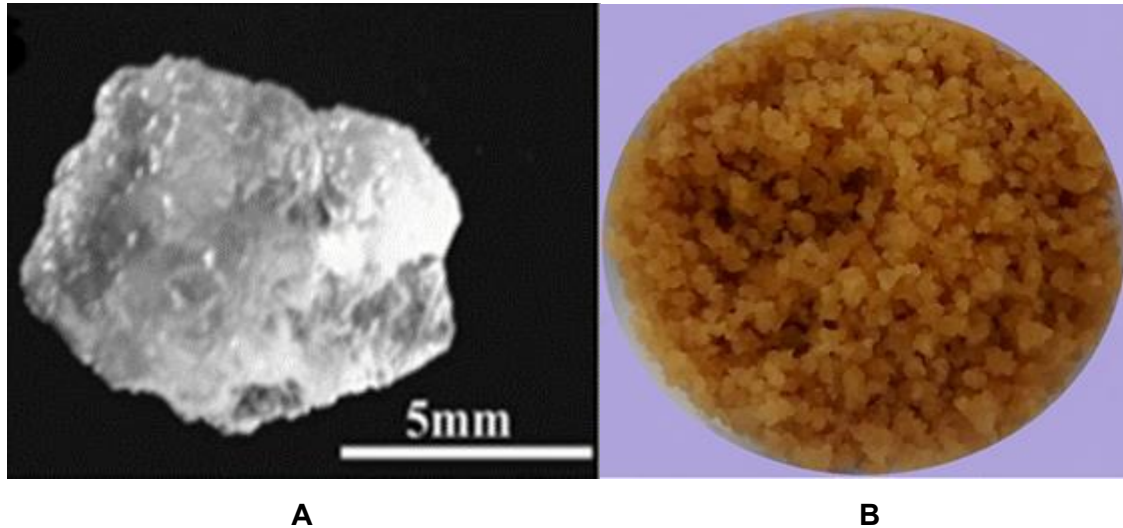
Na indústria de alimentos, que inclui fermentações em seus processos, é interessante que haja imobilização dos microrganismos envolvidos, para aumentar a eficiência, com vantagens incluindo: aumento das taxas de reação devido à separação fácil das células microbianas no final da etapa de fermentação, altas concentrações de células, operação mais fácil em modo contínuo e separação fácil das células microbianas no final da etapa de fermentação (QUEROL; FLEET, 2006). Os grãos de kefir formam uma associação natural e estável entre as diferentes linhagens, que não é perdida pela falta de condições de cultura assépticas, e é naturalmente uma matriz de fixação para os microrganismos presentes realizarem a fermentação (PIDOUX, 1989). Em outras palavras, o EPS mantém a estrutura que une as bactérias e leveduras, formando o grão, sendo que a maioria desses microorganismos está presente nos grãos (LAUREYS; de VUYST, 2017).

Pidoux e colaboradores (1992) sugerem que o polissacarídeo pode ser usado como agente de gelificação e Waldherre e colaboradores (2010) afirmam que a alta produção de glucanas oferece muitas aplicações industriais na área de alimentos e biotecnologia. Paiva e colaboradores (2016) citam seu uso como espessantes, estabilizantes, agentes gelificantes, sendo que alguns biopolímeros são considerados como promotores de saúde, devido ao seu papel como prebióticos e suas propriedades imunomoduladoras. Stulp, Gnas e Clemente (2014) utilizaram grãos de kefir como revestimento comestível para prolongar a conservação e qualidade nutricional de mirtilo. Outros usos possíveis de dextrans são em processos de chapeamento papel e metais, na recuperação melhorada de óleo, como estabilizadores de xarope de alimentos e melhoradores de massa (DE VUYST et al., 2001).

Os grãos são translúcidos, gelatinosos, de tamanho irregular (Figura 1), possuem diâmetro médio de 3 a 35 mm e tendem a depositar-se no fundo do recipiente. Alguns grãos sobem à superfície devido ao acúmulo de CO<sub>2</sub>, e descem novamente ao perderem o gás. Eles aumentam em tamanho e dividem-se no meio de crescimento, resultando em um maior número de células a serem imobilizadas. A fissão é determinada pela pressão interna de CO<sub>2</sub>. O gás pode deixar os grãos ociosos. Sua composição química (%peso/peso) é de 89-90 % de água, 0,2 % lipídeos, 3,0 % proteínas, 6,0 % carboidratos e 0,7 % de cinzas. Podem ser preservados por congelamento, liofilização e refrigeração (MONAR et al., 2014; PIDOUX, 1989; SILVA et al., 2009).

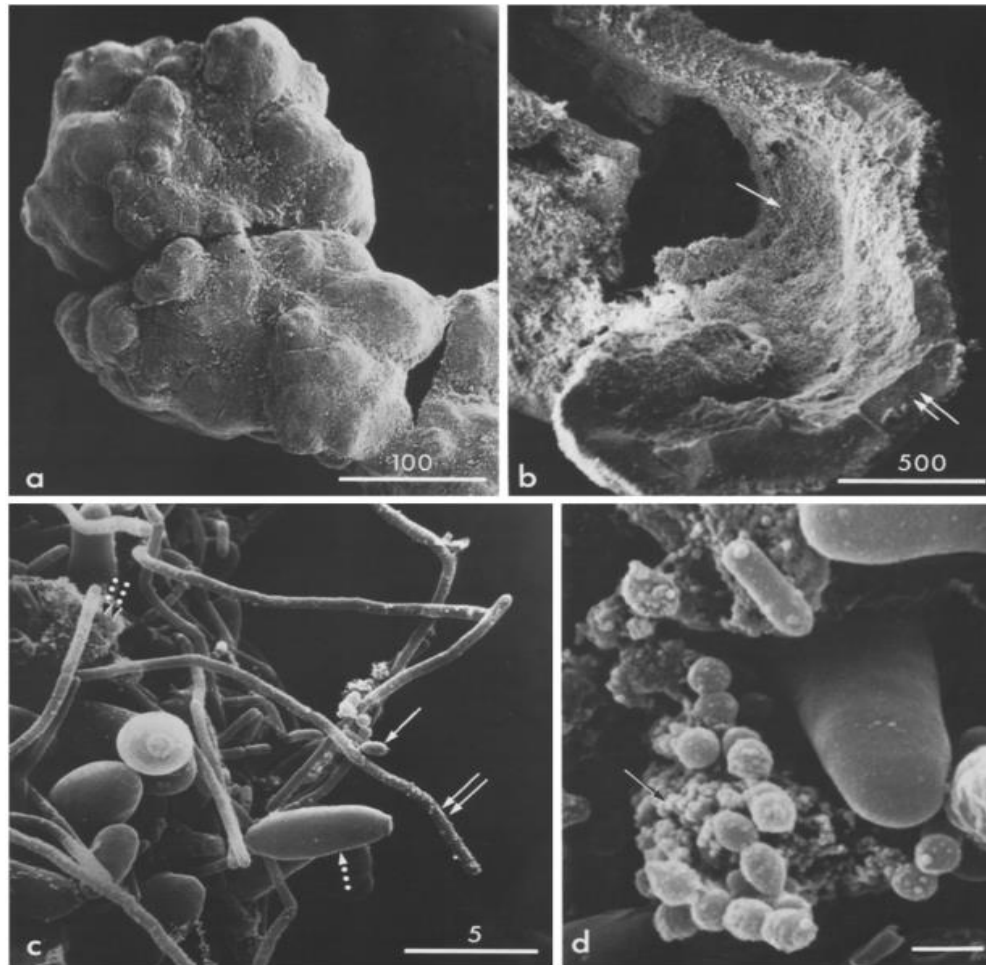
É possível distinguir nos grãos uma camada externa mais compacta e densamente populada pelos microrganismos embebidos no dextran e uma estrutura interna esponjosa (MOINAS; HORISBERGER; BAUER, 1980) (Figuras 2 e 3).

**Figura 1** - Grãos de kefir de água.



**Fontes:** A: MAGALHÃES et al. (2010); B: Própria autora.

**Figura 2** - Micrografias Eletrônicas de Varredura de grão de Kefir de Água.



a - Um grão no processo de fissão;

b - Grão fraturado com sua estrutura esponjosa interna (seta) e uma camada compacta externa (seta dupla);

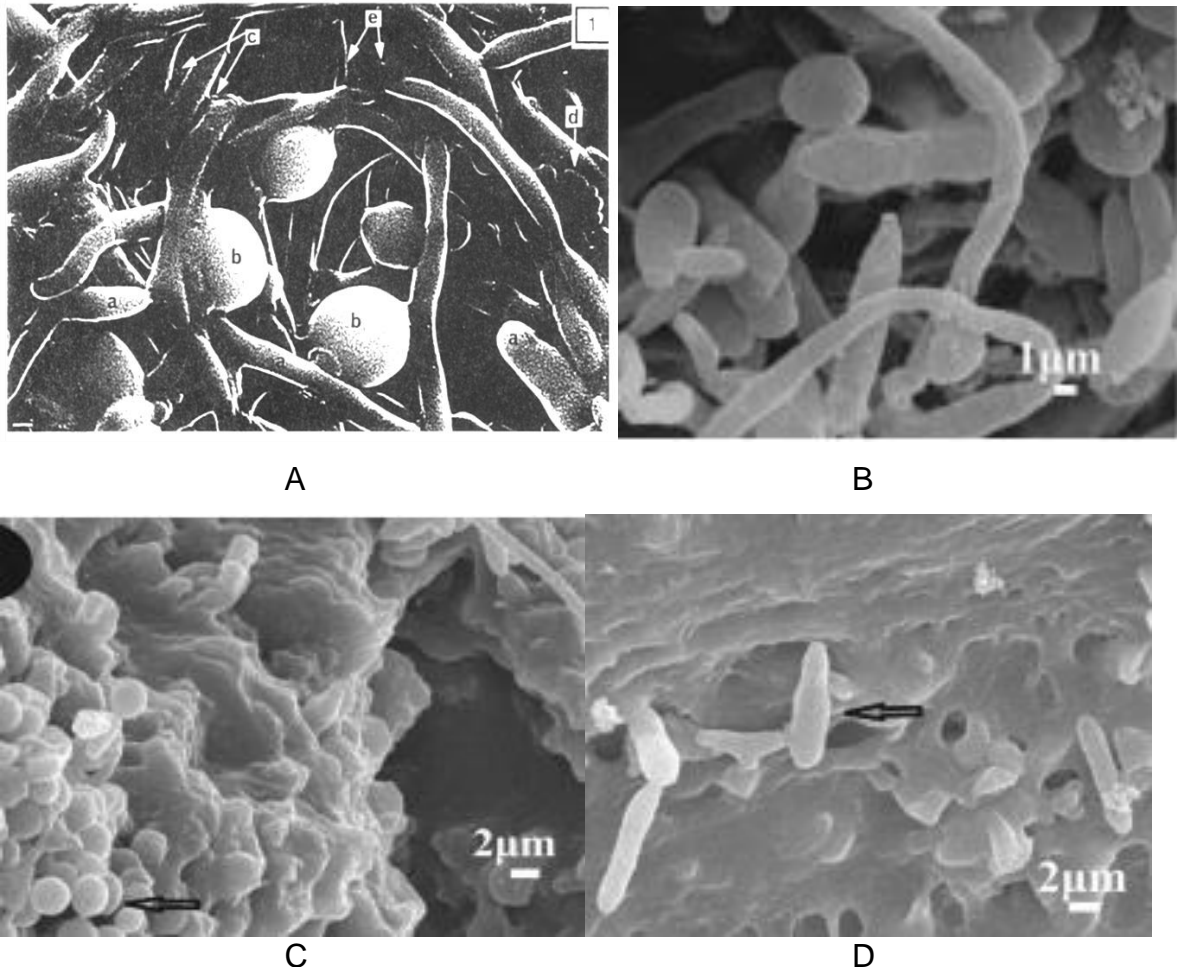
c - A camada externa contém estreptococos (seta) lactobacilos (seta dupla), leveduras (seta pontilhada) e dextrano (seta pontilhada dupla); e

d - Os estreptococos são incorporados no dextrano (seta).

A barra representa 1  $\mu\text{m}$  ou um múltiplo dele.

**Fonte:** MOINAS; HORISBERGER; BAUER (1980).

**Figura 3** - Microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de água.



A e B: Rede de pseudomicetos (a), blastosporos (b), cocci (d) e bacilos (e), presos por uma substância adesiva (c);  
 C = Seta aponta para bactéria; e  
 D = Seta aponta para levedura.  
 A barra representa 1  $\mu\text{m}$  (A e B) e 2  $\mu\text{m}$  (C e D).  
**Fontes:** A: PIDOUX (1989); B, C e D: MAGALHÃES (2008).

### 3.1.4 Fermentação por grãos de kefir de água

Fermentação, palavra derivada do latim “*fervere*”, é um conjunto de reações que envolvem oxidação da glicose em ácido pirúvico (glicólise) e sua redução. Dependendo da molécula orgânica que é produzida a partir do ácido pirúvico, é classificada como láctica, a que produz ácido lático, ou alcoólica, a que produz etanol, sendo que este pode ser oxidado e formar ácido acético, pela bactéria *Acetobacter aceti*, sob condições aeróbias. Os microrganismos, ao fermentarem um alimento, acrescentam propriedades que os tornam mais nutritivos, mais saborosos,

aromatizados, além de aumentar seu tempo de prateleira (BOURDICHON et al., 2012; HE et al., 2017; LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

Como exemplos de produtos que têm sido utilizados para fermentação, podem ser citados: grãos, verduras, legumes, frutas, leites, carnes, peixes, mel, chás, soja e feijão, resultando em uma miríade de produtos, como cervejas (cevada), vinhos (frutas), vinagres (cana, frutas, arroz), chucrute (repolho), missô (arroz, cevada e soja), nattô (soja), shoyu (soja), Pu-erh (chá), iogurte (leite), salame e (carne) kombucha (chás) (HE et al., 2017).

Kombucha apresenta semelhanças com o kefir de água, considerando que também é uma associação de bactérias e leveduras que usam o açúcar como substrato. A principal diferença, é que também utiliza chá, tradicionalmente infusão de *Camellia sinensis*, no processo de fermentação. No Brasil, está sendo desenvolvido um processo de instrução normativa com o objetivo de estabelecer o padrão de identidade e qualidade de kombucha. Este trabalho pode ser utilizado para fomentar que no futuro, também se estabeleça normas que norteiem a produção industrial de kefir de água (BRASIL, 2018b).

Os principais metabólitos produzidos durante a fermentação do kefir de água são: etanol, ácido lático, glicerol, ácido acético e manitol; e os compostos formadores de aroma são: 2-metil-1-propanol, álcool isoamílico, acetato de etila, acetato isoamílico, hexanoato etílico e octanoato etílico. Dentre esses, incluindo também o ácido fórmico, ácido propiônico e bacteriocinas, vários apresentam atividade protetora, como a inibição de patógenos (BOURDICHON et al., 2012; LAUREYS, DE VUYST, 2014).

A fermentação de bebidas com propriedades promotoras de saúde é nativa para muitas regiões da Ásia, África, Europa, Oriente Médio e América do Sul. Evidências de vasos de cerâmica mostram que bebidas fermentadas de arroz, mel e frutas datam de 7000 AEC na China. Nota-se, porém, que o uso de materiais preservados por meio da fermentação têm sido adotados pelo homem desde o período neolítico, cerca de 10000 anos AEC (BOURDICHON et al., 2012; BRASIL, 2014, MARSH et al., 2014).

Há evidências de que algumas bebidas fermentadas proporcionam efeitos benéficos por meio da ação probiótica microbiana direta e indireta, por meio da produção de metabólitos e quebra de proteínas complexas. Por exemplo: ácidos orgânicos, que diminuem o pH das bebidas. Apesar da necessidade de estudos

definitivos que demonstrem benefícios de saúde diretos aos consumidores, estudos *in vitro* e em animais dão motivos para otimismo (MARSH et al., 2014). Alsayadi e colaboradores (2014), trabalhando com ratos Wistar com diabetes induzida por estreptozotocina, concluíram que kefir de água pode ser usado como alimento para diabéticos, visando controle de níveis de glicose e lipídeos.

A atividade antioxidante é aumentada graças à adição de microrganismos em alimentos, quando favorecem o processo de fermentação, devido aos metabólitos formados (ALSAYADI et al., 2013).

A Figura 4 apresenta um diagrama representando um resumo de como os microrganismos identificados no kefir de água, de fonte tradicional mexicana, hipoteticamente realizariam as etapas da fermentação, segundo Martinez-Torres e colaboradores (2017).

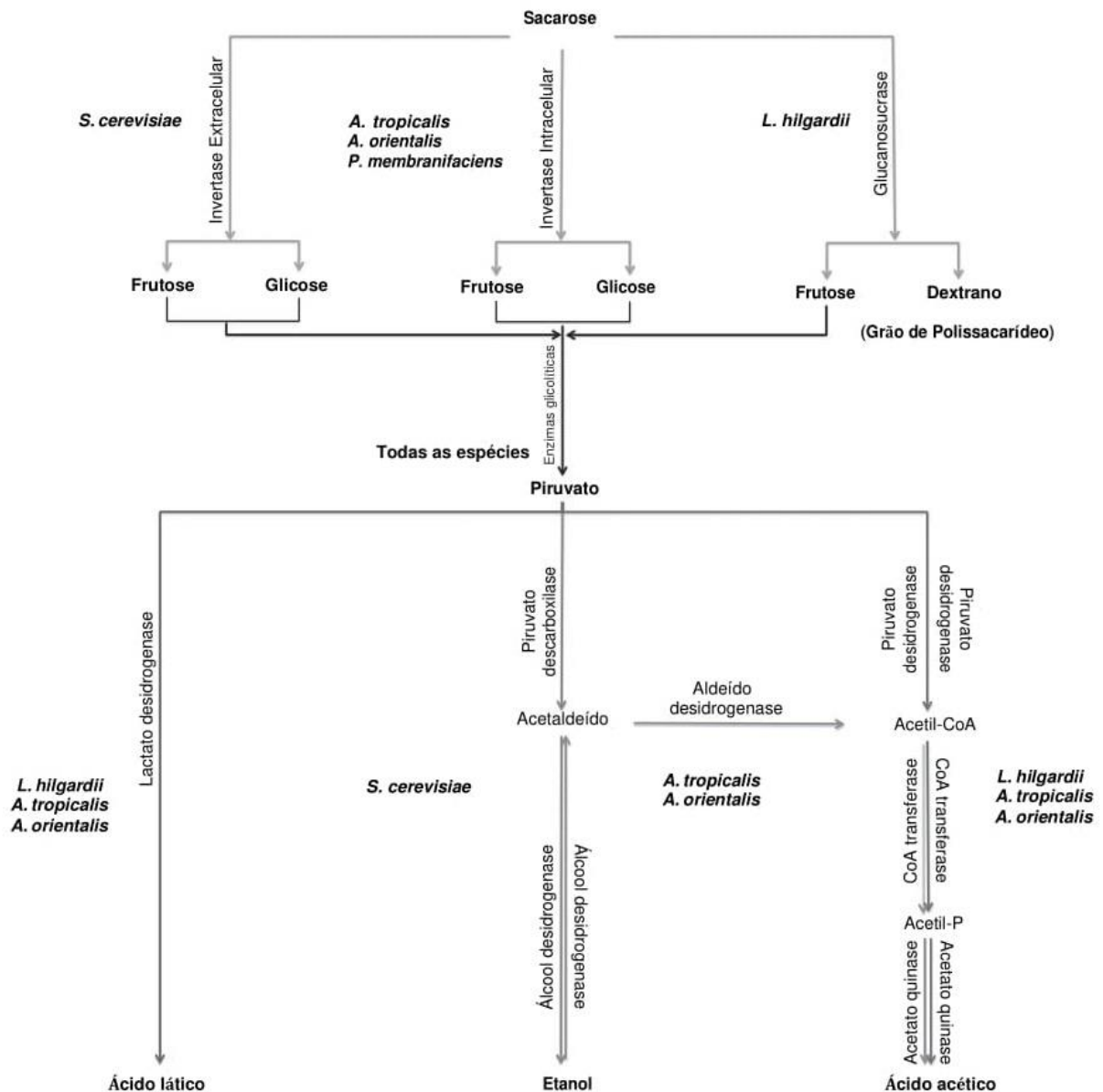
O açúcar, como principal substrato para produção do kefir de água, tem suas moléculas de sacarose hidrolisadas durante a fermentação (Figura 5, (b)). Com essa quebra da ligação covalente, conseqüentemente, seus açúcares redutores são disponibilizados: a glicose e a frutose, que têm a mesma fórmula química:  $C_6H_{12}O_6$ , sendo denominadas isômeros. As posições dos oxigênios e dos carbonos diferem nas duas moléculas e, conseqüentemente, têm propriedades físicas e químicas diferentes. A glicose é classificada como uma aldohexose e a frutose, uma cetohexose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A frutose é o açúcar natural mais doce, 30% mais doce que a sacarose e 80% mais doce que a glicose, se apresentando como ingrediente amplamente utilizado na indústria alimentícia (PUTRA et al., 2014).

O acompanhamento do processo fermentativo pode ser realizado por meio de características que detectem as mudanças ocorridas no produto. Além disso, vários componentes podem ser utilizados como marcadores discriminantes e referência como substâncias importantes para caracterizar o sabor nos alimentos, assim como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e diversos compostos voláteis. Essa técnica de pesquisa pode ser denominada como análise metabolômica (ZHAO et al., 2016).

A produção de ácido cítrico tem sua importância econômica presente desde a abertura da primeira fábrica em 1923. Atualmente, predomina a síntese por via fermentativa, principalmente o processo submerso, a partir de melaços de cana e de

beterraba, em meio ácido (pH próximo a 2,0), empregando o fungo filamentoso *Aspergillus niger* (APLICAÇÕES, 2014).

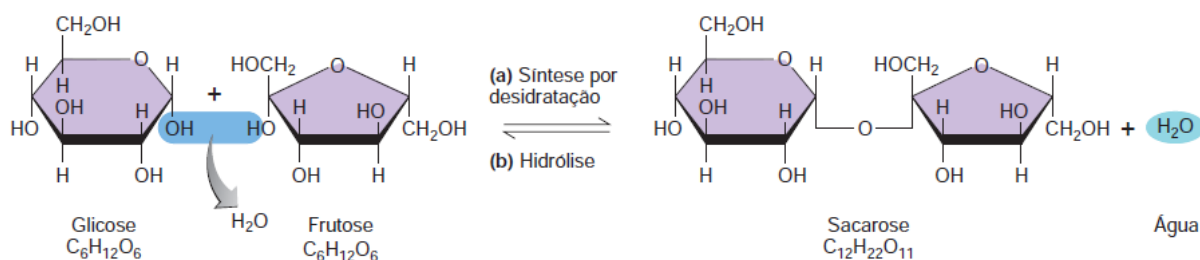
**Figura 4** - Fluxograma hipotético de carbono durante uma fermentação em Kefir de água, a partir da sacarose, mostrando os principais produtos metabólicos.



As fermentações do etanol (alcoólica), do ácido láctico e do ácido acético e a produção de ácido acético a partir de etanol estão indicadas. Os microrganismos do kefir de água estão nomeados, em cada via metabólica relevante da hidrólise da sacarose. As enzimas hipotéticas em cada reação são mostradas ao lado das setas.

**Fonte:** MARTINEZ-TORRES et al. (2017).

**Figura 5.** Síntese por desidratação e hidrólise da sacarose.



- (a) Na síntese por desidratação (da esquerda para a direita), os monossacarídeos glicose e frutose se combinam para formar a molécula de dissacarídeo sacarose. Uma molécula de água é liberada na reação.
- (b) Na hidrólise (da direita para a esquerda), a molécula de sacarose é quebrada nas moléculas menores glicose e frutose. Para que a reação de hidrólise ocorra, deve ser adicionada água à sacarose.

**Fonte:** TORTORA; FUNKE; CASE (2012).

O ácido láctico é amplamente utilizado em alimentos, fármacos, cosméticos, detergentes, resinas, impressão em tecidos, adesivos etc. A produção de ácido láctico cresce rapidamente no mercado global. A estimativa de produção mundial foi de 367.300 t em 2017 (LEE et al., 2017).

O ácido succínico é um antioxidante eficiente, normaliza o metabolismo energético e tem um papel no ciclo do ácido tricarboxílico e seus componentes enzimáticos têm alguns papéis cruciais para o metabolismo basocelular. Uma concentração de 5 e 10  $\mu\text{M}$  de ácido succínico resultou em apoptose em câncer do endométrio; nenhum desses efeitos foi observado na linha celular de controle (IPLIK; CATMAKAS e CAKMAKOGLU, 2018). Ele mostra potencial para eliminar certos microorganismos, como *Salmonella* (RADKOWSKI, ZDRODOWSKA e GOMÓŁKA-PAWLICKA, 2018). A adição de extrato de jabuticaba aumentou a microbiota do estômago de ratos, principalmente *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterobacteriaceae* (DA SILVA-MAIA et al., 2018).

O ácido succínico pode ser produzido por síntese química ou por processos biológicos. É um produto final durante a fermentação anaeróbica por alguns microrganismos anaeróbicos e anaeróbicos facultativos. Nesta última década *Corynebacterium glutamicum* tem sido estudado para sua produção. Sob condições anaeróbicas, seu crescimento celular é inibido, quando há redução do pH. Se

utilizava  $\text{NaHCO}_3$ , para neutralizar o pH, mas este era instável com temperaturas superiores a 50 °C.

Shi et al. (2014) utilizaram NaOH e  $\text{Mg}(\text{OH})_2$ , com esta finalidade e um método de imobilização natural, usando o enchimento poroso de poliuretano (PPF: *porous polyurethane filler*) como transportador para *C. glutamicum*, e, como fonte de carbono, um hidrolisado de bagaço de mandioca. A concentração final de ácido succínico foi de 22,4 g.L<sup>-1</sup> e o teor de glicose do bagaço de cana hidrolisado caiu de 35 para 1 g.L<sup>-1</sup>. Foram produzidos ácidos lático e acético nos teores de 3,7 e 9,2 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo que repetidos banhos, por 267 h de tempo total, com consumo de 173 g.L<sup>-1</sup> de açúcar, resultou na produção de 112,1 g.L<sup>-1</sup> de ácido succínico.

O acompanhamento do processo fermentativo pode ser realizado por meio de características que detectem as mudanças ocorridas no produto. Nesse sentido, Jayasena e Cameron (2008), colheram por 4 semanas frutas da cultivar de uva de mesa sem semente Crimson e analisaram os teores de sólidos solúveis totais (°Brix) e acidez titulável, com o acompanhamento de análise sensorial. Observaram diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) no fato de gostarem de forma crescente de uvas com 16,0-17,0 17,1-18,0 e 19,1-20,0 °Brix, mas não havia alta correlação ( $r^2=0,58$ ) entre a aceitabilidade e °Brix, pois açúcares não são os únicos contribuidores para a percepção da doçura e sabor. Os ácidos contribuem com grande importância para a percepção humana desses atributos, sendo que a acidez apresentou correlação negativa com a aceitabilidade ( $r^2=0,79$ ). Concluíram que a relação °Brix/acidez é um melhor preditor dos atributos sensoriais comparada com qualquer uma das duas características isoladamente. Entretanto, deve-se considerar que outros trabalhos mostraram que a relação °Brix/acidez é um preditor pobre para a qualidade sensorial de uvas e outras frutas.

Além de serem marcadores, os diferentes ácidos orgânicos apresentam perfil sensorial distintos. O perfil sensorial é notado por meio de uma combinação de fatores, podendo ser analisado por meio da interação da intensidade em relação ao tempo, ou seja, a persistência do sabor. Sendo a sacarose o principal substrato fornecido para a fermentação do kefir, os ácidos orgânicos disponibilizados ao longo da fermentação podem ter a capacidade de proporcionar um perfil de sabor mais arredondado e otimizado, equilibrando o sabor doce com o ácido, por exemplo, e mascarando sabores estranhos, ou *off flavor*. O ácido cítrico é frequentemente

utilizado em indústrias, apresenta sabor intenso, mas desaparece em curto período, o que funciona bem, pois tem curvas de intensidade versus tempo quase idênticas às da sacarose. O ácido láctico, por sua vez, é considerado intermediário, enfatizando o sabor "verde", a adstringência e a acidez. Apresentam vantagem em relação ao ácido málico, por exemplo, por não provirem de matérias primas derivadas do petróleo (PLETSCH; RAAB, 2019).

### 3.1.5 Elaboração do kefir de água

Na elaboração do kefir de água, a sacarose é utilizada como principal substrato para os microrganismos. A Tabela 3 apresenta algumas formulações de kefir de água encontradas na literatura. Utiliza-se entre 3 a 10% (m/v) de açúcar, sendo mais comum em torno de 8%. Recomenda-se o uso de açúcares não refinados, como por exemplo, açúcar mascavo, para melhor crescimento dos grãos, pois são fontes de nutrientes, tais como minerais (Ca, Fe, K) e vitaminas, e de compostos fenólicos (BETTANI et al., 2014; GENEROSO et al., 2009), como pode-se observar na Tabela 4 com os maiores teores de cinzas (minerais) e fenólicos no açúcar mascavo comparado aos demais.

Podem ser fornecidos outros açúcares (HARTA et al., 2004). Silva e colaboradores (2009) testaram a atividade antimicrobiana do kefir utilizando açúcar demerara, melado de cana e açúcar mascavo, e concluíram que o último teve maior eficácia contra *Candida albicans*, *Salmonellatyphi*, *Shigellasonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

A bebida resultante ao final do processo de fermentação dos açúcares é turva, de cor palha, sabor levemente ácido (devido à formação, principalmente, de ácido láctico, e também de ácido acético), fermentado e refrescante, e com baixo teor de álcool, efervescência e doçura. O tempo de incubação varia, geralmente, entre 12 e 72h, sendo que os grãos entram em fase estacionária com 48h de fermentação. A temperatura de fermentação prevalente é a ambiente, mais comumente entre 20 e 25 °C (ALSAYADI et al., 2014; SILVA et al., 2009).

**Tabela 3** - Formulações de kefir de água.

Água	Açúcar	Grãos de kefir	Outros ingredientes	Fonte
85%	10%	2%	-	JANUARIO et al., 2016
1000 mL	-	40 g	50 mL suco de: cenoura, melão, cebola, tomate, erva-doce, morango	CORONA et al., 2016
1000 mL	-	40 g	50 mL suco de: maçã, marmelo, romã, uva, kiwi, figo espinhoso	RANDAZZO et al., 2016
300 mL	22,5 g (7 %)	18 (5,6 %)g	-	MONAR et al., 2014
500 mL	8,5 g (1,7 %)	3 cs*	-	FEDERHEN, RUSCHEL, 2014
65 mL	6 g (8,5 %)	15 g (21 %)	20 mL extrato de figo	LAUREYS, VUYST, 2014; LAUREYS et al., 2016
88,5%	6,5%	5%	5 g/L pedaços de maçã fresca	ALSAYADI et al., 2014
93%	6,5%	5%	5 g/L pedaços maçã	ALSAYADI et al., 2013
1000 mL	80 g (7,4 %)	ne**	100 mL extrato de figo	GULITZ et al., 2013
1000 mL	100 g	ne**	2 figos desidratados e uma fatia de limão orgânico	GULITZ et al., 2011
2138 mL	112 mL (5 %)	250 g (11%)	-	MAGALHÃES et al., 2010
95%	5%	5 g	-	BERGMAN et al.,2010
1000 mL	80 g (7,4 %)	60 g (5,6 %)	meio limão fresco e um figo desidratado	WALDHERR et al., 2010
2000 mL	60g (0,34 %)	ne**	2 figos desidratados e 1 limão cortado	MOINAS, HORISBERGER, BAUER, 1980

\*cs = colher de sopa; \*\*ne = não especificado.

**Fonte:** Adaptado pela própria autora.

### 3.2 Açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta originária do Pacífico Sul (Nova Guiné) e da Ásia (Índia), da família Poaceae, classe monocotiledônea. A princípio descendente da espécie *Saccharum officinarum*, porém, as variedades cultivadas atualmente são híbridas. Tem como principais características falta de resistência às baixas temperaturas e à salinidade de solos, apresentam inflorescência em forma de espiga, crescimento do caule em colmos, folhas com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta.

No período colonial, o setor canavieiro foi o mais importante no processo de ocupação agrícola no Brasil, estando também intimamente relacionado às atividades escravocratas. Entre os séculos XVI e XIX, o açúcar era produzido, principalmente, na Região Nordeste, e tem sido responsável pela ocupação, exaurição e decadência de uma grande extensão de terras também em outras partes do país (BRASÍLIA, 2013; KHATOUNIAN, 2001).

Desde o início da década de 1990, o Brasil tem aumentado sistematicamente suas exportações de açúcar e passou, de uma participação pouco expressiva neste mercado, a representar uma parcela acima de 43,0% (BRASÍLIA, 2013). Atualmente, o país é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) e açúcar, seguido pela Tailândia e Índia. O setor do açúcar e do álcool é uma das atividades agroindustriais mais estruturadas do agronegócio brasileiro.

A produção de cana-de-açúcar, estimada para a safra 2018/19, é de 615,84 milhões de toneladas, com redução de 2,8% em relação à safra anterior. A variação em relação à última safra se deve, entre outros, à queda de 1,1% da área colhida, totalizando 8,63 milhões de hectares. Este declínio foi resultante, em grande parte, da devolução de inúmeras propriedades arrendadas ou pela rescisão de contrato com fornecedores. Como consequência, muitas áreas apresentaram expansivo aumento do plantio de soja. A região centro-sul é a maior produtora nacional da gramínea, sendo São Paulo o principal estado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Estima-se que a safra 2017/18 de açúcar do Brasil, deverá alcançar 31,73 milhões de toneladas, com retração de 16,2% na comparação com ano anterior. Esta queda ocorreu por diversos fatores, incluindo: condições climáticas desfavoráveis em algumas regiões, como déficit hídrico e altas temperaturas – acelerando a maturação e acarretando em baixo crescimento e falta de peso dos colmos -, envelhecimento das lavouras, baixa taxa de renovação, falta de investimento, aumento da automação sem sistematização da lavoura para esse método de produção, maior destinação de matéria-prima para o etanol – apoiada por alta tributária na gasolina, maior oferta mundial do adoçante em países asiáticos, especialmente a Índia, preços da commodity em queda, e oscilações da valorização do real em relação ao dólar (BRASIL, 2018c; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2019).

Existe uma diversidade de produtos comerciais que são fabricados a partir do caldo da cana-de-açúcar e dos resíduos líquidos e sólidos da moagem. Destacam-se nesta lista de produtos, além do açúcar e do álcool etílico, a cachaça e a rapadura, produtos extraídos do caldo e produzidos em pequenas fábricas especializadas nesta atividade, e a cogeração de energia elétrica com a queima do bagaço. Muitas indústrias são mistas, capazes de destinar parte da cana-de-açúcar para a produção de açúcar e parte para a fabricação de álcool etílico. Além disso, também é utilizada como forrageira na forma *in natura* (BRASÍLIA, 2013).

O açúcar cristal branco é o mais fabricado. De acordo com Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2019), o acumulado total da produção de açúcar da safra 2018/2019 até 31/01/2019 havia sido de 28.711.723 kg, sendo 0,8% de produção orgânica.

### 3.2.1 Processamento da cana

A cultivar da cana, forma de plantio e colheita influenciam na qualidade final do açúcar. De preferência, a cana não deveria ser queimada para ser colhida. O processamento vai depender se é artesanal, os tipos de açúcar a serem produzidos e o tipo de indústria. Basicamente segue o esquema:

- Seleção, lavagem/limpeza da cana;
- Preparo para moagem ou difusão;
- Extração do caldo: moagem ou difusão;
- Purificação do caldo: peneiragem e clarificação → caldo com 85% de água;
- Evaporação do caldo;
- Cozimento → xarope com 45% de umidade;
- Cristalização da sacarose (separada dos não açúcares);
- Centrifugação: separação entre cristais e massa cozida; e
- Secagem e estocagem do açúcar (MACHADO, 2012).

Uma maneira rápida de identificar os tipos de açúcar é conhecida como polarização: porcentagem em massa da sacarose aparente contida em uma solução açucarada, determinada pelo desvio da luz polarizada ao atravessar esta solução. É expressa em °Z (graus Zucker) onde uma solução normal de sacarose pura corresponde a 100 °Z, sendo a base de calibração do sacarímetro.

A clarificação é realizada empregando-se apenas leite de cal, para os açúcares demerara (96,5°Z a 98,5°Z), o mascavo e o Very High Polarization (VHP), que é o tipo mais exportado pelo Brasil para os EUA, mais claro que o demerara (MACHADO, 2012). Para o açúcar cristal branco (99,3°Z a 99,9°Z), são empregados leite de cal e anidrido sulfuroso na clarificação (BRASÍLIA, 2013). Na Tabela 4, pode-se observar os parâmetros físico-químicos de diferentes tipos de açúcares (BETTANI et al., 2014).

Quanto maior for o teor de umidade, menor o tempo de prateleira, devido à maior probabilidade de presença de microrganismos. O pH do açúcar é modificado pelo emprego de cal durante sua refinação, o que favorece a redução da sacarose em glicose e frutose; a cor do açúcar especial deve ser inferior a 80, seu teor de cinzas inferior a 0,2 %, e teor de Açúcares Redutores (AR) inferior a 2,4 %. Os teores de Aminoácidos (AA) e de fenólicos estão relacionados com a cor, pois estes favorecem a formação de quinonas e os AA reagem com os AR na reação de Maillard. A medida da turbidez fornece uma ideia da eficiência da separação do material insolúvel e coloidal presente no caldo de cana-de-açúcar. Utilizar cana madura, com reduzido teor de AR, origina açúcar refinado com melhor aparência (BETTANI et al., 2014). Mais detalhes em relação ao padrão de classificação dos açúcares podem ser encontrados na Instrução Normativa nº 47, de 30 de agosto de 2018, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2018).

**Tabela 4** - Valores médios dos parâmetros físico-químicos de açúcares.

Tipo de açúcar*	Pol °Z	Umidade %	pH	Cor U.I.	Cinzas %	AR %	Fenólicos mg.kg <sup>-1</sup>	AA mg.kg <sup>-1</sup>	Turbidez NTU
<b>A</b>	85,9	2,90	6,0	50.788	1,35	5,6	56,8	151,6	428,0
<b>B</b>	97,1	0,08	6,7	2.461	0,41	1,2	6,5	35,5	64,6
<b>C</b>	98,8	0,13	6,4	2.233	0,31	1,0	7,0	49,4	73,6
<b>D</b>	99,1	0,01	6,5	343	0,06	0,9	3,3	23,3	23,9
<b>E</b>	99,2	0,01	6,3	524	0,08	1,6	2,5	1,0	58,1
<b>F</b>	98,5	0,02	6,3	426	0,03	0,9	2,3	8,8	40,9
<b>G</b>	99,0	0,01	6,3	19	0,01	0,05	1,8	1,0	3,7
<b>H</b>	99,2	0,22	6,3	191	0,26	0,6	2,2	15,4	4,7

\*A: mascavo orgânico; B, C, D: demerara orgânico; E, F: cristal orgânico; G: cristal convencional; e H: refinado especial convencional.

Pol: Polarização; AR: Açúcares Redutores; e AA: Aminoácidos.

**Fonte:** Adaptado de BETTANI et al. (2014).

O fato de a cana ser altamente eficiente na conversão de energia solar radiante em energia química e, conseqüentemente, apresentar alta taxa de acumulação de matéria orgânica (biomassa) e ter boa capacidade de prevenção de erosão do solo, compõem características desejáveis para que seja produzida em sistema orgânico (MARGARIDO et al., 2005).

### **3.2.2 Consumo de açúcar**

Os profissionais de saúde, e também a população, em geral, têm apresentado uma preocupação crescente relacionada ao consumo de açúcares livres, particularmente sob a forma de bebidas adoçadas. Isso, porque acarreta no aumento do total de energia obtido por meio da alimentação e na redução da ingestão de alimentos mais adequados nutricionalmente, levando a uma dieta pouco saudável, ganho de peso e aumento do risco de doenças crônicas não transmissíveis (WHO, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) alerta que políticas fiscais que levem a, pelo menos, um aumento de 20% nos preços de varejo de bebidas açucaradas, poderia resultar em reduções no seu consumo, o que significaria a queda na ingestão de açúcar, melhorando a nutrição e reduzindo a incidência de doenças associadas. Isto levaria a uma redução dos custos do setor da saúde, além de gerar maiores rendas para o Estado. Dados de 2014 revelam que 39% dos adultos acima de 18 anos estavam acima de seu peso ideal, assim como 42 milhões de crianças com menos de cinco anos, um aumento de 11 milhões em apenas 15 anos. Em relação à diabetes, em 1980 eram 108 milhões de pessoas e em 2014, chegou a 422 milhões (WHO, 2015).

Outra preocupação é a associação entre a ingestão de açúcares livres e cárie dentária. Esta causa dor, ansiedade, limitação funcional, que inclui baixa frequência e baixo desempenho escolar em crianças, além da desvantagem social por meio da perda de dentes. O tratamento das doenças bucais é caro, consome de 5 a 10% dos orçamentos de saúde nos países industrializados e ultrapassaria todos os recursos financeiros disponíveis para a assistência à saúde de crianças na maioria dos países de baixa renda (WHO, 2015).

A diretriz da OMS refere-se a açúcares livres, como sendo os monossacarídeos e dissacarídeos adicionados intencionalmente aos alimentos e bebidas por parte do fabricante, cozinheiro ou consumidor e açúcares naturalmente encontrados no mel, nos sucos de frutas e nos sucos de frutas concentrados (WHO, 2015).

AOMS alerta que a recomendação de ingestão de açúcares livres seja reduzida, devendo ser menor do que 5 a 10 % do total de energia diária consumida. Se for tomada como base a média indicada para a população, de 2.000 kcal diárias, isso representa 100 kcal, ou o equivalente a cerca de 25 g de açúcar, ou 5 colheres de chá de açúcar.

É importante, portanto, observar que qualquer fonte predominante de açúcares livres deve ser consumida com parcimônia. Porém, a qualidade do açúcar utilizado deve ser levada em consideração. A Tabela 5 mostra alguns produtos açucarados, demonstrando a grande variação entre os itens analisados. Ao se comparar o açúcar mascavo com o refinado, por exemplo, é possível verificar que o segundo é pobre em elementos, tais como minerais.

**Tabela 5.** Composição nutricional em 100g de diversos produtos açucarados.

	Umidade %	Energia kcal	Proteína g	Lipídeo g	CHO g	VIT B2 mg	Cinzas g	Ca mg
Açúcar mascavo	3,3	369	0,8	0,1	94,5	0,03	1,4	127
Melado*	22,1	297	0,0	0,0	76,6	0,05	1,3	102
Rapadura**	7,1	352	1,0	0,1	90,8	Tr	1,1	30
Açúcar refinado	0,1	387	0,3	Tr	99,5	-	Tr	4

	Mg mg	Mn mg	P mg	Fe mg	Na mg	K mg	Cu mg	Zn mg
Açúcar mascavo	80	2,03	38	8,3	25	522	0,17	0,5
Melado	115	2,62	74	5,4	4	395	0,84	0,3
Rapadura	47	1,66	21	4,4	22	459	0,17	0,6
Açúcar refinado	1	-	Tr	0,1	12	6	Tr	Tr

CHO: Carboidratos; Vitaminas: B2: Riboflavina; e B6: Piridoxina;  
Adotou-se traço (Tr) nas seguintes situações: a) valores de nutrientes arredondados para números que caíam entre 0 e 0,5; b) valores de nutrientes arredondados para

números com uma casa decimal que caiam entre 0 e 0,05; c) valores de nutrientes arredondados para números com duas casas decimais que caiam entre 0 e 0,005; e d) valores abaixo dos limites de quantificação.

\*B6: 0,20 mg; e \*\*B6: 0,04 mg.

**Fonte:** Adaptado de TACO(2011).

### 3.3 Jaboticaba

A jaboticaba (Figura 6) é conhecida pelos ocidentais há mais de quatro séculos. É nativa do Brasil, originada do centro-sul, na região do cerrado. Seu nome deriva do tupi *lapoti'kaba*, que significa “fruta em botão”, sendo que os indígenas a consumiam *in natura* e como bebida fermentada. Pertence à família *Myrtaceae*. Hoehne (1946), com o intuito de melhorar o conhecimento sobre a flora brasileira, e as suas produções de interesse econômico, registrou que muitas espécies pertencentes a essa família, poderiam transformar-se em excelentes fontes de renda e contribuir para o abastecimento dos mercados de frutas. Atualmente é uma das frutíferas mais cultivadas nos pomares domésticos do país.

Apresenta diferentes tipos de plantas e frutos, sendo cultivada praticamente em toda a extensão territorial do Brasil (VENTURINI FILHO, 2010). Anteriormente, eram classificadas no gênero *Myrciaria*, proposto por Berg em 1857. Porém, por apresentarem sementes com cotilédones separados, inflorescências congestas e caulifloras, como ocorrem no gênero *Plinia* (Figura 6 A), Sobral, em 1985, propôs a alteração para *Plinia jaboticaba* (DC) Berg. A mesma é conhecida como jaboticaba Sabará, com grande importância comercial, sendo seus frutos conhecidos como uma das mais ricas fontes de antocianinas (NEVES, 2016).

Tem aparência semelhante à uva, possui uma casca roxo-escuro na maioria das espécies, quase preta quando madura. Isso ocorre devido ao seu alto teor de compostos fenólicos, como as antocianinas, que recobre uma polpa branca gelatinosa e possui entre uma a quatro sementes em seu interior (Figura 6 C). Dentre as antocianinas, as identificadas na jaboticaba foram a delphinidina e cianidina (LIMA et al., 2011). Tem sido utilizada para o tratamento de diversas doenças, como hemoptise (sangue escarrado, oriundo das vias aéreas e dos pulmões), asma, diarreia e inflamação crônica das amídalas. Apresenta altos teores de tanino, vitamina C e flavonoides (CAVALCANTI, VEGGI, MEIRELES, 2011).

No Brasil, os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo são os maiores produtores de jaboticaba. Ocorre principalmente na mata pluvial Atlântica e nas submatas de altitude. A jaboticabeira é uma das frutíferas que tem despertado grande interesse entre os produtores rurais, devido à sua alta produtividade, rusticidade e aproveitamento de seus saborosos frutos em diversas formas, como na fabricação de licores, geleias, geleias *diet*, aguardentes,

fermentados, como bebidas lácteas, “vinhos” e vinagres, e mais recentemente, como ingrediente de sorvetes, aromatizador de cerveja, combinado com água de coco, a farinha da fruta em pó etc. Desde 1987, próximo ao seu centro de origem, acontece anualmente o Festival de Jabuticaba de Sabará – MG, na época da safra (NEVES, 2016).

Os frutos podem ser utilizados em cosméticos, como: esfoliantes de corpo, perfumes, sabonetes e xampus. Sua madeira pode ser útil, por exemplo, para confecção de móveis, construção civil, produção de tábuas e para lenha. Também pode ser empregada no paisagismo, por ser ornamental (LORENZI, 2002; SILVA et al., 2008).

Quando a muda for proveniente da germinação da semente, a árvore demora, em média, dez anos para frutificar. Uma única árvore antiga pode chegar a fornecer 160 litros de fruta em uma carga. Atrai a avifauna e outros animais (HOEHNE, 1946).

Lorenzi (2002) descreve a jabuticaba paulista, como tendo entre 10 a 15 m de altura, tronco liso, com 30 a 40 cm de diâmetro, folhas simples de 6 a 7 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura. Flores e frutos afixados no caule. É perenifólia, mesófito, heliófito e seletivo higrófito. Produz duas ou mais vezes ao ano, se houver umidade suficiente, quando frutos maduros geralmente ocorrem nos meses de agosto/setembro e janeiro. No fruto completamente desenvolvido, os carboidratos mais abundantes na polpa são os açúcares solúveis, o que mostra a potencialidade de seu aproveitamento industrial (SILVA et al., 2008). Sua casca e sementes são fontes de vitamina C (LIMA et al., 2011). As composições nutricionais em 100g da polpa de jabuticaba constam na Tabela 6 (TACO, 2011).

**Figura 6** – Jabuticabeiras e jabuticabas.



**A**

**B**



**C**

**D**

A: Jabuticabeira em fase de floração; B: jabuticabas no pé em fase de maturação completa (exceto em duas unidades que estão verdes); C: jabuticabas colhidas maduras, inteiras e cortadas; e D: jabuticabas em comércio de Londrina-PR/BR.

**Fontes:** A: Acervo pessoal de Aldisio Rodrigues da Silva; B: Acervo pessoal de Lourdes Czarnik; C: ALIEXPRESS (2017); e D: Própria autora.

**Tabela 6.** Composição nutricional em 100g da polpa crua de jabuticaba.

Umidade %	Energia kcal	Proteína g	Lipídeo g	CHO g	F. A. g	Vit. B1 mg	Vit. C mg	Cinzas g
83,6	58	0,6	0,1	15,3	2,3	0,06	16,2	0,4

Ca Mg	Mg mg	Mn mg	P mg	Fe mg	K mg	Cu mg	Zn mg
8	18	0,30	15	0,1	130	0,07	0,3

CHO = Carboidratos; F.A. = Fibra Alimentar; Vitaminas: B1= Tiamina; e C= Ácido ascórbico.

Não aplicável: Colesterol;

Traço: Vitaminas Niacina (B3) e Piridoxina (B6) e Sódio. Adotou-se traço nas seguintes situações: a) valores de nutrientes arredondados para números que caiam entre 0 e 0,5; b) valores de nutrientes arredondados para números com uma casa decimal que caiam entre 0 e 0,05; c) valores de nutrientes arredondados para números com duas casas decimais que caiam entre 0 e 0,005; e d) valores abaixo dos limites de quantificação.

**Fonte:** Adaptado de TACO (2011).

### 3.4 A dialética da agricultura

A práxis das atividades de cultivo agrônomo levou ao longo do tempo a certos tipos de classificações de métodos de cultivo. Considerando que o presente trabalho busca investigar o desempenho de dois tipos de açúcar mascavo, provenientes de canas-de-açúcar cultivadas em diferentes sistemas de cultivo: convencional e orgânico, no Quadro 1 é apresentado um comparativo dos dois sistemas (CD, 2009).

A agricultura convencional baseou-se na utilização do pacote tecnológico lançado na década de 1940. Foi chamada, em 1966, de Revolução Verde, dispondo de estratégias como a implantação de mecanização com uso intensivo de máquinas, emprego de produtos químicos, como adubos solúveis, e agrotóxicos, melhoramento genético e introdução de monoculturas. O pretexto utilizado é que essas práticas são necessárias para se obter uma aparente alta eficiência e produtividade e combater a escassez de alimentos e a fome. Este modelo acabou por provocar impactos sociais e ambientais, impulsionando a centralização do controle da produção, o êxodo rural e consolidando processos de contaminação e degradação do solo, água e alimentos, além da maciça eliminação da biodiversidade e dos processos microbianos do solo, representando riscos à saúde dos consumidores e trabalhadores que manuseiam os agrotóxicos. A Figura 7 ilustra como os sistemas

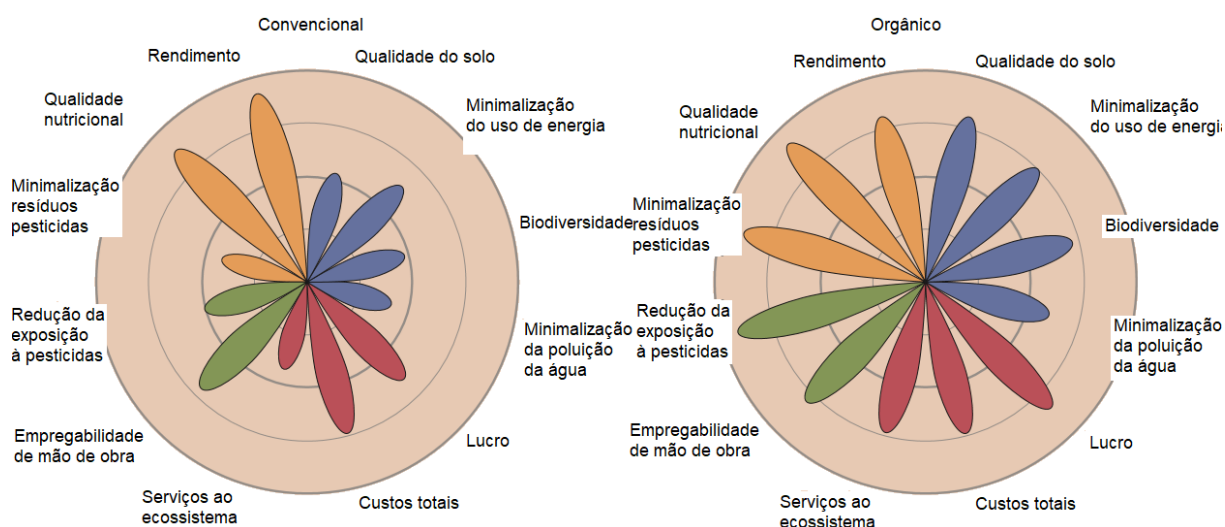
de agricultura orgânica equilibram melhor as quatro principais áreas da sustentabilidade (REGANOLD; WACHTER, 2016; RICARDO; CAMPANILI, 2008).

**Quadro 1** - Comparativo dos sistemas de produção agrícola Convencional e Orgânico.

<b>CONVENCIONAL</b>	<b>ORGÂNICO</b>
<p>Uso intensivo de adubos químicos e agrotóxicos/biocidas, pois há seleção de plantas para altos rendimentos focando na quantidade de produção, que requerem altas doses destes produtos</p>	<p>Uso de adubos orgânicos (composto, esterco, adubo verde) e controle alternativo de pragas e doenças focado na produção de alimentos saudáveis</p>
<p>Compartimentalização, monocultura, aliada a exigência de grandes escalas de produção, levando ao despovoamento do meio rural e insegurança alimentar e nutricional</p>	<p>Integração, produção mais diversificada, aumento da biodiversidade, levando à fixação do produtor no campo e segurança alimentar e nutricional</p>
<p>Criação de espécies de pragas e doenças resistentes e a eliminação de seus inimigos naturais</p>	<p>Manejo ecológico das pragas e doenças. Estas são analisadas como possível desequilíbrio do sistema</p>
<p>Degradação do solo e contaminação de cursos d'água por práticas equivocadas: monocultura, uso intensivo de máquinas e implementos agrícolas, baixa cobertura do solo, entre outras</p>	<p>Uso de práticas conservacionistas do solo, preservação ambiental e integração com processos naturais</p>
<p>Alta dependência externa de insumos e de energia não renovável</p>	<p>Busca a autosustentabilidade dos sistemas de produção</p>
<p>Contaminação de trabalhadores rurais e consumidores por usos indevidos de agrotóxicos e aditivos químicos</p>	<p>Produção de alimentos livres de contaminação por agrotóxicos: mais saúde para o trabalhador rural e para o consumidor</p>

**Fonte:** Adaptado de CD (2009).

**Figura 7 – Avaliação da agricultura orgânica em relação à agricultura convencional nas quatro principais áreas de sustentabilidade.**



O comprimento das pétalas representa qualitativamente o nível do desempenho de sustentabilidade em relação aos quatro círculos que representam 25, 50, 75 e 100 %. As pétalas laranjas representam áreas de produção; as azuis, áreas de sustentabilidade ambiental; as vermelhas, de sustentabilidade econômica; e verdes de bem-estar.

**Fonte:** Adaptado de REGANOLD; WACHTER (2016).

O uso dos produtos químicos está diretamente relacionado com a I e II Guerras Mundiais, e a Guerra do Vietnã. Esta última foi marcada pelo uso do agente laranja, que ocasionou sequelas nas gerações descendentes dos indivíduos expostos ao produto, tais como ausência de membros. Estes conflitos deixaram ao seu término um enorme estoque de venenos, que tiveram seu uso intensivo na agricultura incentivado por profissionais, como o engenheiro agrônomo Norman Ernest Borlaug, ganhador do prêmio Nobel da Paz em 1970. Um exemplo é o fósforo, que foi e continua sendo usado em guerras para causar lesões e efeitos sistêmicos muitas vezes fatais, e que também é utilizado na agricultura (BARNARD, 2017; KHATOUNIAN, 2001; KNABBEN, 2016).

Foi nessa época, na década de 1970, que o cultivo convencional foi alavancado no Brasil, incentivado por meio do crédito rural subsidiado e condicionado ao uso de agrotóxicos pelos militares, sendo divulgado como a face do progresso (KHATOUNIAN, 2001).

Esses produtos causam efeitos indesejáveis nas plantas por causar distúrbios metabólicos, como a desregulação da proteólise e proteossíntese, levando ao

excesso de substâncias simples solúveis e livres na seiva e no suco celular, como esteróis, açúcares, aminoácidos e vitaminas. Isso propicia às “pragas”, tais como insetos, ácaros, nematoides, fungos e bactérias, os alimentos que conseguem digerir mais facilmente, uma vez que não possuem enzimas capazes de digerir substâncias complexas presentes em plantas saudáveis e bem nutridas. E quem se alimenta de plantas doentes, tem uma nutrição deficiente (KNABBEN, 2016).

Em contrapartida, a agricultura orgânica moderna surgiu na década de 1960 por meio de lentas e gradativas alterações, buscando alternativas aos sistemas de produção vigentes. O termo “agricultura orgânica” foi definido por meio da fundação da Federação Internacional dos Movimentos de Agricultura Orgânica – IFOAM, em 1972, que passou a estabelecer normas proibindo o uso de agrotóxicos e restrição de adubos químicos, incluindo ações de conservação dos recursos naturais e aspectos éticos nas relações sociais e no trato com os animais, além de certificar com selo que comprovava o manejo orgânico dos produtos (KHATOUNIAN, 2001; SANTOS; MONTEIRO, 2004).

De acordo com a Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, considera-se como produto orgânico ou produto da agricultura orgânica, seja ele fresco ou processado, aquele obtido por meio de sistema orgânico de produção agropecuário ou oriundo de processo extrativista sustentável e não prejudicial ao ecossistema local. O conceito de orgânico abrange os sistemas denominados: ecológico, biodinâmico, natural, regenerativo, biológico, agroecológico, permacultura, entre outros. Não se utiliza organismos geneticamente modificados, nem radiações ionizantes em qualquer fase do processo de produção (BRASIL, 2003).

Os produtos orgânicos, para sua comercialização, devem ser certificados por organismo reconhecido oficialmente, porém, sendo facultativa em alguns casos de venda direta aos consumidores, em que os produtores atendam a certas especificações, como estar inserido em processos próprios de organização e controle social e assegurar a rastreabilidade dos produtos (BRASIL, 2003).

A fertilidade é função direta da matéria orgânica contida no solo. Assim, a própria atividade biológica presente nos compostos biodegradáveis existentes no solo possibilita o suprimento de elementos minerais e químicos necessários ao desenvolvimento dos vegetais cultivados e, conseqüentemente, diminuindo os desequilíbrios resultantes da intervenção humana. O foco da agricultura orgânica é a preservação da vida e o reconhecimento do solo como fonte de vida, assim como o

uso saudável da água e do ar (BRASIL, 2003; ORMOND et al., 2002; PENTEADO, 2003). Para tal, faz uso de técnicas ancestrais e modernas, também.

Com essa visão de que o solo é vivo, almeja-se uma alta biodiversidade contida nele. O cultivo orgânico engloba boas práticas de manejo ambiental, onde o papel do agricultor não se resume a seguir passos simplificados, mas também envolve reflexão, onde se procura os porquês dos acontecimentos. Nesse sentido, a agroecologia era e continua sendo um conceito revolucionário. Este tipo de cultivo demanda do produtor determinação e perseverança para encontrar soluções, enquanto o convida a ser autor de seu próprio romance a adotar atitudes cidadãs cujos resultados beneficiam a sociedade como um todo (KHATOUNIAN, 2001; KNABBEN, 2016).

O termo agroecologia ganhou força na América Latina com o objetivo de fortalecer politicamente os pequenos agricultores. Atrelado a esse conceito, vale ressaltar que o desenvolvimento dos orgânicos é mais rápido e tecnicamente mais sólido, com a presença de políticas públicas específicas para seu fomento (KHATOUNIAN, 2001).

A produção orgânica no Brasil inclui soja, açúcar mascavo e café, como os principais itens exportados, e ainda hortaliças, frutas (banana, citrus, caju), cereais (milho, arroz, trigo), leguminosas (feijão, amendoim), dendê, erva-mate, plantas medicinais, e outros de menor expressão quantitativa, como a produção animal de aves, bovinos, suínos e produtos apícolas (KHATOUNIAN, 2001).

Schuphan (1974) na Alemanha, durante um período de doze anos, comparou qualidade nutritiva após aplicação de fertilizantes orgânico e convencional na produção de espinafre, batata, cenoura e repolho. Houve um decréscimo de 24% na produtividade, quando se utilizou adubo orgânico, em compensação, observaram-se acréscimos de matéria seca (23%), proteína (18%), vitamina C (28%), açúcares totais (19%), metionina (23%), ferro (77%), potássio (18%), cálcio (10%) e fósforo (13%). Inversamente, verificou-se o decréscimo do sódio (12%) e do nitrato (93%).

Worthington (2004) analisou estatisticamente dados da literatura comparando teores nutricionais de alimentos cultivados de forma orgânica e convencional e concluiu que os primeiros continham maiores teores de vitamina C, Fe, Mg, e P e menores de nitratos, além de melhor qualidade protéica.

Mitchell e colaboradores (2007) analisaram teores dos flavonoides quercetina e campferol, em tomates, com cultivos orgânico e convencional, por 10 anos.

Concluíram que os orgânicos apresentaram teores 79 e 97% superiores, respectivamente.

Ren e colaboradores (2017) estudaram, por seis anos, duas cultivares de cebola ('Hyskin' e 'Red Baron'), comparando teores de antocianinas e de flavonóides e respectivas atividades antioxidantes. Concluíram que os produtos orgânicos tinham maiores teores de flavonoides, de quercetina 3,4 D e de quercetina 3-G e maior atividade antioxidante, sendo que a cultivar 'Red Baron' era superior a 'Hyskin'.

Pesquisas continuam sendo realizadas no intuito de comprovar a superioridade em termos de qualidade nutricional dos alimentos orgânicos em relação aos convencionais: detectando maior disponibilidade proteica, maior abundância de ácidos orgânicos não nitrogenados – ligados ao sabor, acarretando em melhora do ponto de vista sensorial - maiores teores de micronutrientes, tais como vitamina C, cálcio, molibdênio, selênio, manganês e magnésio, e menores quantidades de nitratos e metais pesados, como alumínio, chumbo e mercúrio. Também são discutidos outros aspectos, tais como resistência pós-colheita e ausência de toxicidade (MINGUETTI, 2012).

A modernização agrícola leva à desconexão dos sistemas agroalimentares com a natureza, resultando em erosão da diversidade fitogenética pela substituição do germoplasma nativo por outras novas cultivares de "alta produtividade". À medida que se intensifica artificialmente o uso do solo e se transforma radicalmente sua vocação, fatores ecológicos, como a diversidade biológica, a capacidade do ecossistema de reter água, solo, nutrientes e CO<sub>2</sub> são reduzidos consideravelmente, o que também altera significativamente os diferentes processos físicos, químicos e biológicos inerentes ao sistema. O antídoto é a promoção da reconexão entre agricultura e natureza, de atividades inspiradoras permitindo o desenvolvimento da criatividade, com diversidade biológica e cultural, acompanhado da distribuição mais equilibrada de terras (TOLEDO; BARRERA-BASSOLS, 2015).

O Brasil tem papel primordial nesse contexto, levando em conta que é o país biologicamente mais rico do mundo, com o número de espécies de seres vivos estimada entre 1,4 a 2,4 milhões, e apresenta, por outro lado, uma das maiores concentrações de terra e renda. No mundo, os pequenos agricultores produzem mais de 70% do alimento humano, sendo que 16 % dos donos de terras possuem 76 % das áreas utilizadas (TOLEDO; BARRERA-BASSOLS, 2015). Além disso, estima-

se que o Brasil tenha 168 milhões de hectares de pastagens, sendo que, segundo o Dr. Moacyr Dias Filho, pesquisador da EMBRAPA, metade estaria com alta degradação e 30 % mediamente degradadas, com apenas 300 mil hectares de Integração Lavoura Pecuária e Floresta (ILPF) (INFOMONEY, 2016).

Com o uso justo, racional, cultural e tecnológico, com atividades como: a fixação de nitrogênio no solo por microrganismos, reduçãodo uso de adubos químicos, uso de compostagem, controle biológico de doenças e pragas, produção em agroflorestas, e ILPF se pode aumentar a produtividade com sustentabilidade.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Microbiologia do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) – PR, com excessão das análises de cromatografia, as quais foram feitas no Laboratório de Desenvolvimento e Instrumentação e Metodologia Analítica da UEL edamicroscopia eletrônica de varredura, quefoi conduzida no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise, da UEL (LMEM/ PPPG-UEL).As análises químicas de minerais foram conduzidas no LaborSolo, em Londrina - PR.

### 4.1 Material

Os seguintes ingredientes foram utilizados como matéria-prima para elaboração das bebidas fermentadas por kefir de água (Figura 8):

- Água mineral (DaFonte; Anexo A);
- Açúcar mascavo orgânico\* (Planeta Verde, Anexo B, Anexo E);
- Açúcar mascavo convencional\* (Planeta Verde, Anexo C, Anexo E);
- Apolpa de jabuticaba foi adquirida pasteurizada e congelada (DeMarchi, Anexos F e G); e
- Os grãos de kefir de água de cultura mista, que foram utilizados como inóculo, foram obtidos por meio de doação proveniente de cultivo artesanal no município de Londrina – PR.

\*Açúcares produzidos a partir de cana cultivada no município de Lucélia, São Paulo - Brasil, com as características apresentadas no anexo D.

**Figura 8–** Matérias primas utilizadas no experimento



Fonte: Própria autora, 2017.

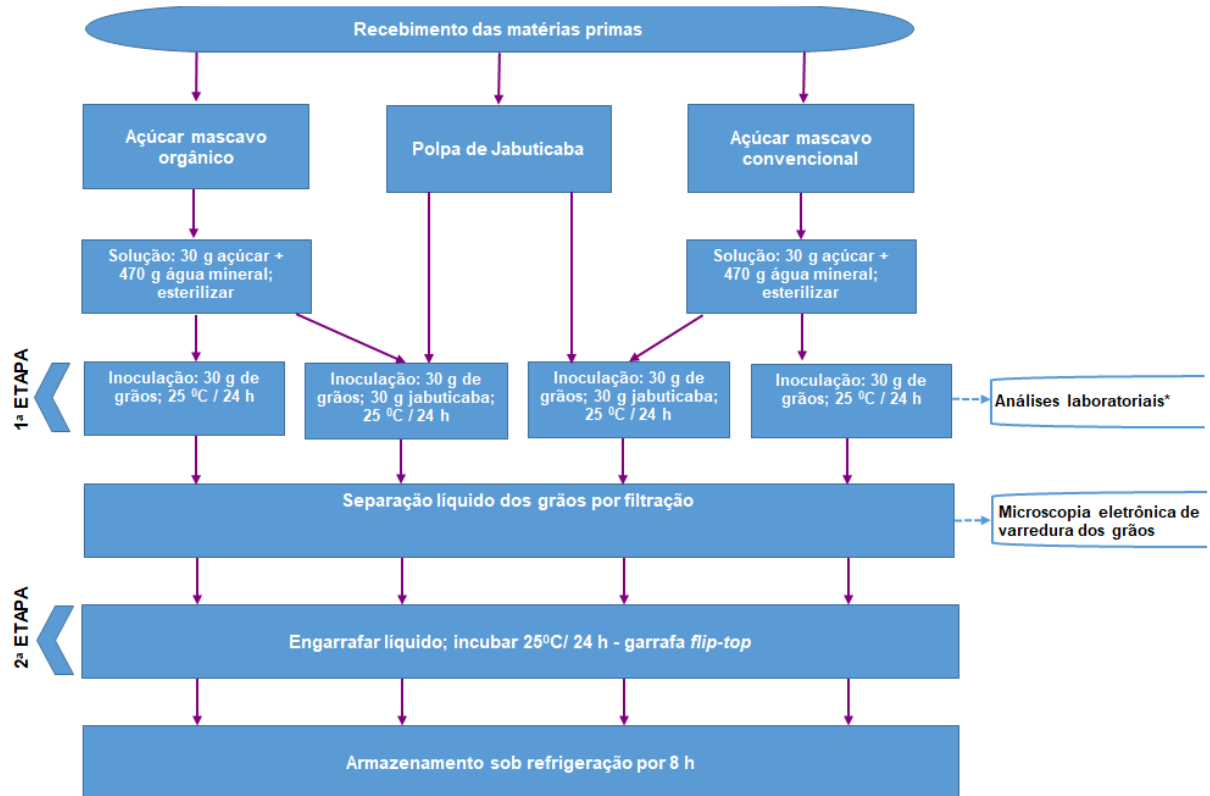
## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Elaboração da bebida fermentada por kefir de água

Para definir as formulações, testes preliminares foram realizados com diferentes substratos: açúcar cristal, açúcar mascavo, mel e melado. Concluímos que seria mais viável o estudo com açúcar mascavo, inclusive foi perceptível que os grãos se comportavam de maneira distinta com o mesmo tipo de açúcar e diferentes marcas. Também foram testadas diferentes concentrações de açúcar, grãos de kefir de água e polpa de jabuticaba (dados não publicados).

Antes de iniciar o experimento, foi realizada adaptação dos grãos de kefir de água, utilizados como inóculo, em solução de água mineral com açúcar mascavo orgânico ou com açúcar mascavo convencional, completando três ciclos de repiques. Os grãos foram repicados em solução de 60 g.L<sup>-1</sup> de cada tipo de açúcar a 25 °C por 24 h. As soluções foram previamente esterilizadas (121°C por 15 minutos). A fermentação do kefir de água foi realizada sem agitação, em duas etapas, e foi seguindo os procedimentos demonstrados no fluxograma da Figura 9.

**Figura 9** – Fluxograma da metodologia de trabalho.



\*pH, acidez total titulável, ácidos orgânicos, sólidos solúveis totais, carboidratos, cor nos tempos 0, 8, 16, 24, 32, 40, 48 e 56 h; minerais nos tempos 0 e 56 h

Fonte: Própria autora, 2017.

#### 4.2.1.1 Primeira etapa da fermentação

Na primeira etapa adicionou-se o inóculo (grãos de kefir de água) e a polpa de jabuticaba, a 25 °C, no mosto previamente esterilizado, em frascos reagentes de vidro de 500 mL, com tampa de rosca. A incubação foi mantida a 25 °C por 24 h, sendo que as tampas dos frascos reagentes foram mantidas semifechadas. As formulações foram elaboradas conforme a Tabela 7. A polpa de jabuticaba foi descongelada antes de ser utilizada nas formulações OJ (kefir de água fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba) e CJ (kefir de água fermentado com açúcar mascavo convencional e jabuticaba).

**Tabela 7 - Formulação dos tratamentos (produtos).**

Ingredientes do mosto	Tratamentos			
	O	C	OJ	CJ
Água mineral (mL)	470	470	470	470
Açúcar mascavo orgânico (g)	30	-	30	-
Açúcar mascavo convencional(g)	-	30	-	30
Polpa de Jabuticaba(g)	-	-	30	30
Grãos de kefir de água (g)	30	30	30	30

O = açúcar mascavo orgânico; C = açúcar mascavo convencional; OJ = açúcar mascavo orgânico com jabuticaba; CJ = açúcar mascavo convencional com jabuticaba.

#### 4.2.1.2 Segunda etapa da fermentação

Uma segunda etapa foi realizada, por meio da passagem do conteúdo obtido no fim da etapa anterior por filtro qualitativo. O filtrado de cada frasco foi envasado em garrafas de vidro âmbar, com volume útil de 500 mL, lacradas com tampas *flip-top*, para a retenção do gás formado durante a fermentação, e incubadas a 25°C, por 24h. Após essa etapa de incubação, as garrafas foram refrigeradas por 8h a 4°C para estabilização, sendo estas as bebidas consideradas prontas para o consumo. Os principais objetivos desta etapa são: retirada de constituintes granulados (grãos de kefir, fragmentos de jabuticaba), continuação do processo fermentativo e carbonatação das bebidas.

#### 4.2.1.3 Refrigeração

Após a segunda etapa, as garrafas foram refrigeradas por 8h a 4°C para estabilização, pois estavam prontas para o consumo e esta é uma temperatura em que habitualmente bebidas fermentadas são consumidas.

#### 4.2.2 Delineamento experimental, análise estatística e amostragem

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, com 3 repetições. As 4 diferentes formulações desenvolvidas foram monitoradas a partir do tempo 0 (imediatamente após

inoculação dos grãos e homogeneização com demais ingredientes das formulações) e foram analisadas a cada 8 h, até 56 h. Dessa forma, na primeira etapa as formulações foram analisadas em 4 tempos (0, 8, 16 e 24 h), na segunda etapa em 3 tempos (32, 40 e 48 h) a temperatura de 25 °C, e, finalmente, a última coleta de amostras foi realizada no tempo final, após estar submetida entre 48 e 56 h à temperatura de 4 °C.

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram sólidos solúveis totais e pH, com três réplicas por repetição; acidez total titulável, com 2 réplicas por repetição e parâmetros de cor, com 5 réplicas por repetição. Para carboidratos e ácidos orgânicos, os dados foram coletados em 2 repetições, com uma avaliação por repetição. Para minerais, foram coletadas amostras no tempo inicial e final, com três repetições, sendo o valor da repetição a média de 2 réplicas.

A microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos grãos depois de decorridas 24 h de fermentação.

As análises de variância (ANOVA) e os testes de Tukey para comparação múltipla das médias, em nível de 5% de significância ( $p < 0,05$ ), foram feitas empregando-se o software R. Os pontos de mínima e máxima abordados foram obtidos por meio da submissão dos dados à Equação 1.

$$X_v = -b / (2a) \text{ (Equação 1)}$$

### **4.2.3 Avaliações dos parâmetros físico-químicos**

#### **4.2.3.1 pH**

A determinação de pH foi feita por meio de potenciômetro digital (Gehaka, PG2000, Brasil), previamente calibrado com soluções tampões pH 4,00 e 7,00.

#### **4.2.3.2 Acidez total titulável**

A acidez total titulável foi determinada por titulometria com solução de hidróxido de sódio 0,1 M (padronizada), indicador fenolftaleína, conforme o método 942.15A da AOAC (2012). A acidez foi expressa em solução molar.100 mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.3 Determinação de ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico e succínico) foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em sistema instrumental Shimadzu LC 20 A (Kyoto, Japão), constituído por bomba de alta pressão LC-20AT, injetor automático SIL-20AC HT, detector de índice de refração RID-10A, detector de arranjo de fotodiodos SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e módulo de controle CBM-20A. Para as análises utilizou-se coluna cromatográfica ShiseidoCapCellPak 5 $\mu$  C18 MG 250 x 4,6mm. A fase móvel consistiu em solução tampão fosfato de sódio 25mM, com pH ajustado para 2,4 na vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura da coluna foi mantida a 30°C e o volume de injeção em 20 $\mu$ L. A detecção foi realizada simultaneamente nos detectores RID-10A e SPD-M20A, foi programado em comprimento de onda fixo de 215nm no modo de varredura de 200 a 400nm. Os dados foram processados com o auxílio do Software LC Solutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (REUTER, 2017).

A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos padrões de ácido lático, acético, cítrico e succínico com os dos picos observados nas amostras analisadas sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg. mL<sup>-1</sup>.

#### 4.2.3.4 Sólidos solúveis totais (SST)

A determinação dos sólidos solúveis totais, expressos em °Brix, foi medida em refratômetro de bancada (Metler Toledo - LiquiPhysics™ Excellence RM40, United Kingdom) de acordo com o método 932.12 da AOAC (2012).

#### 4.2.3.5 Carboidratos

Os carboidratos foram analisados por CLAE (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) composto de bomba de alta pressão (LC-20AT); injetor automático (SIL-20AC HT), na vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>, com volume de injeção ajustado para 20  $\mu$ L; detector por índice de refração (RID-10A); forno de coluna (CTO-20A) mantido em

temperatura constante de 85°C; módulo de controle (CBM-20A) e coluna de troca iônica Aminex HPX-87P (7,8 x 300 mm na forma iônica  $Pb^{+2}$ , Biorad, CA, EUA). Para esta análise, utilizou-se como fase móvel água ultra pura (Mili-Q(R)), por apresentar melhor resolução cromatográfica e melhor simetria de picos. A aquisição de dados e a integração dos picos cromatográficos foram realizadas com o auxílio do software LC Solutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) (PAULI, CRISTIANO, NIXDORF, 2011).

A identificação dos picos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos padrões de sacarose, glicose e frutose com os dos picos observados nas amostras analisadas sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos em  $mg.mL^{-1}$ .

#### 4.2.4 Determinação de minerais

Um grama de cada amostra foi pesado e transferido para erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se água destilada suficiente para cobrir a amostra e acrescentou-se 10 mL de ácido nítrico concentrado. As amostras foram colocadas em chapa de aquecimento por aproximadamente 10 min, evitando a fervura. Adicionou-se 4mL de peróxido de hidrogênio. Em seguida, realizou-se etapa de digestão por aproximadamente 40 min, por meio da adição de 5 mL de ácido clorídrico concentrado. O material digerido em temperatura ambiente foi passado em papel filtro quantitativo para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada. Procedeu-se a leitura das amostras em Espectrômetro de Emissão Atômica com Fonte de Plasma para os seguintes minerais: P, K, Ca, Mg, S, Na, Cu, Fe, Zn, Mn, B, Ni, Cr, Mo, Pb, Co e Cd (ICP-OES) (PerkinElmer - Optima 8300, EUA) (APHA, 2012).

#### 4.2.5 Análise colorimétrica

As cores das amostras das bebidas fermentadas por kefir de água foram determinadas em um colorímetro (Konica Minolta, Chroma Meter CR-4000, Japão) com iluminante D65 (luz natural do dia), que foi calibrado utilizando placas brancas. As amostras foram analisadas em um ângulo de 45° de iluminação e 10° de observação, a 25° C. As amostras foram colocadas em cubeta própria do

equipamento, com volume de 16 cm<sup>3</sup>, em quantidade suficiente para cobrir o menisco da mesma. As leituras foram realizadas diretamente no equipamento e os valores (L\*, a\*, b\*, C\* e H\*), expressos no sistema CIELab (ABNT, 1992; LAWLESS; HEYMANN, 1998). Os parâmetros Hue e c\* são apresentados direto pelo aparelho, tendo sido determinados segundo as equações 2 e 3.

$$\text{Hue} = \arctan (b^*/a^*) \quad (\text{Equação 2})$$

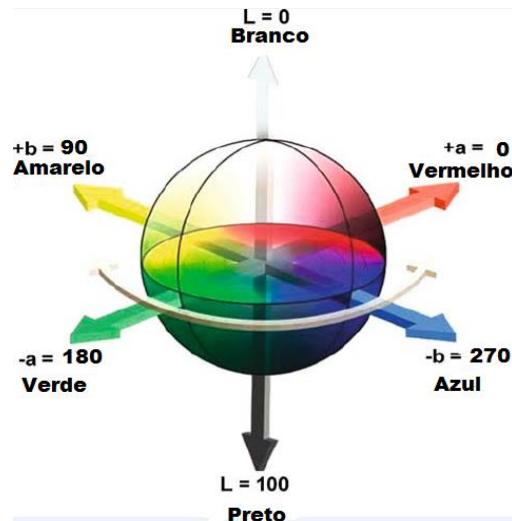
$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0,5} \quad (\text{Equação 3})$$

A diferença total de cor ( $\Delta E$ ), que dimensiona a alteração de cor entre as formulações avaliadas, e entre os diferentes tempos, foi determinada pela Equação 4.

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

O sistema CIELab tem como base os valores triestímulos do observador padrão em composição com a distribuição espectral do iluminante e com a curva de reflectância do objeto. O diagrama da tonalidade cromática (H\*), que identifica as cores, mostra a localização da cor em um diagrama onde o ângulo tem 3 eixos: o vertical representa a Luminosidade ou brilho (L\*), que varia de 0, com total absorção da luz (preto), até 100, com total reflexão (branco). As coordenadas a\* e b\* são responsáveis pela cromaticidade ou saturação (C\*), que indica a intensidade da cor, e é o desvio a partir do ponto correspondente ao cinza, no eixo L\*, definido pela distância de H\* ao centro do diagrama tridimensional (Figura 10), sendo o zero no centro e aumentado de acordo com a distância. No eixo a, a 0° temos o vermelho (+a\*), a 180°, o verde puro (-a\*) e no eixo b, a 90°, o amarelo puro (+b\*), e a 270°, o azul puro (-b\*) (SINGH; PARWATE; SHUKLA, 2009).

**Figura 10** - Diagrama tridimensional de Colorimetria – CIELab.



Fonte: Adaptado de SINGH; PARWATE; SHUKLA (2009).

#### 4.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises de MEV, o material foi fixado em glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1N, pH 7,2, por um período de 12 h a temperatura ambiente. Após a fixação primária, as amostras foram passadas por três lavagens em tampão cacodilato de sódio, pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1 % no mesmo tampão, por 2 h a temperatura ambiente e novamente lavadas em tampão. Em seguida o material foi desidratado em série alcoólica crescente e seco ao ponto crítico no CPD 030 *critical point dryer* (BAL-TEC AG, Balzers, Liechtenstein). As amostras secas foram montadas em *stubs* de alumínio usando fita de carbono e cobertas com ouro (Sputter coater – Baltec SCD 050). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio eletrônico de varredura FEI – Quanta 200 (GUERGOLETTTO et al., 2010).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Monitoramento dos Parâmetros Físico-químicos Durante a Elaboração das Bebidas Fermentadas por Kefir de Água

#### 5.1.1 Acidez

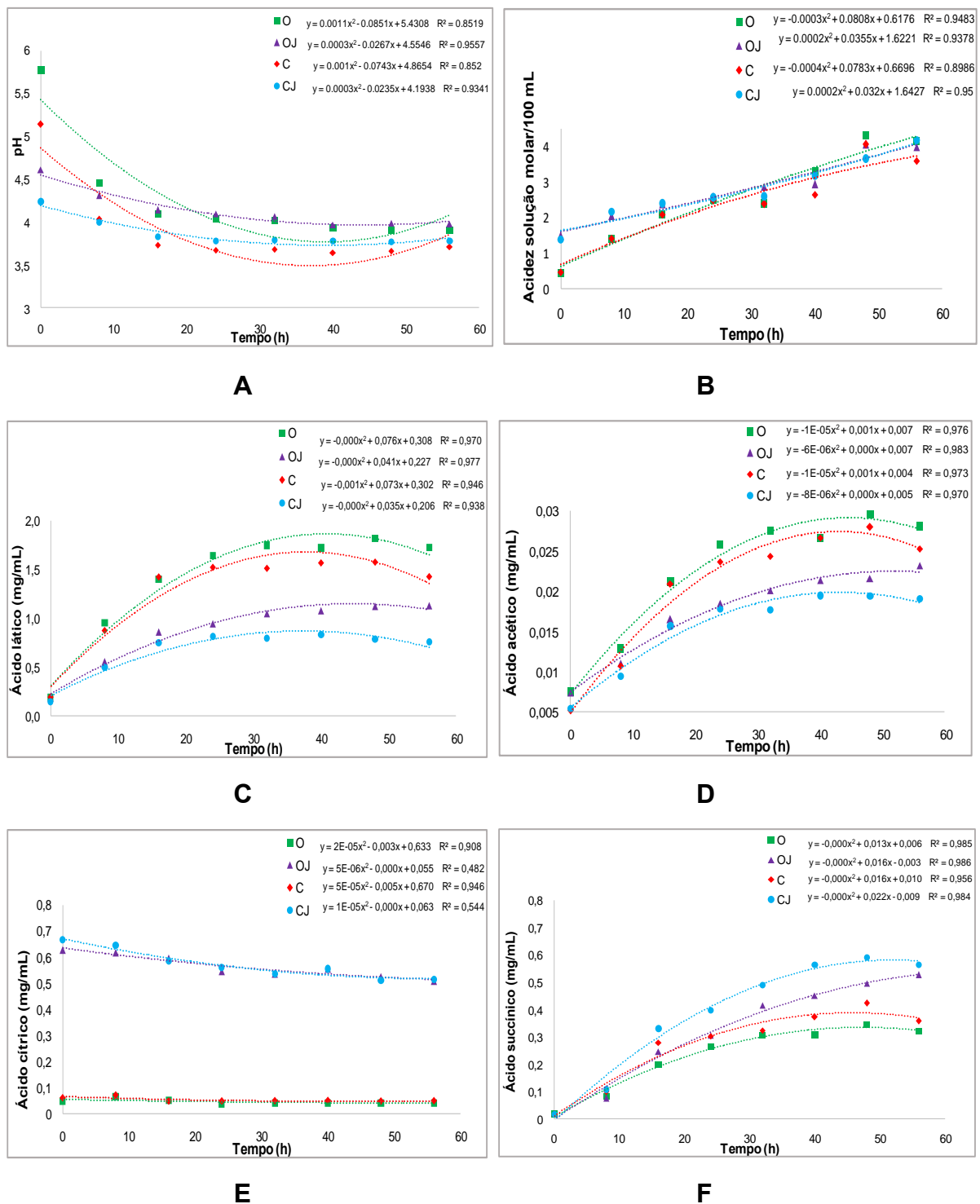
A análise de variância (ANOVA) para os seis parâmetros relacionados à acidez (pH, acidez total titulável: ATT, ácido láctico: AL, ácido acético: AA, ácido cítrico: AC e ácido succínico: AS) avaliados nas quatro formulações elaboradas por kefir de água, em oito tempos (Apêndice A), demonstra que houve efeito significativo ( $p < 0,001$ ) em todas as formulações, tempos e interação formulação x tempo. Os coeficientes de variação (CV) obtidos para estas seis características relacionadas à acidez variaram entre 0,77 % para o pH, 6,06 % para ATT, 3,65% para AL, 4,14% para AA, 4,85% para AC e 5,51% para AS. Estes valores indicam boa precisão experimental. A Figura 11 apresenta os parâmetros relacionados à acidez nas formulações fermentadas por kefir de água, monitoradas ao longo do tempo.

As análises das matérias primas (açúcar mascavo convencional, açúcar mascavo orgânico e polpa de jabuticaba), apresentaram valores entre 0 e 0,15 g.L<sup>-1</sup> para os ácidos orgânicos analisados, com exceção do ácido cítrico na polpa de jabuticaba (0,60 g.L<sup>-1</sup>) (Apêndice B). Portanto, é possível constatar que o aumento dos ácidos orgânicos foi decorrente do processo fermentativo, com excessão do ácido cítrico, que faz parte da composição da jabuticaba.

As quatro formulações avaliadas neste estudo apresentaram diminuição do pH com o passar do tempo. Este resultado foi decorrente de metabólitos oriundos do processo da fermentação dos substratos, com a produção dos ácidos orgânicos. As médias para estes resultados estão apresentadas no Apêndice C.

Em relação ao pH, todas as formulações avaliadas no produto final (56 h) apresentaram diferença significativa. Ao longo do tempo, estes valores não diferiram estatisticamente a partir de 40 h de fermentação, com exceção do kefir preparado com açúcar convencional, em que este valor se manteve a partir de 48 h. O menor valor de pH para as diferentes bebidas foi alcançado no tempo de 40 h (Figura 10), a partir deste tempo o valor do pH permaneceu constante. Ao final de 56 h a bebida C apresentou o menor pH (3,71), seguida de CJ (3,78), O (3,91) e OJ (3,98) (Apêndice C).

**Figura 11** – Parâmetros relacionados à acidez<sup>1</sup>, em quatro formulações<sup>2</sup> fermentadas por kefir de água, em oito tempos.



<sup>1</sup>A- pH; B- acidez total titulável; ácidos orgânicos: C- ácido láctico; D- ácido acético; E- ácido cítrico; eF- ácido succínico.

<sup>2</sup>O = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir fermentado com açúcarsmascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir fermentado com açúcar mascavo convencional; eCJ = kefir fermentado com açúcar convencional e jabuticaba.

Observamos que a acidez total titulável e os teores dos ácidos láctico, acético e succínico apresentaram valores crescentes ao longo do tempo de fermentação (Figura 11). O ácido cítrico apresentou tendência decrescente até 16 h. No tempo de 56 h, os produtos O e C apresentaram valores maiores de ácido láctico e ácido acético e menores teores de ácido cítrico e ácido succínico, quando comparados com os produtos OJ e CJ (médias: Apêndice C; Cromatogramas: Apêndice D).

Chama a atenção a influência da jabuticaba no visível aumento, em cerca de 30 vezes, da produção de ácido succínico nos tratamentos onde a polpa da fruta estava presente, uma vez que é um eficiente antioxidante, normaliza o metabolismo energético, tem o potencial de eliminar determinados microrganismos indesejáveis, ao mesmo tempo que aumenta os desejáveis, além de ter possíveis efeitos contra câncer de endométrio (DA SILVA-MAIA et al., 2018; IPLIK; CATMAKAS; CAKMAKOGLU, 2018; RADKOWSKI, ZDRODOWSKA, GOMÓŁKA-PAWLICKA, 2018).

Ao produzir vinho a partir de jabuticaba com *Saccharomyces cerevisiae*, Dias e colaboradores (2016) observaram, após 168 h, decréscimo da sacarose (99,9), e aumento na produção de AA (736%) e AS (360%). Também ocorreu redução do AC (31%), provavelmente pela sua metabolização pela levedura como fonte de carbono e energia. Posteriormente, aplicou as bactérias *A. aceti* e *G. oxydans* imobilizadas para produzir vinagre.

Randazzo e colaboradores (2016) utilizaram grãos de kefir de água na fermentação estática, a 25°C, por 48 h, de seis diferentes sucos de frutas do mediterrâneo: maçã, uva, kiwi, romã, fruto da palma forrageira e marmelo. Os teores de pH atingiram valores de  $4,04 \pm 0,08$ ,  $3,81 \pm 0,04$ ,  $3,48 \pm 0,03$ ,  $3,89 \pm 0,08$ ,  $4,11 \pm 0,07$ , e  $3,62 \pm 0,05$ , respectivamente. Estes valores estão próximos aos que obtivemos.

Na bebida preparada em temperatura ambiente, com 1,2 g de grãos obtidos da Pastoral da Criança, em Aracaju, Sergipe, Brasil, com de  $15 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcar mascavo, o pH variou de 6 até 4 entre o tempo 0 h e 48 h de fermentação (SILVA et al., 2009), portanto, dentro do esperado.

Laureys e de Vuyst (2014) relataram em seu estudo de fermentação de kefir de água (condições de fermentação conforme Tabela 3), que partiu de um valor de pH de  $4,85 \pm 0,01$  e atingiu  $3,45 \pm 0,01$ , após 72 h de fermentação e a tendência de decréscimo desta medida foi vagarosa até alcançar o valor de  $3,35 \pm 0,01$ , após 192 h de fermentação. Comparando com nossos resultados, estão de acordo. Não

atingimos pH tão baixo provavelmente porque avaliamos até 56 h, apenas. No trabalho de Laureys e de Vuyst (2014) a produção de AL e AA foi crescente, principalmente até 72 h de fermentação, sendo que o primeiro foi produzido em maior quantidade, com 15 g.L<sup>-1</sup>, e 3 g.L<sup>-1</sup> para o último. No nosso trabalho, foi alcançado o máximo de 1,8 g.L<sup>-1</sup> de AL, para O em 48 h e 0,0297 g.L<sup>-1</sup> de AA, também para O em 48 h.

Magalhães e colaboradores (2010) (condições de fermentação conforme Tabela 3) obtiveram valores de pH entre 5,6 a 4,1 para o tempo inicial (0 h) e final (24 h) de fermentação, respectivamente. A ATT variou de 0,02 a 0,07 g.100 mL<sup>-1</sup> ao longo do tempo. O AL variou entre 0,2 a 1,75 mg. mL<sup>-1</sup>, semelhante aos resultados encontrados em nosso trabalho, para os tratamentos sem jabuticaba (0,19 a 1,8 g.L<sup>-1</sup> entre 0 h e 48 h). O AA iniciou com teor próximo a zero e atingiu 1,4 mg. mL<sup>-1</sup> (24 h), valores superiores aos encontrados neste trabalho (em torno de 0,02 g.L<sup>-1</sup> para 24 h). O AA em baixas concentrações (<1,0 g / L) proporciona um sabor agradável e inibe o desenvolvimento de microorganismos indesejáveis ou patogênicos (DIAS et al., 2016).

Monar e colaboradores (2014) encontraram valores de 0,71, 0,86 e 1,71 mg.mL<sup>-1</sup> para AL em 24, 48 e 72 h de fermentação, a 30 °C, respectivamente, (Tabela 3). Harta e colaboradores (2004), em experimento com 42 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, observou que 8,71 g.L<sup>-1</sup> de AL foram produzidos no processo de fermentação, em 24 h, a 30 °C.

Ao comparar os trabalhos encontrados na literatura e o presente estudo, observa-se que todos os tipos de bebidas têm em comum a característica ácida ao final do processo fermentativo, sejam elas elaboradas por diferentes fontes de sacarose, por frutas, ou pela combinação de fruta e açúcar, como se espera que ocorra após o processo fermentativo.

A produção de ácidos orgânicos, em conjunto com outros metabólitos, concederá atributos sensoriais característicos aos produtos fabricados com kefir de água. Portanto, ao avaliar a aceitação de tais formulações, deve-se considerar que as preferências de gosto e sabor podem ser bastante diferentes entre grupos específicos da população e entre indivíduos, sendo que o que alguns consideram como deterioração, pode ser desejável por outros (BOURDICHON et al., 2012). Dessa forma, o uso de açúcar mascavo orgânico e de frutas na elaboração do kefir

podem conferir características específicas, quanto à composição, sabor e cor, para os produtos finais.

### 5.1.2 Perfil de Açúcares

A ANOVA para as quatro características relacionadas aos açúcares avaliadas no kefir de água para as quatro formulações em oito tempos (Apêndice E) mostra que houve efeito significativo ( $p < 0,001$ ) para todas as características estudadas, para todos as formulações, tempos e interação produto x tempo. Os coeficientes de variação variaram entre 1,61 % para sólidos solúveis totais, 4,42 % para sacarose, 4,33 % para glicose e 5,43 % para frutose.

Com base nas análises obtidas por cromatografia, nas matérias-primas, o açúcar orgânico apresentou maiores teores de sacarose ( $53,33 \text{ g.L}^{-1}$ ) e menores teores de glicose ( $0,25 \text{ g.L}^{-1}$ ) e frutose ( $0,40 \text{ g.L}^{-1}$ ), quando se compara com o açúcar convencional nos quais os valores foram de 52,61, 0,93, e  $0,82 \text{ g.L}^{-1}$ , respectivamente. A polpa de jabuticaba apresentou teor inferior de sacarose ( $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ ) e superiores de glicose ( $1,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) e frutose ( $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ ), quando comparado com os açúcares (Apêndices F, G e H, e Figura 12).

Considerando-se as quatro formulações, os teores de sólidos solúveis totais e sacarose foram decrescentes, ambos atingindo os menores valores no tempo próximo a 46 h. O tratamento O diferiu estaticamente dos demais em relação aos SST no tempo 56 h, demonstrando uma maior taxa de consumo pelos microrganismos presentes (redução de 34 %), sendo que C apresentou redução de 26 %, e CJ e OJ de 29 %.

Ao longo do tempo, a conversão de sacarose se estabilizou a partir de 32 h para formulação O e às 40 h para C e CJ. Os teores de glicose e frutose foram crescentes, com máximo de 40 e 45 horas, respectivamente (médias: Apêndice F; Figura 11). Essas mudanças influenciam no sabor, uma vez que oscilações no conteúdo de sacarose à partir de  $1,35 \text{ g.L}^{-1}$  já são detectadas por não diabéticos (DIAS et al., 2016).

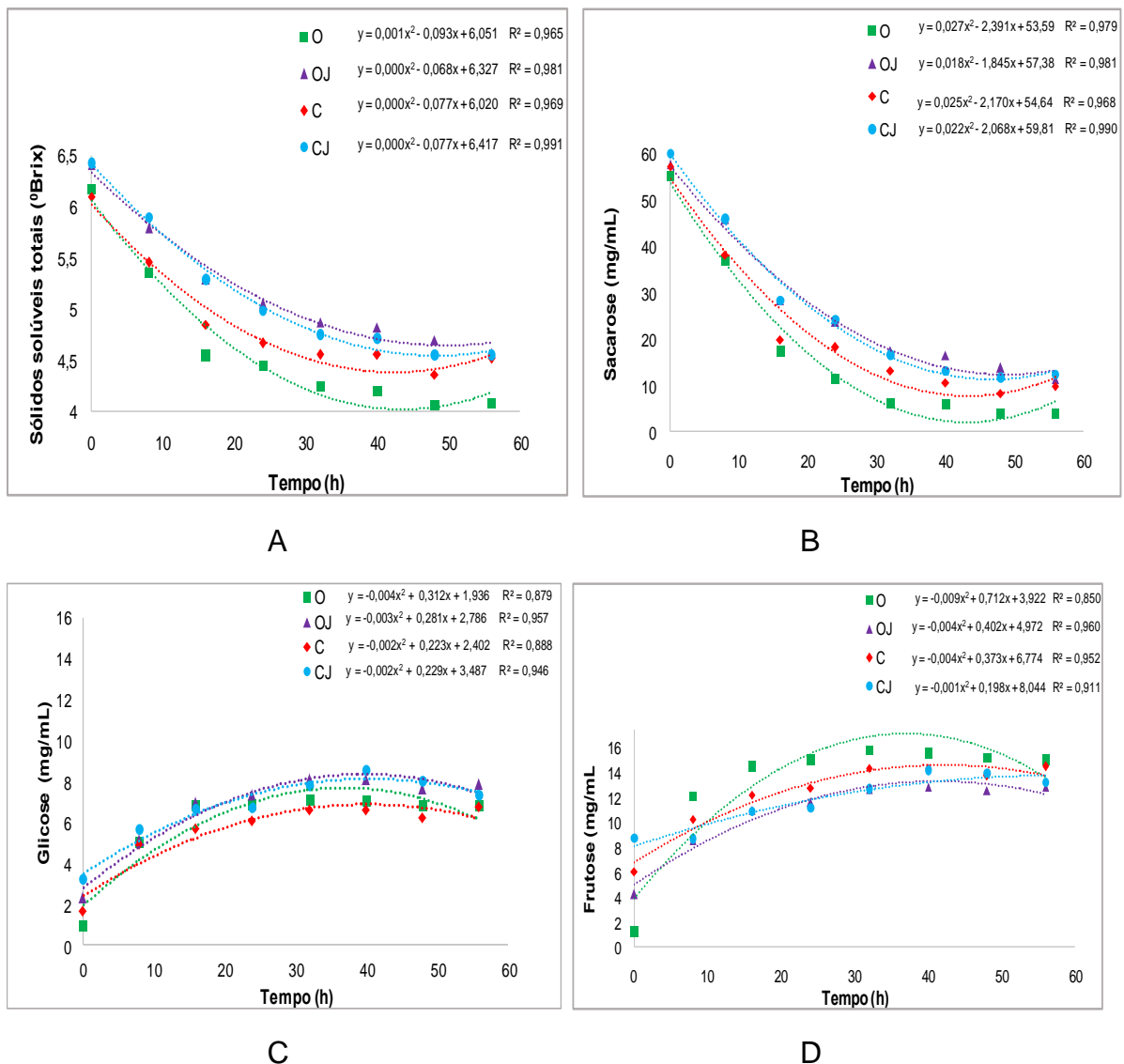
A transformação dos componentes do meio em produtos ocorre graças às atividades de diversas enzimas que são sintetizadas pelos próprios microrganismos. No contexto de uma fermentação mista, é difícil apontar com precisão quais enzimas

e rotas metabólicas específicas estão sendo utilizadas. Porém, é possível que a hidrólise da sacarose tenha sido realizada, provavelmente, por meio da enzima invertase extracelular, proveniente das leveduras, da invertase intracelular e da enzima glucanosucrase das bactérias, em teoria, resultando no aumento dos açúcares redutores glicose e frutose. Esse fato foi constatado por meio da redução do teor de sacarose de 93, 80, 83 e 79%, para O, OJ, C e CJ, respectivamente.

O aumento da glicose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi de 600, 239, 309 e 130 %, para O, OJ, C e CJ, respectivamente; e o aumento da frutose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) foi de 1.115, 206, 139 e 51 %, para O, OJ, C e CJ, respectivamente, do início (0 h) ao final do monitoramento (56 h). Portanto, com açúcar orgânico houve fermentação mais efetiva. Ainda analisando os açúcares redutores, é possível constatar que a presença de frutose detectada no meio é superior em relação à glicose. Após serem disponibilizados através da hidrólise da sacarose, os açúcares redutores são submetidos à ação das enzimas glicolíticas, resultando em diferentes metabólitos, como: etanol,  $\text{CO}_2$ , ácidos orgânicos (Figura 4). O maior consumo de glicose em relação à frutose pode ser justificado em parte pela maior eficiência que as leveduras têm em utilizá-la como substrato, o que leva a ser catabolizada preferencialmente e inibe a quebra de frutose. Também devido à sua utilização pelas bactérias produtoras do polímero (dextran) responsável pela formação dos grãos (item 3.1.3).

Ao comparar a mudança ocorrida nos valores de açúcares totais entre o tempo inicial e final e entre as quatro formulações, é possível constatar na ANOVA que o quadrado médio para as fontes de variação produto e tempo, apresentou efeito significativo em nível de 0,001, e para interação produto x tempo ( $p < 0,05$ ). O coeficiente de variação para essa característica foi de 3,24%, indicando precisão experimental (Apêndice I). Considerando-se os quatro produtos, os teores de açúcares totais foram no tempo final (média  $30,5 \text{ g.L}^{-1}$ ), aproximadamente, metade dos encontrados no início do processo (média  $64,8 \text{ g.L}^{-1}$ ). No tempo final, a formulação com kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico apresentou o menor teor ( $25,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) (Apêndice J).

**Figura 12** – Consumo dos substratos em 4 formulações e oito tempos.



A- Sólidos solúveis totais; B – sacarose; C – glicose; e D- frutose.

<sup>1</sup>O = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir fermentado com açúcar mascavo convencional; eCJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba.

Uma porção de 350 mL de refrigerante sabor cola, referente ao conteúdo de uma lata, fornece, por exemplo, 37 g de carboidratos provenientes de açúcares (Apêndice J), extrapolando os 25 g diários, recomendados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015). Em contrapartida, as formulações analisadas no presente trabalho resultaram em valores entre 9,0 e 11,6 g.350 mL<sup>-1</sup>, valores aceitáveis dentro destas recomendações.

Laureys e de Vuyst (2014), em estudo de fermentação de kefir de água (Tabela 3), iniciaram experimento com um telor de sacarose de aproximadamente 50

$\text{g.L}^{-1}$ , que foi quase completamente consumida após 24 h de fermentação. A glicose e frutose apresentaram concentração inicial de  $14 \text{ g.L}^{-1}$ , sendo que a frutose teve um valor máximo de  $25 \text{ g.L}^{-1}$  até 24 h, depois iniciou um decréscimo até seu consumo total em 72 h de fermentação. A glicose, por sua vez, teve reduzidos teores até próximos de zero, com 48 h de fermentação.

Os resultados deste trabalho seguem as tendências das observações de Magalhães e colaboradores (2010), que acompanharam a fermentação de 21 amostras de grãos de kefir de água, cultivados em solução com 5% de açúcar mascavo, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Os sólidos solúveis totais variaram de 5,2 a 4,1  $^\circ\text{Brix}$  do tempo inicial até 24 h de fermentação equivalente a uma redução de 21 %. Para sacarose, os valores variaram de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  (0 h) para  $28 \text{ g.L}^{-1}$  (24 h), equivalente a uma redução de 30%, enquanto nosso trabalho encontrou 80% para a formulação com açúcar orgânico (O) e 68 % para açúcar convencional (C), após 24h e 93 e 83 % após 56 h, respectivamente.

Ainda neste trabalho, os açúcares redutores apresentaram concentrações crescentes, sendo que o teor de frutose variou de aproximadamente  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  no tempo inicial, a  $5,5 \text{ g.L}^{-1}$  (aumento de 367 %) e o de glicose, de  $1,2 \text{ g.L}^{-1}$  a  $3,9 \text{ g.L}^{-1}$  (aumento de 325 %) no tempo final de 24 h de fermentação, o que é esperado, pois durante a fermentação ocorre a hidrólise da sacarose, com consequente formação de glicose e frutose. Em nosso trabalho, com 24 h de fermentação observamos aumento percentual para frutose de 1.118 (O), 111 (C), 177 (OJ), e 28 % (CJ); e de 609 (O), 265 (C), 216 (OJ), e 110 % (CJ), para glicose.

### **5.1.3 Minerais**

De acordo com a ANOVA para os minerais analisados no kefir de água para quatro bebidas, e em dois tempos, (Apêndice K), observou-se que para produtos, houve efeito significativo ( $p < 0,001$ ) para P, K, Mg, S, Cu, Mn e B, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) para Ca e Cr, efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para Zn e Ni e efeito não significativo para Na e Fe. Em relação aos tempos de acompanhamento da fermentação, houve efeito significativo ( $p < 0,001$ ) para P, Mg, Na, Zn, Mn, B, Ni e Cr, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) para Ca e Fe, efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para Cu e efeito não significativo para K e S. A interação produto x tempo teve efeito

significativo ( $P < 0,001$ ) para P, Mg, Mn, B e Ni, efeito significativo ( $p < 0,01$ ) para o Cr, efeito significativo ( $p < 0,05$ ) para Cu, Fe e Zn e não significativo para K, Ca, S e Na.

Os coeficientes de variação das análises dos minerais variaram de 3,86% para o P a 21,68% para o Cr. Valores superiores foram encontrados para Ni (26,9 %), Zn (29,7 %) e Cu (40,15 %), presentes em baixas concentrações nos produtos avaliados, com médias de 0,1297, 0,2403 e 0,2567mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Apêndice K). Esses valores obtidos são esperados para esse tipo de determinação (Laborsolo, Informação Pessoal, 2017).

Os teores dos minerais analisados em kefir de água, para quatro bebidas, nos tempos 0 e 56 horas, estão apresentadas na Figura 13 e as médias no Apêndice L. Os teores de P, Ca e Na aumentaram, significativamente, em todas as quatro bebidas finais. P apresentou maiores aumentos nos produtos com açúcar convencional (C: 209 % e CJ: 138 %), comparando com os contendo açúcar orgânico (O: 131 % e OJ: 67 %). Para Ca, os resultados foram aumentos percentuais de 32 (CJ), 29 (O), 21 (C) e 17 % (OJ). Para o Cr, houve aumento significativo para C: 409 %, CJ: 365 % e OJ: 103 %, mas para O não foi significativo.

Para Na, Fe e B, não foram observadas diferenças significativas entre as 4 formulações, nos produtos finais. Mas houve aumento de 91 (OJ), 101 (C), 114 (CJ) e 201 % (O) para o Na. O teor de Fe não sofreu alteração significativa quando se utilizou o açúcar orgânico, porém teve decréscimo de 22 e 35 % com o açúcar convencional. Quanto ao B, houve decréscimo percentual de 67 (C), 64 (CJ) e 34 % (OJ) e um aumento de 84 % para O.

Os teores de K e S não sofreram mudanças estatisticamente significativas até o término do experimento, nas quatro formulações. O mesmo ocorreu para Mg e Zn, com uso de açúcar convencional, sendo que o Mg apresentou aumento com uso do açúcar orgânico (O: 43 % e OJ: 13%), enquanto que Zn apresentou redução quando foi utilizado açúcar orgânico (O: 53 % e OJ: 50 %). Para o cobre houve redução significativa (62 %) para OJ. Para o Ni, apresentou aumento significativo de 185 % para C e de 277 % para CJ. Ainda em relação ao K, é possível observar que as formulações com jabuticaba apresentaram maiores quantidades, estatisticamente superiores, quando comparado dentro do mesmo tipo de açúcar.

Os minerais Mo e Pb não foram detectados na maioria das repetições e e Co e Cd não foram detectados em nenhuma das repetições.

Em todas as amostras avaliadas, destacaram-se os teores de potássio e ferro. Tanto estes quanto os demais elementos avaliados se encontraram abaixo do máximo das recomendações diárias (entre 0,8 e 14,3 %) para uma porção de 350 mL.

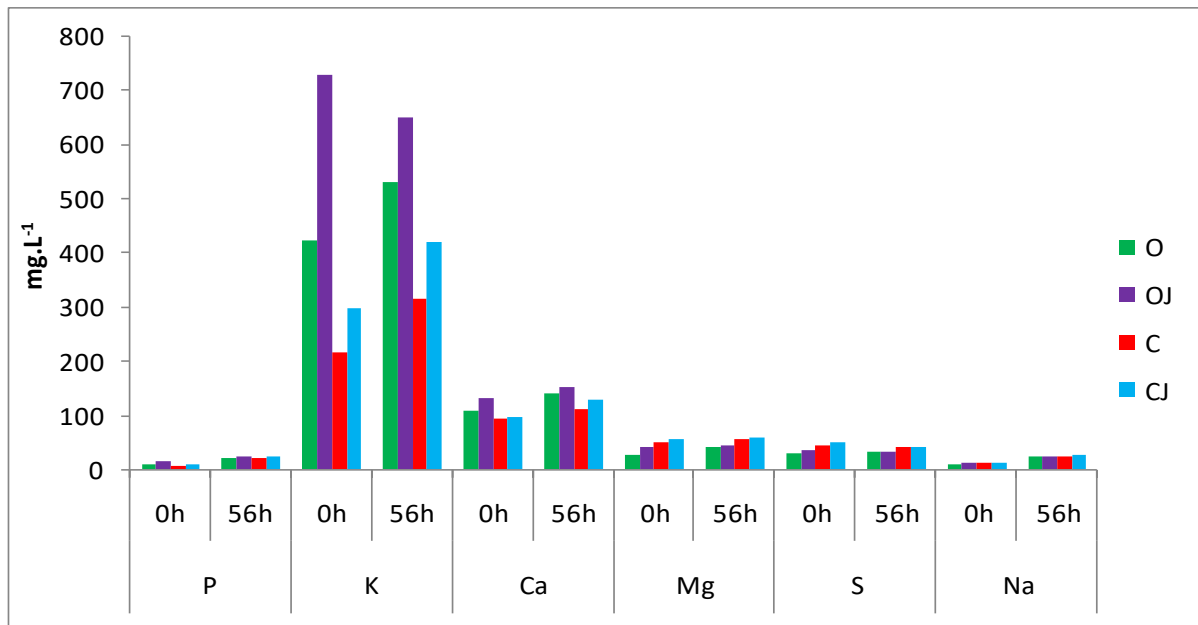
O cromo (Cr) foi uma exceção, pois atingiu entre 226,7 e 234,3 % da recomendação de ingestão diária (0,035 mg/dia) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2006). Em geral, Cr tem toxicidade muito baixa pela via oral, e existem raras observações bem documentadas de toxicidade após ingestão oral em humanos (VKM, 2018). O Cr é encontrado, por exemplo, em levedo de cerveja. Tem papel vital no funcionamento apropriado da insulina. Portanto, está envolvido em mecanismos de ação que levam a consequências no metabolismo de proteínas, gorduras e carboidratos, principalmente se houver escassez no organismo.

Zhang e colaboradores (2017) analisaram a influência do Cr em características relacionadas ao diabetes e metabolismo lipídico. Relataram que ratas alimentadas com dieta deficiente em Cr levou os filhotes a desenvolverem maior peso corporal, tecido adiposo e níveis séricos de colesterol total (CT) e de triglicerídeos (TAGs).

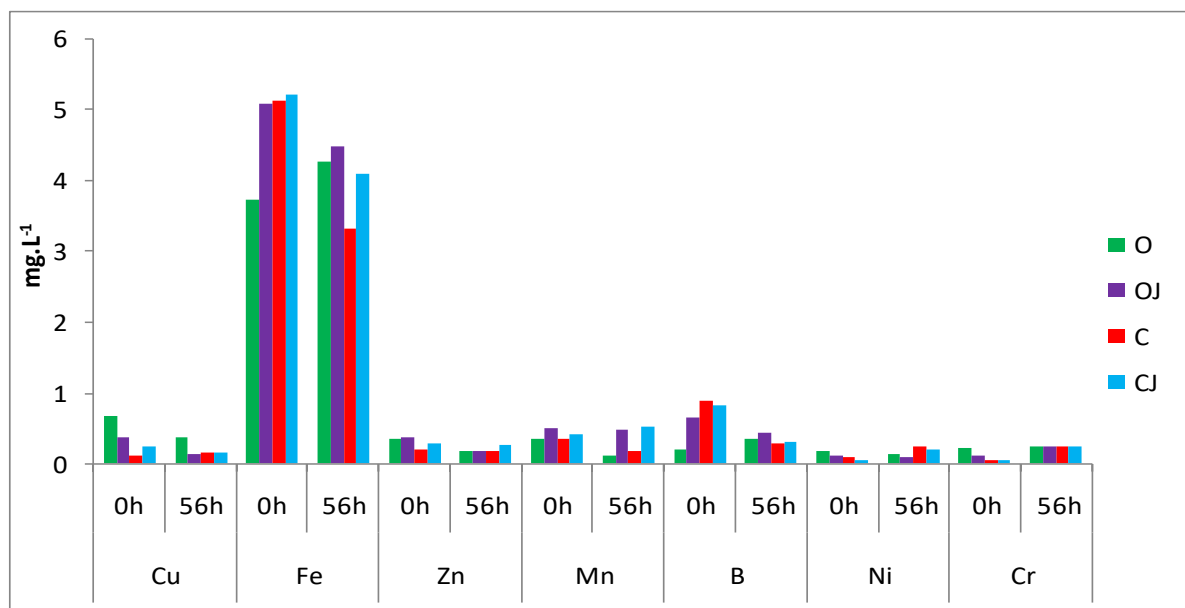
Doddigarla, Ahmad e Parwez (2016) reportaram que suplementos como picolinato de cromo reduzem a glicemia, CT e TAGs, aumentam o colesterol de lipoproteínas de alta densidade e melhoram a capacidade antioxidante em diabéticos por atenuação da resistência à insulina. Além destas características, Huang e colaboradores (2018) também citam a redução da hemoglobina glicada. Gomes, Rogero e Tirapegui (2005) comentam que o Cr tem sido usado como suplemento alimentar no meio esportivo com a proposta de promover ganho de massa muscular e perda de gordura corporal, mas os efeitos comprovados foram alguns casos de melhora do perfil lipídico e do quadro de diabetes tipo 2, devido ao Cr aumentar a sensibilidade à insulina e inibir a síntese de colesterol.

Magalhães e colaboradores (2010) não detectaram mudança no teor de cinzas (0,2%), que são predominantemente formadas por minerais, entre o tempo inicial e final de fermentação. Luchini (2014) comparou diferentes açúcares mascavos em sistemas orgânicos e convencionais, detectou teores de Cu, Zn, Mn e Fe abaixo do recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

**Figura 13**– Teores dos minerais analisados em kefir de água, para 4 formulações, no tempo 0 e após 56 horas de fermentação.



A



B

A-Macrominerais; B- Microminerais.

<sup>1</sup>O = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir fermentado com açúcarsmascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir fermentado com açúcar mascavo convencional; eCJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba.

Os minerais e vitaminas são ativadores do funcionamento de enzimas, peças-chaves das reações bioquímicas, e possibilitam que o corpo realize suas atividades

metabólicas. São elementos vitais, sendo os primeiros encontrados naturalmente no solo e absorvidos pelos vegetais, que são consumidos pelos animais (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010).

Os nutrientes minerais são reconhecidos como essenciais para a função humana, representando cerca de 5% do peso corporal de adultos. Destes, aproximadamente 50% é constituído por cálcio e 25% por fósforo. Os outros macrominerais magnésio, sódio, potássio, cloro e enxofre, os microminerais ferro, zinco, iodo, selênio, manganês, flúor, molibdênio, cobre, cromo, cobalto e boro e os elementos ultratraço (ex.: níquel) constituem os 25% restantes (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2010).

Dentre os elementos químicos, são considerados essenciais para a nutrição microbiana: hidrogênio (H), oxigênio (O), carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), enxofre (S) e selênio (Se). O fósforo é requerido pela célula para a síntese de ácidos nucleicos, fosfolípidos, e adenosina trifosfato (ATP). Geralmente é fornecido à célula na forma de fosfato ( $\text{PO}_4^{2-}$ ). O enxofre está presente nos aminoácidos cisteína e metionina e também em uma série de vitaminas, como tiamina, biotina, ácido lipoico, e geralmente é fornecido à célula na forma de sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ). O potássio (K) é necessário para a atividade de diversas enzimas, enquanto o magnésio (Mg) é necessário para a estabilização dos ribossomos, membranas e ácidos nucleicos, sendo também necessário à atividade de muitas enzimas. O processo microbiológico de formação de minerais é chamado de biomineralização (MADIGAN et al., 2016).

Os microrganismos requerem vários metais para o crescimento, geralmente em pequenas quantidades, e esses fazem parte dos micronutrientes. As bactérias lácticas são conhecidas por suas várias necessidades destas moléculas, as quais superam inclusive as necessidades dos seres humanos. Dentre os microminerais, o principal é o ferro, que desempenha um importante papel na respiração celular. O ferro é um componente essencial de citocromos e das proteínas que contêm ferro e enxofre envolvidas nas reações de transporte de elétrons (MADIGAN et al., 2016).

### 5.1.4 Cor

A análise de variância (ANOVA) para as cinco características relacionadas às cores ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $H^*$  e  $C$ ), avaliadas no kefir de água para as quatro formulações, em oito tempos (Apêndice M), apresentou efeito significativo ( $p < 0,001$ ) para todas as cinco características estudadas, para todos os produtos, tempos e interação produto x tempo. Os coeficientes de variação obtidos para as cinco características estudadas relacionadas às cores variaram de 0,83 % a 3,97 %, indicando ótima precisão experimental.

A variação de cor entre o produto final e o inicial, avaliada pela diferença total de cor ( $\Delta E$ ), entre o tempo inicial (0 h) e o final (56 h), foi de 6,4, 8,53, 8,94 e 7,96 para as formulações O, OJ, C e CJ, respectivamente. Portanto, o processo fermentativo representa mudanças de cor nos tratamentos que são claramente perceptíveis aos olhos humanos, considerando a Tabela 8.

**Tabela 8** – Percepção humana para diferentes valores de  $\Delta E$  empregada pela indústria de tintas (Norma DIN 6174, 1979).

Diferenças ( $\Delta E$ )	Classificação
0,0 – 0,2	Imperceptível
0,2 – 0,5	Muito pequena
0,5 – 1,5	Pequena
1,5 – 3,0	Distinguível
3,0 – 6,0	Facilmente distinguível
Maior que 6	Muito grande

Fonte: SILVA, PETTER e SCHNEIDER (2007).

Foi observado que há maior influência da presença da jabuticaba nas formulações estudadas, na variação da cor, quando se comparam os resultados das bebidas contendo jabuticaba com as que não continham (O x OJ e C x CJ), mas que o tipo de açúcar também foi importante (O x CeOJ x CJ) (Tabela 9). Essa diferença de cor entre os diferentes tipos de açúcar pode ocorrer devido a diversos fatores, como o fato de o açúcar orgânico ser uma mistura de dois cultivares, o grau de maturação (processo fisiológico de transporte e armazenamento de sacarose nas

células parenquimatosas dos colmos) na colheita, a temperatura no secador etc (Figura 8, Anexos B e C).

**Tabela 9** - Comparação das diferenças totais de cores ( $\Delta E$ ) entre quatro formulações<sup>1</sup> elaboradas por kefir de água, em oito diferentes tempos.

<b>Formulações Comparadas</b>	<b>O x OJ</b>	<b>C x CJ</b>	<b>O x C</b>	<b>OJ x CJ</b>
<b>Tempo (h)</b>				
<b>0</b>	3,45	5,84	3,41	0,92
<b>8</b>	8,42	10,00	3,31	1,20
<b>16</b>	9,05	8,98	3,37	2,16
<b>24</b>	8,47	8,62	2,91	1,26
<b>32</b>	8,57	7,60	3,65	1,11
<b>40</b>	6,93	8,25	3,53	1,85
<b>48</b>	7,16	5,29	3,29	2,21
<b>56</b>	7,03	7,78	2,75	1,50

<sup>1</sup>O = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir fermentado com açúcar mascavo convencional e; CJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba.

As médias das características relacionadas às cores: L\*, a\*, b\*, C, e Hue, avaliadas em oito tempos (Figura 14; Apêndice N), demonstram que os valores obtidos apresentaram tendência de aumento ao longo dos oito tempos avaliados, sendo que no período de 0 a 8 horas de fermentação o aumento foi mais pronunciado para todas as características. As formulações sem jabuticaba apresentaram valores geralmente superiores às que continham a fruta, com exceção da característica a\*, onde a formulação com açúcar convencional apresentou valores mais baixos em praticamente todos os tempos de avaliação.

Em relação à Luminosidade (L\*), esta apresentou aumento significativo para todas as formulações a partir das 16 h de fermentação, isto é, estavam tendendo a ficarem mais claras, sendo menos pronunciada para as que continham jabuticaba, pois esta apresenta a cor escura proveniente da casca. Houve diferença significativa entre as bebidas formuladas com açúcar orgânico e o convencional, este apresentando valores superiores. O parâmetro a\* apresentou aumento já a partir das 8 h de fermentação, para O e CJ, demonstrando uma tendência a aumento do tom vermelho, especialmente nas bebidas contendo jabuticaba, que apresentaram quase o dobro do valor inicial, no produto final. Só houve diferença significativa nos tempos 0 e 16 h entre OJ e CJ, portanto não há influência do tipo de açúcar, neste caso.

O maior aumento observado, em relação à cor, foi na coordenada  $b^*$ , que reflete o tom amarelado, sendo que nas bebidas com jabuticaba, também foi menor esta diferença. As formulações contendo açúcar orgânico apresentaram maior aumento do que as com açúcar convencional. A saturação das cores ( $C^*$ ) apresentou aumento a partir de 8 h, atingindo máximo às 48 h. Foi maior nos produtos com jabuticaba, mas o tipo de açúcar não influenciou, uma vez que as bebidas que o continham apresentaram diferença significativa apenas em dois tempos avaliados para duas únicas formulações.

### **5.1.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

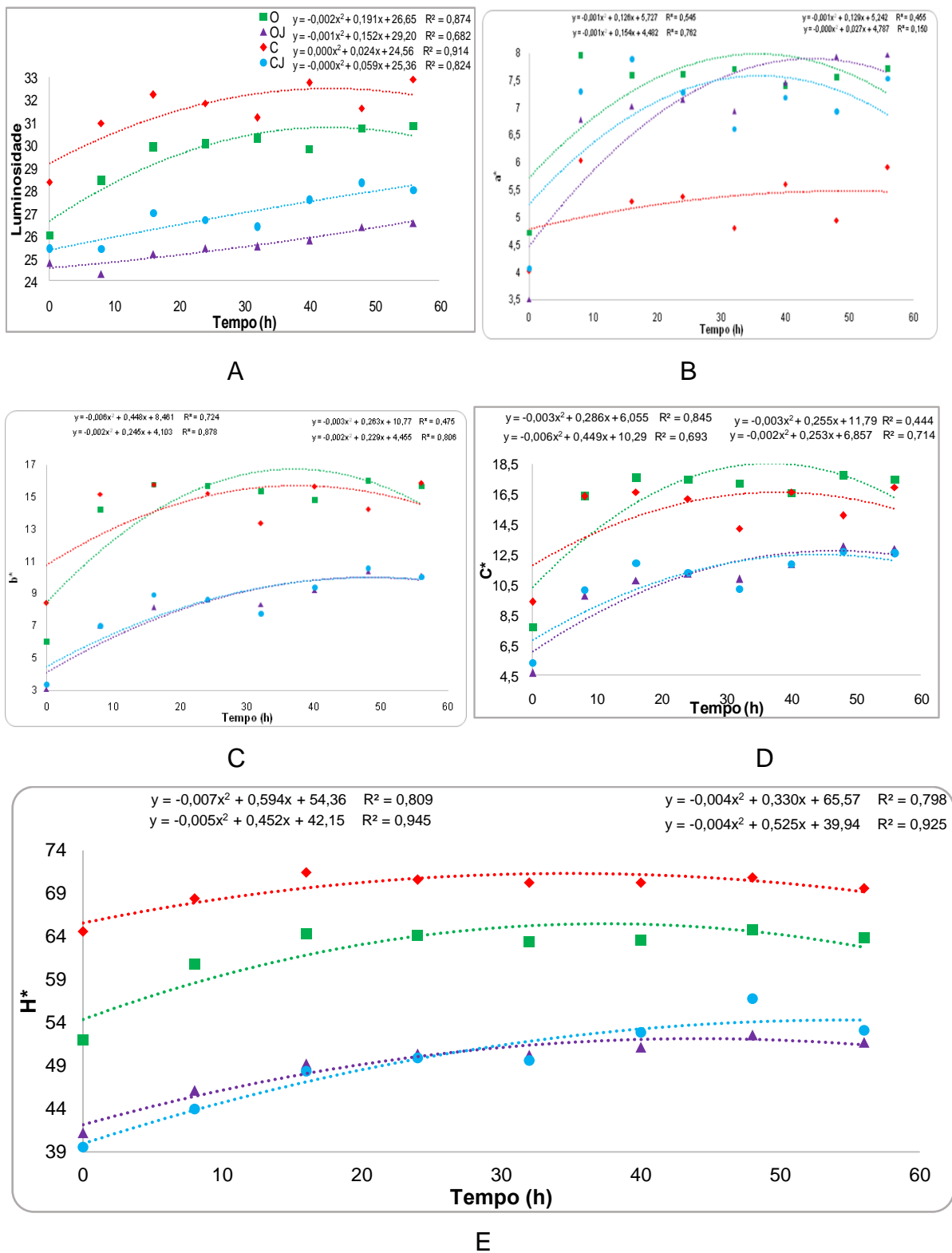
A MEV foi utilizada como técnica complementar de determinação qualitativa a partir da observação de imagens (Figura 15, Apêndice O), que evidenciam a associação microbiana complexa entre bactérias e leveduras presentes em grãos de kefir de água, apresentando formatos e superfícies irregulares. Podemos observar que há uma diferença nos grãos que se desenvolveram com e sem jabuticaba, e, também, nos microrganismos presentes.

As imagens evidenciam a existência de leveduras e bactérias, distribuídas de maneira organizada, de modo semelhante à uma rede interligada através de corredores de seres e seus respectivos mecanismos de sobrevivência, como: desenvolver biopolímeros que proporcionem fixação e adaptação a meios ácidos, produção de metabólitos que interagem com as diversas espécies presentes de forma sinérgica, por exemplo.

Moinas, Horisberger e Bauer (1980) (condições de cultivo na Tabela 3), ao avaliarem imagens de grão de kefir de água, constataram que eram constituídos por uma camada compacta externa e uma estrutura esponjosa interna. A camada externa foi mais densamente povoada pelos microrganismos que a camada interna, mas o dextrano foi mais abundante na camada interna.

Pidoux (1989) cultivou grãos de kefir açucarados domésticos originários da região de Angers na França, que foram propagadas à temperatura ambiente por transferência diária em solução de água potável ( $60 \text{ g.L}^{-1}$ ), e chegou a uma conclusão semelhante. O exterior foi coberto por uma rede de pseudomicélio portador de blastosporos e presos entre si ou em colônias de bactérias. Ele atribuiu este pseudomicélio à *Candida*.

**Figura 14** - Valores dos parâmetros relacionados à cor<sup>1</sup> em 4 formulações de kefir de água, em 8 tempos.



<sup>1</sup>A-L\* (luminosidade); B - a\*; C - b\*; D- C\* (saturação); e E- H\* (tonalidade cromática).

<sup>2</sup> ■ O = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico;

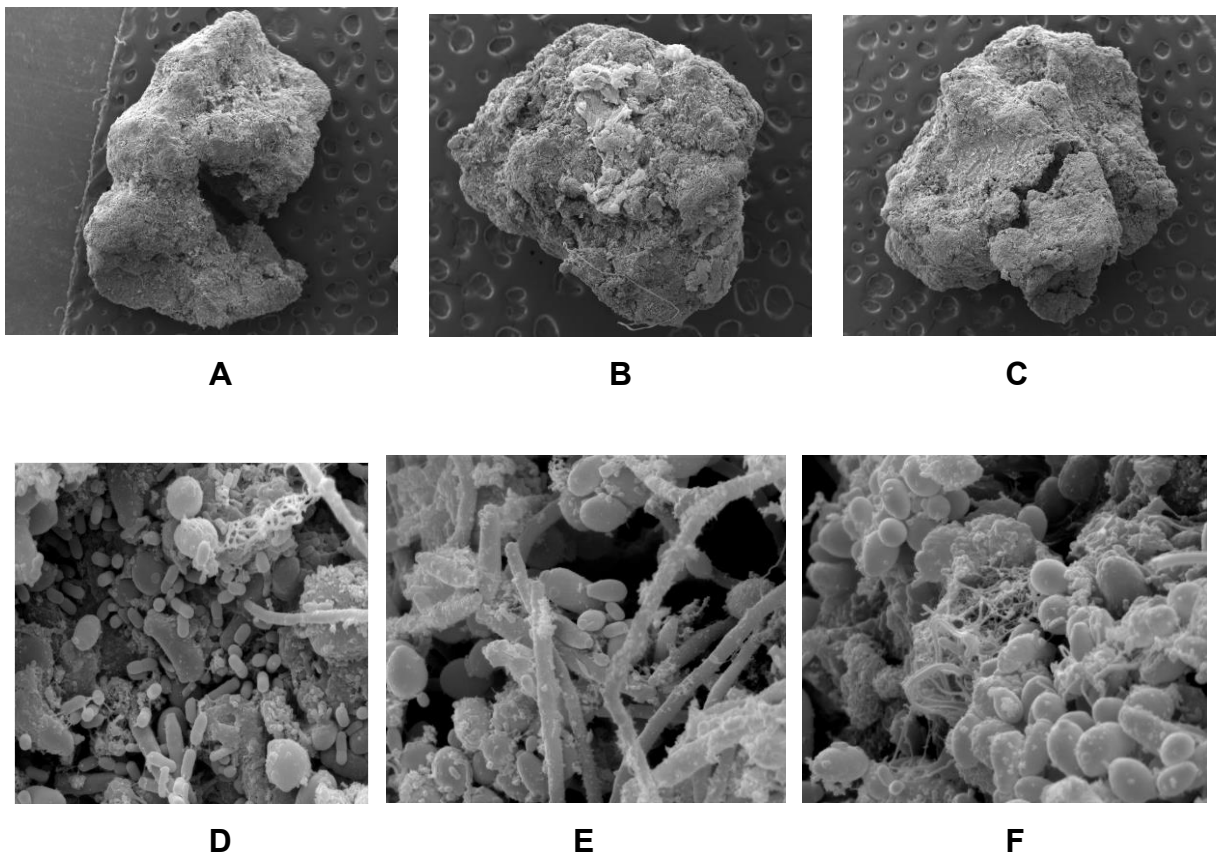
▲ OJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba;

◆ C = kefir fermentado com açúcar mascavo convencional; e

● CJ = kefir fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba.

Magalhães e colaboradores (2010) (formulação, vide Tabela 3) avaliaram grãos de kefir de água incubados por 24 h a 25 °C e também observaram uma complexa e compacta rede de biofilme e microrganismos no exterior dos grãos, enquanto o interior era composto principalmente de material não estruturado. A microbiota na porção externa do grão foi dominada por células de levedura em forma de limão crescendo em associação com bactérias longas e curvas.

**Figura 15** - MEV de grãos de kefir cultivados com açúcar mascavo



**A**, Orgânico (aumento de 60 vezes), **B**, Orgânico e jaboticaba (aumento de 80 vezes), **C**, Convencional (aumento de 60 vezes), **D**, Orgânico (aumento de 8.000 vezes), **E**, Orgânico e jaboticaba. (aumento de 8.000 vezes) e **F**, Convencional (aumento de 8.000 vezes).

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

### 6.1 Conclusões

É possível produzir bebida fermentada por grãos de kefir de água utilizando como substrato açúcar mascavo orgânico ou açúcar mascavo convencional e polpa de jabuticaba.

As bebidas finais tinham característica ácida, comprovadas pela medida de pH, acidez total titulável e presença de ácidos láctico, acético, cítrico e succínico.

Os teores de sólidos solúveis totais e sacarose foram decrescentes, com pontos de mínima de aproximadamente 45 h. Os teores de glicose e frutose foram crescentes, com pontos de máxima de aproximadamente 42 h. Os teores de açúcares totais tiveram uma redução em torno de 50 % ao longo de todo o processo fermentativo.

Em relação à variação no teor de minerais de todas as bebidas durante o processo de fermentação, tiveram os teores aumentados: P, Ca, Mg (nas formulações O e OJ), Na, Cr (nas formulações OJ, C e CJ), e Ni (nas formulações C e CJ); não apresentaram diferenças significativas: K e S; e diminuídos: Cu (na formulação OJ), Fe (nas formulações C e CJ), Zn (nas formulações O e OJ), Mn (nas formulações O e C), e B (nas formulações OJ, C e CJ). Esta variação pode ser devido ao fato dos minerais terem sido assimilados pelos grãos de kefir, no caso de redução na bebida, ou liberados dos mesmos nos casos de seus teores terem aumentado. O uso de açúcar mascavo orgânico resultou numa bebida sem redução do teor de Fe. Em todas as amostras avaliadas, as quantidades de nutrientes em uma porção de 350 mL não ultrapassam as necessidades diárias recomendadas, com exceção do cromo.

Os valores obtidos para as características relacionadas a cores apresentaram tendência de aumento ao longo dos oito tempos avaliados, sendo que no período de 0 a 8 horas de fermentação o aumento foi mais pronunciado para todas as características. Os produtos O e C, sem jabuticaba, apresentaram valores sempre superiores aos produtos com jabuticaba, com exceção da característica  $a^*$ , onde a formulação C apresentou valores mais baixos em praticamente todos os tempos de avaliação, e da  $*L$ , que apresentou maior luminosidade. Portanto, pode-se afirmar que o uso da jabuticaba no atributo visual da cor é desejável, uma vez que resultou

em produto com a cor mais viva, menor luminosidade (perdeu menos cor), mais vermelha e menos amarelada.

Este trabalho fornece uma base para novos desenvolvimentos relacionados ao kefir de água como bebida fermentada funcional e com baixo teor de açúcar, com potencial para substituir o consumo de refrigerantes, ao mesmo tempo em que promove a segurança e soberania alimentar.

## 6.2 Considerações Finais

Sugere-se que estudos adicionais precisam ser realizados para maximizar a produção e também avaliar outros parâmetros importantes, incluindo:

- Análise sensorial;
- Metagenômica;
- Etanol;
- CO<sub>2</sub>;
- Antocianinas;
- MEV com imagens do interior dos grãos; MEV das células presentes após segundo período de fermentação;
- Crescimento de massa;
- Crescimento de proteína;
- Compostos voláteis;
- Explorar outros usos do polissacarídeo formado nos grãos;
- Fermentar grãos somente com jabuticaba, sem açúcar;
- Testar diferentes concentrações de substrato, diferentes açúcares (melado, rapadura, açúcar de coco etc.), diferentes concentrações de grãos, origens de grãos;
- Outras frutas nativas ou resíduos (coprodutos);
- Testar teor de minerais nos grãos;
- Investigar relação da Teoria da Transmutação de Matéria a Baixa Energia com as mudanças no teor de minerais ao longo da fermentação do kefir de água. A tese é que a transmutação de elementos, em particular por reações entre elementos da tabela periódica com menor núcleo e eletrosfera, ocorre regularmente em sistemas biológicos, tanto em microrganismos como em organismos multicelulares, como os seres humanos. Segundo a tese, a transmutação é inerente à biologia: os núcleos de hidrogênio e oxigênio, principalmente, ao adicionar ou subtrair de outros núcleos, são a essência da transmutação.

Alguns exemplos:

$11\text{Na} + 8\text{O} \rightarrow 19\text{K}$ ;  $19\text{K} + 1\text{H} \rightarrow 20\text{Ca}$ ;  $20\text{Ca} - 1\text{H} \rightarrow 19\text{K}$ ;  
 $12\text{Mg} + 8\text{O} \rightarrow 20\text{Ca}$ .

O carbono também pode participar:  $14\text{Si} + 6\text{C} \rightarrow 20\text{Ca}$ .

Esta tese questiona a Lei de conservação de massa estabelecida por Antoine Lavoisier para reações químicas. Foi provado experimentalmente em plantas, bactérias e outros organismos vivos, que alguns elementos são transmutados para outros elementos (BIBERIAN, 2012);

## REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas e Técnicas. **Especialização de cores de acordo com o sistema de notação Munsell** – NBR 12694. Rio de Janeiro, nov. 1992.

ALIEXPRESS. **Fruit Seeds Brazilian Grape Tree Seeds 20pcs Jabuticaba Fruits Planting At Trunk Garden Decoration Plant Edible Free Shipping**. 2017. Disponível em: <[ALSAYADI, M.; JAWFI al Y.; BELARBI, M.; SABRI, F. Antioxidant potency of water kefir. \*\*Journal of Microbiology Biotechnology and Food Sciences\*\*, v.2, n. 6, p. 2444-2447. 2013.](https://pt.aliexpress.com/item/Fruit-Seeds-Brazilian-Grape-Tree-Seeds-20pcs-Jabuticaba-Fruits-Planting-At-Trunk-Garden-Decoration-Plant-Edible/32720674671.html?ws_ab_test=searchweb0_0,searchweb201602_4_10152_10151_10065_10344_10068_10342_10547_10343_10059_10340_10314_10548_10341_10534_100031_10084_10604_10083_10103_10307_10142,searchweb201603_1,ppcSwitch_3&algo_expid=dcc0bab2-03ea-409a-8aee-da21a5bce616-1&algo_pvid=dcc0bab2-03ea-409a-8aee-da21a5bce616&priceBeautifyAB=0>>. Acesso em: 9 Set. 2017.</p>
</div>
<div data-bbox=)

ALSAYADI, M.; JAWFI, Y. A.; BELARBI, M.; SOUALEM-MAMI, Z.; MERZOUK, H.; SARI, D. C.; SABRI, F.; GHALIM, M. Evaluation of anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities of water kefir as probiotic on streptozotocin-induced diabetic wistar rats. **Journal of Diabetes Mellitus**, v. 4, p. 85-95. 2014.

ANFITEATRO, D. N. **Kefir, a probiotic gem cultured with probiotic jewels**. South Australia, Thanmere North Post Office, p. 37. 2000.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of AOAC International**. 19 ed. Gaithersburg: AOAC International. 2012.

APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater**. 22 ed. Washington: APHA. 2012.

APLICAÇÕES do ácido cítrico na indústria de alimentos. **Food Ingredients Brasil**, n. 30, p. 96-103, 2014.

AZEVEDO, V. A. C.; MIYOSHI, A. **Novas utilizações biotecnológicas e terapêuticas das bactérias do ácido láctico**. In: MIR, L. Genômica. São Paulo, SP: Editora Atheneu. 2004. p. 801-818.

BARNARD, A. **The New York Times**. U.S.-Led Forces Said to Have Used White Phosphorus in Syria. 10 jun. 2017. 2017. Disponível em: <<https://www.nytimes.com/2017/06/10/world/middleeast/raqqa-syria-white-phosphorus.html>>. Acesso em: 16 ago. 2017.

BERGMAN, R. S. O.; PEREIRA, M. A.; VEIGA, S. M. O. M.; SCHNEEDORF, J. M.; OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Microbial profile of a kefir sample preparations –

grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1022-1026. 2010.

BETTANI, A. S.; LAGO, C. E.; FARIA, D. A. M.; BORGES, M. T. M. R.; BERNARDI, M. R. V. Avaliação físico-química e sensorial de açúcares orgânicos e convencionais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 16, n.2, p. 155-162. 2014.

BIBERIAN, J. P. Biological transmutations: historical perspective. **Journal Condensed Matter Nuclear Science**, v. 7, p. 11-15. 2012.

BORGUINI, R. G., TORRES, E. A. F. S. Alimentos Orgânicos: Qualidade Nutritiva e Segurança do Alimento. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 13, n. 2, p. 64-75. 2006.

BOURDICHON, F.; CASAREGOLA, S.; FARROKH, C, FRISVAD, J. C.; GERDS, M. L.; HAMMES, W. P.; HARNETT, J.; HUYS, G.; LAULUND, S.; OUWEHAND, A.; POWELL, I. B.; PRAJAPATI, J. B.; SETO, Y.; SCHURE, E. T.; A. V.; VANKERCKHOVEN, V.; ZGODA, A.; TUIJTELAARS, S.; HANSEN, E. B. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, p. 87–97, 2012.

BOURRIE, B. C. T.; WILLING, B. P.; COTTER, P. D. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage Kefir. **Frontiers in Microbiology**, v. 7: 647, 2016.

BRASIL. **Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. 2003. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/2003/L10.831.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.831.htm)>. Acesso em: 15 fev. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46 de 23/10/2007. Dispõe sobre a Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal, adotando Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. n. 205, Seção 1, p. 4. Brasília. 2007. Disponível em: <[http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados\\_2009.pdf](http://www.posalim.ufpr.br/ArqDisponiv/leitesfermentados_2009.pdf)>. Acesso em: 02 jan. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes**. Brasília. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed. Brasília : Ministério da Saúde. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 241**. 2018a. Publicado em 26 de julho de 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Consulta Pública Kombucha**. 2018b. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/aceso-a-informacao/participacao-social/consultas-publicas/consulta-publica-kombucha>>. Acesso em: 31dez. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Regulamento Técnico do Açúcar.** 2018c Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/normativos-dipov/rt-acucar-publicado-no-dou-in-47-2018.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Produção de Açúcar por Tipo - Safra 2018/19.** 2019. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/arquivos-producao/008PRODUODEACARPORTIPOSASFRA20181919022019.pdf>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

BRASÍLIA. Companhia Nacional de Abastecimento. **Perfil do setor do açúcar e do álcool no Brasil.** Responsáveis técnicos Ângelo Bressan Filho e Roberto Alves de Andrade, v. 5. 2013.

CAVALCANTI, R. N.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. Food Science & Technonology. Supercritical fluid extraction with a modifier of antioxidant compounds from jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) byproducts: economic viability. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1672 – 1678. 2011.

CD. CÂMARA DOS DEPUTADOS. **Uma comparação entre a agricultura convencional e a orgânica.** 05/09/2009. 2009. Disponível em <<http://www2.camara.leg.br/a-camara/programas-institucionais/inclusao-social-e-equidade/ecocamara/o-ecocamara/noticias/uma-comparacao-entre-a-agricultura-convencional-e>>. Acesso em: 14 mar. 2016.

CHEN, L.; HONG, F.; YANG, X.X.; HAN, S.F. Biotransformation of wheat straw to bacterial cellulose and its mechanism. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 464-468. 2013.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 492-501. 2008.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Safra Brasileira de Cana-de-Açúcar.** Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1297-1303. 2004.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MONCHETTI, G.; SETTANI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **Food Science and Technology**, v. 66, p. 572-581. 2016.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Probióticos e prebióticos na saúde da criança**. In: Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Rio de Janeiro: ed. Rubio. 2010.

DA SILVA-MAIA, J. K.; BATISTA, A. G.; CORREA, L. C.; LIMA, G. C.; BOGUSZ JUNIOR, S.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R. Aqueous extract of berry (*Plinia jaborcaba*) by product modulates gut microbiota and maintains the balance on antioxidant defense system in rats. **Journal of Food Biochemistry**. 2018. e12705. Disponível em <https://doi.org/10.1111/jfbc.12705>.

DE VUYST, L.; DE VIN, F.; VANINGELGEM, F.; DEGEEST, B. Recent developments in the biosynthesis and application of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 687–707. 2001.

DIAS, V. R.; BRAZIL, J. M.; ALMEIDA, A. R.; SILVA, C. S.; MILAGRES, M. P. Avaliação da percepção sensorial ao gosto doce em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 2. **Revista Rene**. v. 17, n. 4, p. 483-489, 2016.

DIAS, D. R.; SILVA, M. S.; DE SOUZA, A. C.; GUEDES, K. T. M.; RIBEIRO, F. S. R.; SCHWAN, R. F. Vinegar production from jaboticaba (*Myrciaria jaborcaba*) fruit using immobilized acetic acid bacteria. **Food Technology and Biotechnology**, v. 54, n. 3, p. 351-359, 2016.

DOBSON, A.; O'SULLIVAN, O.; COTTER, P. D.; ROSS, P.; HILL, C. High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain. **FEMS Microbiology Letters**, v. 320, p. 56–62, 2011.

DODDIGARLA, Z.; AHMAD, J.; PARWEZ, I. Effect of chromium picolinate and melatonin either in single or in a combination in high carbohydrate diet-fed male Wistar rats. **BioFactors**, v. 42, n. 1, p. 106 – 114. 2016.

DORON S.; SNYDMAN D. R. Risk and safety of probiotics. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**. v. 60 s. 2, p. S129–S134, 2015.

ENIKEEV, R. Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of Kefir production. **Food Chemistry**, v. 134, n. 4, p. 2437-2441. 2012.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United States: World Health Organization. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. FAO Food and Nutrition, Paper 85. 2006.

FEDERHEN, B. C.; RUSCHEL, C. K. Demonstração da produção de L-Asparaginase a partir do kefir de água e leite. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 23, p. 43-50. 2014.

FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. On species descriptions based on a single strain: proposal to introduce the status *species proponenda* (sp. pr.). **Microbiology**, v. 57, p. 2185-2187. 2007

FERNANDES, M.; SANCHES, F.L.; RODRIGUES, D.; HANDA, C.; GUELFY, M.; GARCIA, S.; IDA E. I. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food Chemistry**. n. 229, p. 373–380, 2017.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, V. T.; RAKSHIT, S. K.; SOCCOL, C. R., C. R. 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. 2016.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. M.; SOCCOL, V. T.; RAKSHIT, S. K.; PAGNONCELLI, M. G. B.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review, **Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95. 2017.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed. 2013.

FRANZETTI, L., GALLI, P., PAGANI, M. A., NONI del. Microbiological and chemical investigations on sugar kefir drink. **Annali Di Microbiologia Ed Enzimologia**. 1998.

GALLI, A.; FIORI, E.; FRANZETTI, E.; PAGANI, M.; OTTOGALLI, G. Composizione microbiologica e chimica dei granuli di Kefir “difrutta.” **Annals of Microbiologic Enzimology**, v. 45, p. 85 – 95. 1995.

GAO, J.; GU, F.; HE, J.; XIAO, J., CHEN, Q., RUAN, H., HE, G. Metagenome analysis of bacterial diversity in Tibetan kefir grains. **European Food Research Technology**, v. 236, n. 3, p. 549-556. 2013.

GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; MILANOVIĆ, V.; AQUILANTI, L.; de FILIPPIS, F.; STELLATO, G. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**. v.49, p. 123-133. 2015.

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

GENEROSO, W. C.; BORGES, M. T. M. R.; CECCATOANTONINI, S. R.; MARINO, A. F.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Avaliação microbiológica e físico-química de açúcares mascavo comerciais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 2, p. 259-268. 2009.

GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **FEMS Microbial Letters**, v. 5, n.1, p. 31-36, 2001.

GOMES, R.J. **Produção simultânea de celulose e ácido acético, por bactérias de vinagres, a partir de melão de soja**. 2017.107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2017.

GOMES, M. R.; ROGEROI, M. M.; TIRAPEGUI, J. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina Esportiva**, v.11, n..5, p. 262-266. 2005.

GU, J.; CATCHMARK, J. M. Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 2, p. 547-557. 2012.

GUERGOLETTO, K.B.; MAGNANI, M.; SAN MARTIN, J.; ANDRADE, C.G.T.J.; GARCIA, S. SURVIVAL OF *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 11(2):415-421, 2010.

GUERGOLETTO, K.B.; MAURO. C.S.I.; GARCIA, S.; Juçara (*Euterpe edulis*) pulp as a substrate for probiotic bacteria fermentation: Optimisation process and antioxidant activity. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, 29: 949-959, 2017.

GULITZ A, STADIE J, WENNING M, EHRMANN MA, VOGEL RF. The microbial diversity of water kefir. International. **Journal of Food Microbiology**, v. 151, p. 284–288. 2011.

GULITZ, A.; STADIE, J.; EHRMANN, M. A.; LUDWIG, W.; VOGEL, R.F. Comparative phylobiomic analysis of the bacterial community of water kefir by 16S rRNA gene amplicon sequencing and ARDRA analysis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1082–1091. 2013.

HARTA, O.; ICONOMOPOULOU, M.; BEKATOROU, A.; NIGAM, P., KONTOMINAS, M.; KOUTINAS, A. A. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. **Food Chemistry**, v. 88, p. 237–242. 2004.

HE, G.; LIU, T.; SADIQ, F.A, GU J, ZHANG, G. Insights into the microbial diversity and community dynamics of Chinese traditional fermented foods from using high-throughput sequencing approaches. **Journal Zhejiang University Science B**. v. 18, n.4, p. 289–302. 2017.

HOEHNE, F.C. **Frutas indígenas**. Instituto de Botânica, São Paulo. p. 54-55. 1946.

HORISBERGER, M. Structure of the dextran of the tibi grain. **Carbohydrate Research**, v. 10, n. 3, p. 379-385. 1969.

HUANG, H.; CHEN, G.; DONG, Y.; ZHU, Y.; CHEN, H. Chromium supplementation for adjuvant treatment of type 2 diabetes mellitus: Results from a pooled analysis. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 62, n. 1. 2018 DOI 10.1002/mnfr.201700438.

HUGENHOLTZ, J. Traditional biotechnology for new foods and beverages. **Current opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 155-159. 2013.

INFOMONEY. **Estudo da Embrapa aponta que 80% das pastagens no Brasil estão degradadas.** 29/03/2016. 2016. Disponível em: <http://www.infomoney.com.br/mercados/agro/noticia/4797298/estudo-embrapa-aponta-que-das-pastagens-brasil-estao-degradadas>. Acesso em 29 dez. 2017.

INSTITUTE OF MEDICINE. **Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes.**, Washington, D.C.: National Academic Press 2006.

IPLIK, E.S.; CATMAKAS, T.; CAKMAKOGLU, B. A new target for the treatment of endometrium cancer by succinic acid. **Cellular and Molecular Biology**, v. 64, 1, p. 60-63, 2018.

JANUARIO, J.G.B.; LIMA, T.M.; PORTELLA, D.A.C.; JANUARIO, C.B.; KLOSOSKI, S.J.; PIMENTEL, T.C. Desenvolvimento de Bebidas Kefir: Padronização dos parâmetros de processo. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 7, n. 2, p. 80-95. 2016.

JAYASENA, V.; CAMERON, I. °Brix/acid ratio as a predictor of consumer acceptability of crimson seedless table grapes. **Journal of Food Quality**, v. 31 p. 736–750.2008.

KANDASAMY, S.; VLASOVA, A. N.; FISCHER, D. D.; CHATTHA, K. S.; SHAO, L.; KUMAR, A.; LANGEL, S. N.; RAUF, A.; HUANG, H.; RAJASHEKARA, G.; SAIF, L. J. Unraveling the Differences between Gram-Positive and Gram-Negative Probiotics in Modulating Protective Immunity to Enteric Infections. **Frontiers in Immunology**, 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.00334

KESMEN, Z.; KACMAZ, N. Determination of Lactic Microflora of Kefir Grains and Kefir Beverage by Using Culture-Dependent and Culture-Independent Methods. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 5, p. M276–M283. 2011.

KHATOUNIAN, C. A. **A reconstrução ecológica da agricultura.** Botucatu: Agroecológica. 2001.

KNABBEN, V. M. **Ana Maria Primavesi, histórias de vida e agroecologia.** São Paulo: Expressão Popular, 2016.

KORSAK, N.; TAMINIAU, B.; LECLERCQ, M.; NEZER, C.; CREVECOEUR, S.; FERAUCHE, C. Short communication: evaluation of the microbiota of kefir samples using metagenetic analysis targeting the 16S and 26S ribosomal DNA fragments. **Journal Dairy Science**, v. 98, p. 3684–3689. 2015.

LAMBRECHT, B. N.; HAMMAD, H. The immunology of the allergy epidemic and the hygiene hypothesis. **Nature Immunology**. v. 18, n. 10, p. 1076-1083. 2017.

LAUREYS, D.; DE VUYST, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 80, n. 8, p. 2564. DOI: 10.1128/AEM.033978-13. 2014.

LAUREYS, D., CNOCKAERT, M., DE VUYST, L., VANDAMME, P. *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 Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, p. 719-732, 2017.

LAUREYS, D.; JEAN, A.; DUMONT, J.; DE VUYST, L. Investigation of the instability and low water kefir grain growth during an industrial water kefir fermentation process. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2811-2819. 2017.

LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. **Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices**. New York: Chapman & Hall. 1998.

LEE, H. D., LEE, M. Y., HWANG, Y. S., CHO, Y. H., KIM, H. W., PARK, H. B. Separation and purification of lactic acid from fermentation broths using membrane-integrated separation processes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. v. 56, p. 8301–8310. 2017.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 6th ed. Porto Alegre: Artmed. 2014.

LEWIS, K.; EPSTEIN, S.; D'ONOFRIO, A.; LING, L. L. Uncultured microorganisms as a source of secondary metabolites. **Journal of Antibiotics**, v. 63, n. 8, p. 468–476. 2010.

LI, L.; WIEME, A.; SPITAEELS, F.; BALZARINI, T., NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. *Acetobacter sicerae* sp. nov., isolated from cider and kefir, and identification of species of the genus *Acetobacter* by *dnaK*, *groEL* and *rpoB* sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 64, p. 2407–2415. 2014.

LIMA, A. J. B.; CORRÊA, A. D.; SACZK, A. A.; MARTINS, M. P.; CASTILHO, R. O. Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity in jabuticaba [*Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg]. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 3, p. 877-887. 2011.

LIU, J.; WANG, S.; CHEN, M.; YUEH, S.; LIN, C. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microflora. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 86, p. 2527-2533. 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. v. 1. 4 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. 2002.

LUCHINI, P. D. **Teores de nutrientes minerais e metais pesados em açúcar mascavo produzido por diferentes sistemas orgânicos e convencionais.** Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos. 89 p. 2014.

MACHADO, S. S. **Tecnologia da Fabricação do Açúcar.** IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, p. 56. 2012.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; PIRES, E. A.; SANTOS, F. L. **Mapeamento tecnológico de patentes de kefir. Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 2, p. 86-97, 2012.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock.** 14 ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MAGALHÃES, K. T. **Caracterização microbiológica e química da bebida kefir de leite e açúcar mascavo.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras. 120 p. 2008.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.26, p. 1241–1250. 2010.

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

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause - Alimentos, Nutrição e Dietoterapia.** 12 ed. Rio de Janeiro, RJ: editora Florescer. 2010. 1351p.

MARGARIDO, L. A. C.; RUAS, D. G. G.; LAVORENTI, N. A.; MATSUOKA, S.; BESKOW, P. R.; STOLF, R. Produção orgânica de cana-de-açúcar, Açúcar mascavo, melaço e rapadura: uma experiência. **Extensão Rural e Desenvolvimento Sustentável**, v. 1, n. 4, p. 39-45. 2005.

MARSH, A. J.; O'SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequence-based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. **FEMS Microbiology Letters**, v. 348, p. 79–85. 2013.

MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. **Trends in Food Science & Technology**, v.38, p. 113-124. 2014.

MARTINEZ-TORRES, A.; GUTIÉRREZ-AMBROCIO, S.; HEREDIA-DEL-ORBE, P.; VILLA-TANACA, L.; HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, C. Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 52, p. 559–571. 2017.

MARTINS, A. P. B.; LEVY, R. B.; CLARO M.; R., MOUBARAC, J. C.; MONTEIRO, C. A. Participação crescente de produtos ultraprocessados na dieta brasileira (1987-2009). **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 4, p. 656-665. 2013

MIGUEL, M. G. C.P.; CARDOSO, P. G.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. Profile of microbial communities present in tibi (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1875–1884. 2011.

MINGUETTI, F. F. Dissertação de mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural. **Influência dos sistemas de produção, convencional e orgânico, na qualidade da cana-de-açúcar (*Saccharum spp*) e do açúcar mascavo**. Araras: 2012.

MITCHELL, A. D.; AULETTA, A. E.; CLIVE, D.; KIRBY, P. E.; MOORE, M.; ABE, S.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains, **Mutation Research**, v. 626, p. 26-33. 2007.

MOINAS, M.; HORISBERGER, M.; BAUER, H. The Structural Organization of the Tibi Grain as Revealed by Light, Scanning and Transmission Microscopy. **Archives of Microbiology**, v. 128, p. 157-161. 1980.

MONAR, M.; DÁVALOS, I.; ZAPATA, S.; CAVIEDES, M.; CÁRDENAS, L. R. Caracterización química y microbiológica del kéfir de agua artesanal de origen ecuatoriano. **Avances en Ciencias e Ingenierías**, v. 6, n. 1, p. B60-B66. 2014.

MONTANUCI, F. D. **Bebidas de Kefir com e sem inulina em versões integral e desnatada: elaboração e caracterização química, física, microbiológica e sensorial**. Dissertação. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2010.

MORRIS, M. A.; CLARKE, G. P.; EDWARDS, K. L.; HULME, C.; CADE, J. E. Geography of diet in the UK women's cohort study: a cross-sectional analysis. **Epidemiology Open Journal**, v. 1, n. 1, p. 20-32. 2016.

MOTTA, A. S.; GOMES, M. S. M. Technological and functional properties of lactic acid bacteria: the importance of these microorganisms for food. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 3, p. 172-184, 2015.

NALBANTOGLU, U.; CAKAR, A.; DOGAN, H.; ABACI, N.; USTEK, D.; SAYOOD, K. Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 41, p. 42-51. 2014.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/212935>> Acesso em: 4 jul. 2017.

NEVE, H.; HELLER, K. J.; The micro flora of water kefir: a glance by scanning electron microscopy. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, v.54, p.337-349. 2002.

NEVES, N. A. **Compostos fitoquímicos e bioativos em diferentes espécies, em licor e fermentado de jaboticaba (*Plinia jaboticada* (DC) Berg)**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2016.

ORMOND, J. G.; PAULA, S.; FAVARETO FILHO, P.; ROCHA, L. T. **Agricultura Orgânica: Quando o Passado é Futuro**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 15, p. 3-34. 2002.

PAIVA, I. M.; STEINBERG, R. S.; LULA, I. S.; SOUZA-FAGUNDES, E. M.; MENDES, T. O.; Bell, M. J. V.; NICOLI, J.R.; NUNES, A. C.; Neumann, E. *Lactobacillus kefirifaciens* and *Lactobacillus satsumensis* isolated from Brazilian kefir grains produce alpha-glucans that are potentially suitable for food applications. **Food Science and Technology**, v.72, p. 390-398. 2016.

PAULI, E. D.; CRISTIANO, V.; NIXDORF, S. L. Método para determinação de Carboidratos empregado na triagem de adulterações do café. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 689-694. 2011.

PENTEADO, S. R. **Introdução à agricultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil. 2003.

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**, v. 5, p. 223-238. 1989.

PIDOUX, M.; PILET, M. F.; RIPOCHE, V. Growth performances of *Lactobacillus hilgardii* immobilized in dextran gel and in continuous fermentation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 393-398. 1992.

PLETSCH, K.; RAAB, F. Taste and flavour modulation with organic acids in sugar confectionery. **Facts**. 2019. Disponível em: <[https://www.jungbunzlauer.com/fileadmin/content/\\_PDF/PRINT\\_PROJECTS/Article\\_facts/JBL\\_AR\\_Taste\\_and\\_flavour\\_modulation\\_with\\_organic\\_acids\\_in\\_sugar\\_confectionery\\_2018-028.pdf](https://www.jungbunzlauer.com/fileadmin/content/_PDF/PRINT_PROJECTS/Article_facts/JBL_AR_Taste_and_flavour_modulation_with_organic_acids_in_sugar_confectionery_2018-028.pdf)>. Acesso em: 08 mar., 2019.

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

PUTRA, M.D., ABASAEED, A.E., AL-ZAHRANI, S.M.; GAILY, M. H.; SULIEMANM, A. K.; ZEINELABDEENH, M. A.; ATIYE, H. K. Production of fructose from highly concentrated date extracts using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 3, p. 531–536. 2014

QUEROL, A.; FLEET, G.H. **Yeasts in food and beverages**. Germany: Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2006.

RADKOWSKI M.; ZDRODOWSKA, B.; GOMÓŁKA-PAWLICKA, M. Effect of Succinic Acid on Elimination of Salmonella in Chicken Meat. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 9, p. 1491-1495, 2018.

RANDAZZO, W.; CORONA, O.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; GERMANA, M. A.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 40–51. 2016.

RASPOR, P.; GORANOVIČ, D. Biotechnological applications of acetic acid bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101-124. 2008.

REGANOLD, J. P.; WACHTER, J. M. Organic agriculture in the twenty-first century. **Nature plants**, v. 2, 2016.

REN, F.; REILLY, K.; KERRY, J. P.; GAFFNEY, M.; HOSSAIN, M.; RAI, D. K. Higher Antioxidant Activity, Total Flavonols, and Specific Quercetin Glucosides in Two Different Onion (*Allium cepa* L.) Varieties Grown under Organic Production: Results from a 6-Year Field Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 25, p. 5122–5132. 2017.

REUTER, W. M. **Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by HPLC and UV Detection.** Application note. 2017. Disponível em: <[https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-175518APP\\_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299\\_01.pdf](https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-175518APP_Analysis-of-Organic-Acids-in-Fruit-Juices-by-HPLC-and-UV-Detection-012299_01.pdf)>. Acesso em: 12 mai. 2017.

RICARDO, B.; CAMPANILI M. **Almanaque Brasil Socioambiental.** São Paulo: Instituto Socioambiental. 2008.

RUIZ, A.; POBLET, M.; MARS, A.; GUILLAMÓN, J. M. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16 S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. **International Journal of Systematic Evolutionary Food Microbiology**, v. 50, p. 1981-1987. 2000.

SABIR, F.; BEYATLI, Y.; COKMUS, C.; ONAL-DARILMAZ, D. Assessment of Potential Probiotic Properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. Strains Isolated from Kefir. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. M568-M573. 2010.

SANTOS, G. C.; MONTEIRO, M. Sistema orgânico de produção de alimentos. **Alimentos e Nutrição**. v. 15, n. 1, p. 73-86. 2004.

SCHUPHAN, W. Nutritive value of crops as influenced by organic and inorganic fertilizer treatment. **Qualitas Plantarum: plant foods for human nutrition**. v. 23, n. 4, p. 333-358. 1974.

SHI, X.; CHEN, Y.; REN, H.; LIU, D.; ZHAO, T.; ZHAO, N.; YING, H. Economically enhanced succinic acid fermentation from cassava bagasse hydrolysate using *Corynebacterium glutamicum* immobilized in porous polyurethane filler. **Bio Resource Technology**, v. 174, p. 190–197. 2014.

SILVA, P.H.A.; FARIA, F.; TONON, B.; MOTA, S. J. D.; PINTO, V. D. Avaliação da composição química de fermentados alcoólicos de jabuticaba (*Myrciaria jabuticaba*). **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 595-600. 2008.

SILVA, R. de A.; PETTER, C. O.; SCHNEIDER, I. A. Avaliação da perda da coloração artificial de ágatas. REM: **Revista da Escola de Minas**, v. 60, n. 3, p. 477-482. 2007.

SILVA, K. R.; RODRIGUES, S. A.; XAVIER FILHO, L.; LIMA, A. S. Antimicrobial Activity of Broth Fermented with Kefir Grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 2, p. 316–325. 2009.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, Ts.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1–6. 2002.

SINGH; B.; PARWATE, D. V.; SHUKLA, S. K. Radiosterilization of Fluoroquinolones and Cephalosporins: Assessment of Radiation Damage on Antibiotics by Changes in Optical Property and Colorimetric Parameters. **American Association of Pharmaceutical Scientists Technology**, v. 10, n. 1, p. 34-43. 2009.

SNYDMAN R. D. The Safety of Probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 2, p. S104–S111. 2008.

STADIE, J.; GULITZ, A.; EHRMANN, M. A.; VOGEL, R. F. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. **Food Microbiology**, v. 35, p. 92-98. 2013.

STANTON, C.; ROSS, R. P.; FTZGERALD, G. F.; SINDEREN, D. V. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 198-203. 2005.

STULP, M.; GNAS, B. B. B.; CLEMENTE, E. Conservation and nutritional quality of blueberry treated with eatable covering. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 4, p. 361-366, 2014.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** –. Campinas: NEPA-UNICAMP. 2011.

TOLEDO, M. V.; BARRERA-BASSOLS, N. **A Memória Biocultural: a importância ecológica das sabedorias tradicionais**. São Paulo: Expressão Popular. 2015.

TOMAÉL, M. I.; ALCARÁ, A. R.; TANZAWA, E. C. L.; CHIARA, di I. G.; UCHOA JÚNIOR, P. P. M.; HECKLER, V. C.; RODRIGUES, J. L.; SILVA, G. A. Redes sociais em alimentos funcionais no Paraná: relato de pesquisa. **Revista Eletrônica de Biblioteconomia e Ciência da Informação**, n. 24, p. 111-138. 2007.

TOMIČIĆ, Z.; ZUPAN, J.; MATOS, T.; RASPOR, P. Probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* (nom. nud.) modulates adhesive properties of *Candida glabrata*. **Medical Mycology**, v. 54, n. 8, p. 835–845. 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Probiotic Market by Application (Food and Beverages, Dietary Supplements, Animal Feed) by End Users (Human Probiotics, Animal Probiotics)-Global Industry Analysis, Size, Share, Growth and Forecast 2014 - 2020**. Maio. 2015. Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>>. Acesso em: 2 ago. 2017.

VANDENPLAS, Y; HUYS, G; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n.1, p. 6-21, 2015.

VENTURINI FILHO, W.G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia**, vol. 1, Editora Blucher. 2010.

VKM. Assessment of dietary intake of chromium in relation to tolerable upper intake. Opinion of the Panel on Nutrition, Dietetic Products, Novel Food and Allergy of the Norwegian Scientific Committee for Food and Environment. **VKM Report**. ISBN: 978-82-8259-303-8, Oslo, Noruega. 2018. Disponível em: <[https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2494759/L%25C3%25B8vik\\_2018\\_Ass.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://brage.bibsys.no/xmlui/bitstream/handle/11250/2494759/L%25C3%25B8vik_2018_Ass.pdf?sequence=2&isAllowed=y)>. Acesso em: 8 maio. 2018.

VUYST, L.; CNOCKAERT, M.; LAUREYS, D.; VANDAMME, P. *Bifidobacterium aquikefiri* sp. nov., isolated from water kefir, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v, 66, n.3, p. 1281-1286. 2016.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEIBNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water kefir. **Food Microbiology**, v. 27, p. 672-678. 2010.

WANG, S. Y.; CHEN, H. C.; LIU, J. R.; LIN, Y. C.; CHEN, M. J. Identification of Yeasts and Evaluation of their Distribution in Taiwanese Kefir and Viili Starters. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 10, p. 3798-3805. 2008.

WHO. World Health Organization. Guideline: **Sugars intake for adults and children**. Geneva. 2015. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149782/1/9789241549028\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/149782/1/9789241549028_eng.pdf). Acesso em: 22 jan. 2017.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, R. T.; BRITZ T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 57, p. 33-37. 2004.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, R. T.; BRITZ T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 4, p. 383-389. 2005.

WORTHINGTON V. Nutritional Quality of Organic Versus Conventional Fruits, Vegetables, and Grains. **Journal of Alternative Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p. 161-173. 2004.

YETIMAN, A. E.; KESMEN, Z. Identification of acetic acid bacteria in traditionally produced vinegar and mother of vinegar by using different molecular techniques. **International Journal of Food Microbiology**, v. 204, p. 9-16. 2015.

YUKSEKDAG, Z. N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 6, p. 663-667. 2004.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO JR.; SANDES, S. H. C.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76. 2015.

ZHANG, Q.; XIAO, X.; ZHENG, J.; LI, M.; YU, M.; PING, F.; WANG, Z.; QI, C.; WANG, T.; WANG, X. Maternal chromium restriction modulates miRNA profiles related to lipid metabolism disorder in mice offspring. **Experimental Biology and Medicine**, v. 242, n. 14, p. 1444-1452, 2017.

ZHAO, N.; ZHANG, C. C.; YANG, Q.; GUO, Z.; YANG, B.; LU, W. W.; LI, D.; TIAN, F.; LIU, X.; ZHANG, H.; CHEN, W. Selection of taste markers related to lactic acid bacteria microflora metabolism for Chinese traditional Paocai: a gas chromatography-mass spectrometry - based metabolomics approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 2415-2422, 2016.

**ANEXOS**

**Anexo A** – Composição química e pH da água mineral fluoretada utilizada no experimento.

Cálcio (mg.L <sup>-1</sup> )	11,72
Nitrato (mg.L <sup>-1</sup> )	11,64
Bicarbonato (mg.L <sup>-1</sup> )	11,55
Cloreto (mg.L <sup>-1</sup> )	9,87
Magnésio (mg.L <sup>-1</sup> )	6,804
Sódio (mg.L <sup>-1</sup> )	5,918
Potásio (mg.L <sup>-1</sup> )	0,375
Bário (mg.L <sup>-1</sup> )	0,101
Estrôncio (mg.L <sup>-1</sup> )	0,074
Brometo (mg.L <sup>-1</sup> )	0,07
Sulfato (mg.L <sup>-1</sup> )	0,07
Fluoreto (mg.L <sup>-1</sup> )	0,01
pH a 25 °C	5,36

**Fonte:** DaFonte (2017).

**Anexo B** - Exercício de rastreabilidade: açúcar mascavo orgânico.

Lote: 37/2015.

Cidade: Lucélia – SP, BR.

Propriedade: Sítio São José.

Certificados: KOSHER, ECOSSOCIAL, NOP, EEC, HACCP, BIOSUISSE.

Certificadora: ECOCERT, BCS ökogantie.

Quantidade produzida: 19.050 kg.

- Cultivar: Rb-937570-RB-867515.
- Pol: 87,81 %;
- Pureza: 88,52 %;

Dados analíticos de controle de qualidade:

- Sólidos insolúveis: 0,002 g/100g;
- Umidade relativa: 0,79 %;
- °Brix: 99,20 %;
- Temperatura no secador: 111 °C;
- pH: 6,06;

**Fonte:** Planeta Verde (2017).

**Anexo C - Exercício de rastreabilidade: açúcar mascavo convencional.**

Lote: 09/2015

Cidade: Lucélia – SP, BR.

Propriedade: Fazenda Bem Ti Vi.

Certificados: HACCP.

Certificadora: BCS ökogantie.

Quantidade produzida: 20.025 kg.

Cultivar: RB-867515.

Dados analíticos de controle de qualidade:

- Sólidos insolúveis: 0,002 g/100g;
- Umidade relativa: 0,73 %;
- °Brix: 98,43 %;
- Pol: 88,15 %;
- Pureza: 89,55 %;
- Temperatura no secador: 122 °C;
- pH: 6,18;

**Fonte:** Planeta Verde (2017).

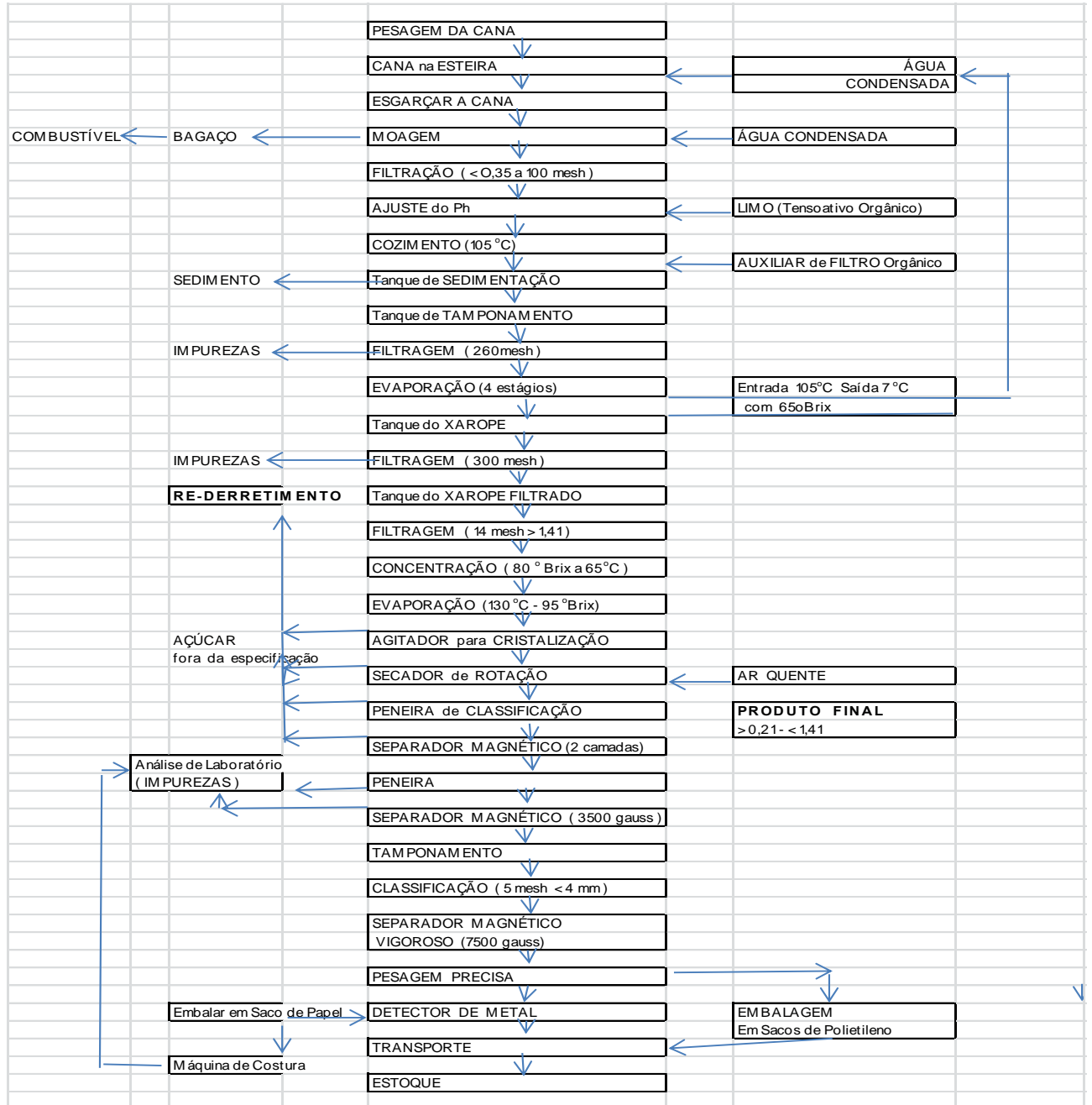
**Anexo D - Comparação dos açúcares utilizados.**

	Temperatura Secador (°C)	POLARIZAÇÃO			pH	Sólidos Insolúveis	Umidade Média
		°BRIX	Pol	Pur			
<b>ORGÂNICO</b>	111	99,20	87,81	88,52	6,06	0,002	0,79
<b>CONVENCIONAL</b>	122	98,43	88,15	89,55	6,18	0,002	0,73

**Fonte:** DeMarchi.

Anexo E – Controle de Qualidade.

Fluxograma de produção de Açúcar Mascavo



Fonte: Planeta Verde (2017).

## Anexo F - Ficha técnica da polpa de jabuticaba.

	FICHA TÉCNICA DE PRODUTO	Código
		DMFT-P40 01
TÍTULO:	POLPA INDUSTRIAL DE JABUTICABA CONGELADA	

### 1. DESCRIÇÃO

Polpa de jabuticaba congelada, obtida a partir de matéria-prima selecionada.

- **Ingredientes:** Jabuticaba

### 2. ESPECIFICAÇÕES

- **Sensoriais:**

Parâmetros	Especificações
Cor	Arroxeadado, característico
Odor	Característico, livre de odores estranhos.
Sabor	Característico, sem sabores estranhos.
Aspecto	Congelado. Isento de impurezas, insetos e materiais estranhos contaminantes ou tóxicos à saúde.

- **Físico-Químicos:**

Parâmetros de liberação	Especificações	CA	Métodos
°Brix (20°C)	8° – 11°	X	DM IO LB 59 DM IO LB 69
pH	3,0 – 4,0	X	DM IO LB 03
Acidez (ml NaOH 0,1N / 10g)	13 – 21	X	DM IO LB 04

- **Microbiológicos:**

Parâmetros de liberação	Especificações	CA	Métodos
Coliformes termotolerantes (45°C)	< 10 UFC/g	X	DM IO LB 30
Salmonella sp	Ausência/25g	X	DM IO LB 47

\* CA: Certificado de análise.

RDC 12 de 2001 (Item 1C)

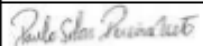

### 3. EMBALAGEM

CÓDIGOS INTERNOS	EMBALAGEM
101176071	12 kg – Sacos de polietileno com blocos de 12 kg em embalagem individual ou em sacos de rafia com até 3 blocos

### 4. ROTULAGEM

No rótulo do produto deverão constar as seguintes informações:

Nome do produto; dados do fabricante (nome, endereço, CNPJ, telefone); nº lote; validade; peso líquido; ingredientes; condições de armazenamento.

Responsáveis:	Rubricas:	Data aprovação	07/10/2015
Elaboração:	Paulo Silas Pereira Neto 	Versão	3
Aprovação:	Rachel De Marchi R. Pereira 	Versão Anterior	02/10/2014

<b>TÍTULO:</b>	<b>POLPA INDUSTRIAL DE JABUTICABA CONGELADA</b>	<b>Página 2/3</b>	<b>Código DMFT-P40 01</b>
----------------	---	-----------------------	-------------------------------

#### 5. TRANSPORTE

Deverá ser transportado em caminhão refrigerado, fechado, ao abrigo de chuva e poeira, protegido de forma adequada que garanta a integridade do produto e sem a presença de outros materiais que possam contaminá-lo com substâncias estranhas. Em nenhum momento durante a distribuição a temperatura deve ser maior que -15°C (Portaria CVS 15 de 07/11/1991).

#### 6. ARMAZENAGEM

Deve ser armazenado em embalagem fechada, em câmara fria com temperatura ideal controlada a -18°C (-16°C a -20°C) em local livre de sujidades, protegido da luz e do ataque de insetos e roedores.

#### 7. PRAZO DE VALIDADE

2 anos, mantidas as condições de armazenagem.

#### 8. INFORMAÇÃO NUTRICIONAL

**Informação Nutricional: Porção de 100g;** Valor energético 58 kcal = 243 kJ (3%VD\*); Carboidratos 15g (5%VD\*); Proteínas 0,6g (1%VD\*); Fibra alimentar 2,3g (9%VD\*).

\*Não contém quantidade significativa de Gorduras totais, Gorduras saturadas, Gorduras trans e Sódio\*.

\* Valores Diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades.

#### 9. REGISTRO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO

Este produto encontra-se registrado sob nº SP – 05642 00018-3.

#### 10. REGISTRO NO MINISTÉRIO DA SAÚDE

Esse produto é isento de registro conforme resolução RDC nº 278 de 22/09/2005, e complementada segundo RDC nº 27 de 06 de Agosto de 2010, da agência Nacional de Vigilância Sanitária.

**Fonte:** DeMarchi.

## Anexo G – Ficha de controle de qualidade da polpa de jabuticaba.



### CONTROLE DE QUALIDADE

CERTIFICADO DE ANALISE

LABORATÓRIO FÍSICO-QUÍMICO E MICROBIOLÓGICO

**PRODUTO: POLPA INDUSTRIAL DE JABUTICABA CONGELADA**

**DATA DE FABRICAÇÃO: 13/10/15**

**LOTE: 06.130-061**

#### CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

BRIX (°)	: 8,6
pH	: 3,04
ACIDEZ TITULÁVEL (ml NaOH 0,1N/10g )	: 14,1
ACIDEZ TITULÁVEL (% ácido cítrico)	: 0,90
DENSIDADE(g/ml)	: 1,035
VISCOSIDADE (cP)	: n/a
CONSISTÊNCIA (cm/seg)	: n/a
SÓLIDOS TOTAIS (%p/p)	: n/a
NITROGÊNIO AMINICO ( mg%)	: n/a
ÁCIDO ASCORBICO (vitamina C) (mg%)	: n/a

#### CARACTERÍSTICAS ORGANOLEPTICAS:

COR	: Característica.
ODOR	: Característico.
SABOR	: Característico.
ASPECTO	: Característico

#### CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Contagem Padrão em Placas	< 10 UFC/g
Bolores e Leveduras	< 10 UFC/g
Coliformes Totais (35°C)	< 10 UFC/g
Coliformes Termotolerantes (45°)	< 10 UFC/g
E. Coli	Ausente
Salmonella sp, 25g	Ausente

#### EMBALAGEM

EMBALAGEM	: Sacos plásticos de 12 kg.
ARMAZENAGEM	: Paletizado em câmara fria com temperatura -18°C.
SHELF LIFE	: 24 meses, se mantido às mesmas condições de armazenagem.

OB S: Os valores relatados tratam-se de uma média dos valores obtidos durante a produção desse lote.  
n/a: não aplicável para este produto.

Data:	Laudô emitido eletronicamente
Para:	Emitente: Sidineia Ap. Castelli

**Responsável Técnica**  
**Rachel De Marchi R. Pereira**

De Marchi Indústria e Comércio de Frutas Ltda  
Rua Particular De Marchi, 470 - Poste - Jundiaí - SP - Brasil - CEP 13213-241  
Fone: 55 11 4815 8400 / 55 11 2136 8400 - Fax: 55 11 4815 8410 / 55 11 2136 8410  
www.demarchi.com.br

Fonte: DeMarchi.

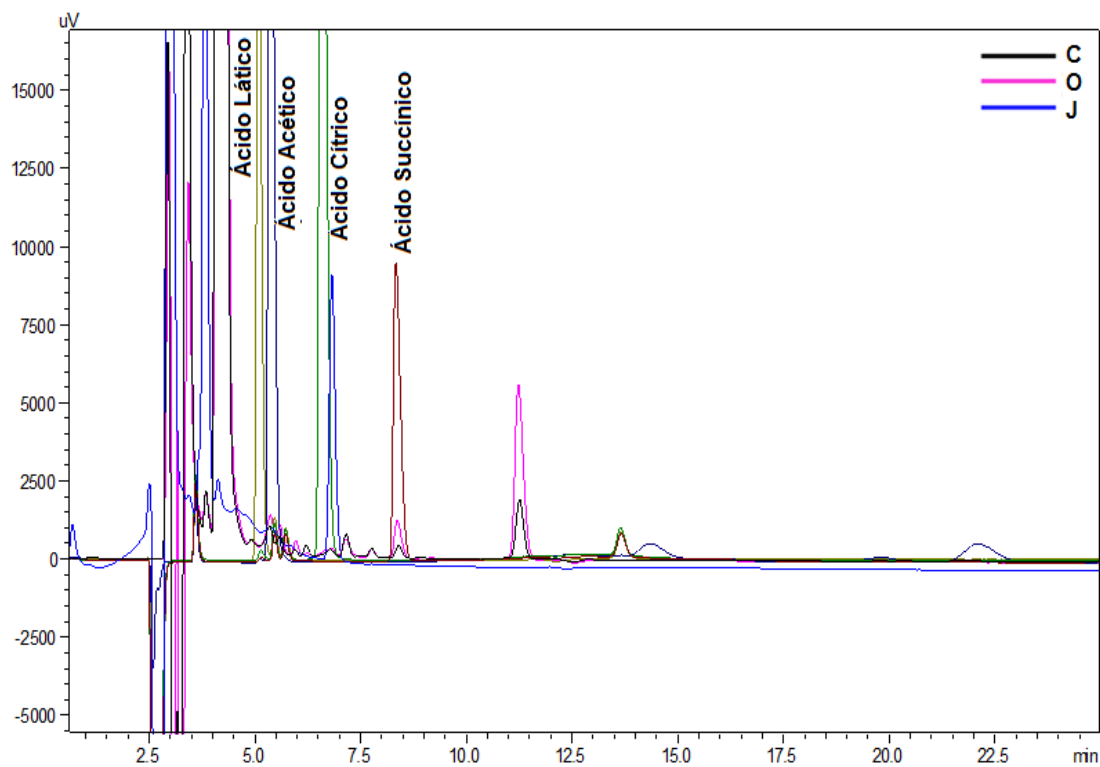
## APÊNDICES

**Apêndice A** - Análise de variância (ANOVA) para as características relacionadas à acidez, avaliadas no kefir de água para as quatro formulações e em oito tempos.

Fonte de Variação	Quadrado Médio <sup>1</sup>					
	pH	Acidez total titulável (mol.100 mL <sup>-1</sup> )	Ácido Láctico (mg. L <sup>-1</sup> )	Ácido Acético (mg. L <sup>-1</sup> )	Ácido cítrico (mg. L <sup>-1</sup> )	Ácido Succínico (mg. L <sup>-1</sup> )
<b>Produto (P)</b>	***	***	***	***	***	***
<b>Tempo (T)</b>	***	***	***	***	***	***
<b>P x T</b>	***	***	***	***	***	***
<b>Resíduo</b>	0,0000	0,00237	0,00147	0,0000	0,001	0,0036
<b>Média</b>	4,05	2,63	1,05	0,0190	0,308	0,300
<b>Coefficiente de Variação (CV) (%)</b>	0,77	6,06	3,65	4,14	4,85	5,51

<sup>1</sup>\*\*\*Significativo a  $p \leq 0,001$ .

**Apêndice B – Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de ácidos orgânicos e matérias-primas.**



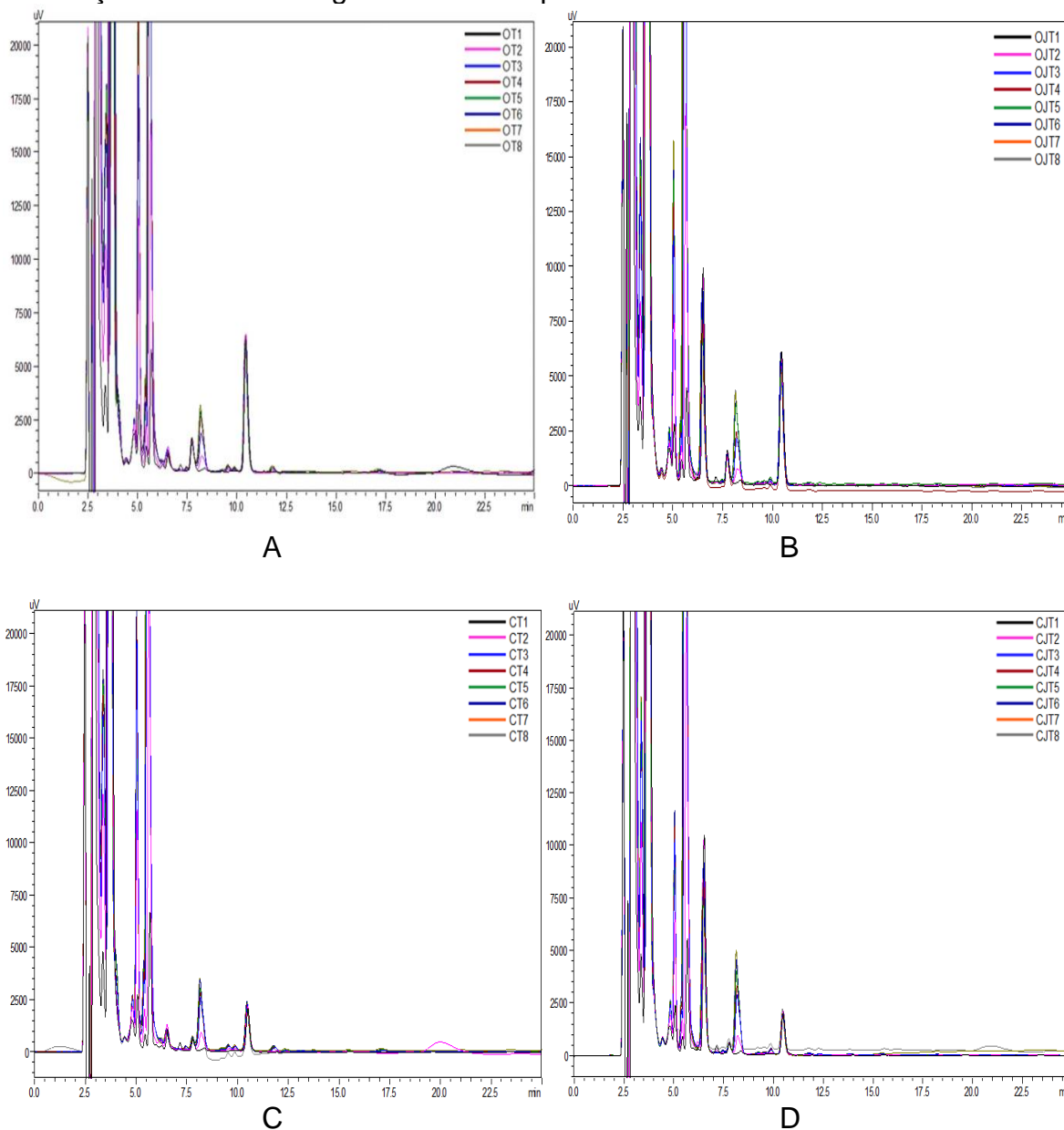
C = Açúcar mascavo convencional; O = Açúcar mascavo orgânico; J = Polpa de jabuticaba.

**Apêndice C** - Médias para características relacionadas à acidez em kefir de água, para quatro formulações<sup>1</sup>, em oito tempos.

Formulação	pH							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
<b>O</b>	5,77 <sup>aA2</sup>	4,45 <sup>aB</sup>	4,10 <sup>aC</sup>	4,04 <sup>bCD</sup>	4,02 <sup>aD</sup>	3,94 <sup>aE</sup>	3,91 <sup>bE</sup>	3,91 <sup>bE</sup>
<b>OJ</b>	4,61 <sup>aA</sup>	4,31 <sup>bB</sup>	4,14 <sup>aC</sup>	4,10 <sup>aCD</sup>	4,07 <sup>aD</sup>	3,97 <sup>aE</sup>	3,99 <sup>aE</sup>	3,98 <sup>aE</sup>
<b>C</b>	5,14 <sup>bA</sup>	4,04 <sup>cB</sup>	3,73 <sup>cC</sup>	3,67 <sup>dDE</sup>	3,68 <sup>cCDE</sup>	3,64 <sup>cE</sup>	3,66 <sup>dDE</sup>	3,71 <sup>dCD</sup>
<b>CJ</b>	4,24 <sup>aA</sup>	4,00 <sup>cB</sup>	3,83 <sup>bC</sup>	3,78 <sup>cCD</sup>	3,79 <sup>bCD</sup>	3,78 <sup>bD</sup>	3,77 <sup>cD</sup>	3,78 <sup>cCD</sup>
Formulação	Acidez Total Titulável (acidez molar.100 mL <sup>-1</sup> )							
<b>O</b>	0,429 <sup>bF</sup>	1,420 <sup>bE</sup>	2,080 <sup>bD</sup>	2,509 <sup>aC</sup>	2,410 <sup>bCD</sup>	3,302 <sup>aB</sup>	4,325 <sup>aA</sup>	4,160 <sup>aA</sup>
<b>OJ</b>	1,486 <sup>aE</sup>	2,047 <sup>aD</sup>	2,377 <sup>abCD</sup>	2,575 <sup>aBC</sup>	2,872 <sup>aB</sup>	2,938 <sup>abB</sup>	4,061 <sup>abA</sup>	3,995 <sup>abA</sup>
<b>C</b>	0,462 <sup>bE</sup>	1,420 <sup>bD</sup>	2,080 <sup>bC</sup>	2,476 <sup>aB</sup>	2,377 <sup>bBC</sup>	2,641 <sup>bB</sup>	4,061 <sup>abA</sup>	3,596 <sup>bA</sup>
<b>CJ</b>	1,387 <sup>aF</sup>	2,179 <sup>aE</sup>	2,410 <sup>aDE</sup>	2,575 <sup>aD</sup>	2,608 <sup>abD</sup>	3,170 <sup>aC</sup>	3,665 <sup>bB</sup>	4,193 <sup>aA</sup>
Formulação	Ácido Láctico (g.L <sup>-1</sup> )							
<b>O</b>	0,193 <sup>aE</sup>	0,956 <sup>aD</sup>	1,402 <sup>aC</sup>	1,640 <sup>aB</sup>	1,749 <sup>aAB</sup>	1,720 <sup>aAB</sup>	1,816 <sup>aA</sup>	1,726 <sup>aAB</sup>
<b>OJ</b>	0,175 <sup>aE</sup>	0,551 <sup>bD</sup>	0,858 <sup>bC</sup>	0,943 <sup>cBC</sup>	1,048 <sup>cAB</sup>	1,078 <sup>aA</sup>	1,123 <sup>aA</sup>	1,130 <sup>aA</sup>
<b>C</b>	0,188 <sup>aD</sup>	0,874 <sup>aC</sup>	1,427 <sup>aB</sup>	1,526 <sup>bAB</sup>	1,516 <sup>bAB</sup>	1,572 <sup>bA</sup>	1,580 <sup>bA</sup>	1,430 <sup>bB</sup>
<b>CJ</b>	0,143 <sup>aC</sup>	0,496 <sup>bB</sup>	0,747 <sup>aA</sup>	0,810 <sup>aA</sup>	0,792 <sup>aA</sup>	0,827 <sup>aA</sup>	0,784 <sup>aA</sup>	0,757 <sup>aA</sup>
Formulação	Ácido Acético (g.L <sup>-1</sup> )							
<b>O</b>	0,0075 <sup>aE</sup>	0,0129 <sup>aD</sup>	0,0212 <sup>aC</sup>	0,0259 <sup>aB</sup>	0,0276 <sup>aAB</sup>	0,0267 <sup>aB</sup>	0,0297 <sup>aA</sup>	0,0281 <sup>aAB</sup>
<b>OJ</b>	0,0073 <sup>aF</sup>	0,0110 <sup>bE</sup>	0,0165 <sup>bD</sup>	0,0185 <sup>bCD</sup>	0,0201 <sup>cBC</sup>	0,0214 <sup>bAB</sup>	0,0216 <sup>bAB</sup>	0,0232 <sup>bA</sup>
<b>C</b>	0,0051 <sup>bF</sup>	0,0107 <sup>bcE</sup>	0,0209 <sup>aD</sup>	0,0237 <sup>aC</sup>	0,0244 <sup>bBC</sup>	0,0267 <sup>aAB</sup>	0,0280 <sup>aA</sup>	0,0253 <sup>bBC</sup>
<b>CJ</b>	0,0054 <sup>bD</sup>	0,0094 <sup>cC</sup>	0,0157 <sup>bB</sup>	0,0178 <sup>bAB</sup>	0,0177 <sup>dAB</sup>	0,0195 <sup>bA</sup>	0,0194 <sup>aA</sup>	0,0191 <sup>aA</sup>
Formulação	Ácido Cítrico (g.L <sup>-1</sup> )							
<b>O</b>	0,0476 <sup>cB</sup>	0,0641 <sup>bA</sup>	0,0498 <sup>bB</sup>	0,0368 <sup>cC</sup>	0,0409 <sup>cC</sup>	0,0396 <sup>cC</sup>	0,0402 <sup>cC</sup>	0,0386 <sup>cC</sup>
<b>OJ</b>	0,6282 <sup>aA</sup>	0,6181 <sup>aAB</sup>	0,5966 <sup>aABC</sup>	0,5463 <sup>aCD</sup>	0,5364 <sup>aCD</sup>	0,5557 <sup>aBCD</sup>	0,5254 <sup>aD</sup>	0,5089 <sup>aD</sup>
<b>C</b>	0,0589 <sup>bB</sup>	0,0697 <sup>bA</sup>	0,0463 <sup>bC</sup>	0,0470 <sup>bC</sup>	0,0480 <sup>bC</sup>	0,0487 <sup>bC</sup>	0,0465 <sup>bC</sup>	0,0478 <sup>bC</sup>
<b>CJ</b>	0,6664 <sup>aA</sup>	0,6468 <sup>aAB</sup>	0,58588 <sup>aBC</sup>	0,5607 <sup>aCD</sup>	0,5376 <sup>aCD</sup>	0,5558 <sup>aCD</sup>	0,5129 <sup>aD</sup>	0,5163 <sup>aD</sup>
Formulação	Ácido Succínico (g.L <sup>-1</sup> )							
<b>O</b>	0,0180 <sup>aE</sup>	0,0814 <sup>bD</sup>	0,1982 <sup>cC</sup>	0,2639 <sup>bB</sup>	0,3048 <sup>cAB</sup>	0,3073 <sup>dAB</sup>	0,3446 <sup>aA</sup>	0,3194 <sup>bA</sup>
<b>OJ</b>	0,0190 <sup>aF</sup>	0,0744 <sup>bE</sup>	0,2461 <sup>bD</sup>	0,3052 <sup>bC</sup>	0,4151 <sup>bB</sup>	0,4510 <sup>bAB</sup>	0,4954 <sup>bAB</sup>	0,5280 <sup>aA</sup>
<b>C</b>	0,0164 <sup>aF</sup>	0,0977 <sup>aE</sup>	0,2781 <sup>bD</sup>	0,3028 <sup>bCD</sup>	0,3240 <sup>cBCD</sup>	0,3723 <sup>cAB</sup>	0,4237 <sup>bA</sup>	0,3577 <sup>bABC</sup>
<b>CJ</b>	0,0165 <sup>aD</sup>	0,1071 <sup>aC</sup>	0,3310 <sup>aB</sup>	0,3971 <sup>aB</sup>	0,4900 <sup>aA</sup>	0,5645 <sup>aA</sup>	0,5915 <sup>aA</sup>	0,5653 <sup>aA</sup>

<sup>1</sup>O = kefir com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir com açúcar mascavo convencional; CJ = kefir com açúcar mascavo convencional e jabuticaba. <sup>2</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de fermentação.

**Apêndice D**– Sobreposição dos cromatogramas dos ácidos orgânicos em quatro formulações<sup>1</sup> de kefir de água em oito tempos.



<sup>1</sup>A: O = Kefir de água fermentado com açúcar mascavo orgânico

B: OJ = Kefir de água fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba

C: C = Kefir de água fermentado com açúcar mascavo convencional,

D: CJ = Kefir de água fermentado com açúcar mascavo convencional e jabuticaba

Tempos de fermentação: T1 = 0 h; T2 = 8 h; T3 = 16 h; T4 = 24 h; T5 = 32 h;

T6 = 40 h; T7 = 48 h; e T8 = 56 h

**Apêndice E** - Análise de variância (ANOVA) para as características relacionadas aos açúcares analisados no kefir de água para quatro formulações em oito tempos.

Fonte de Variação	Quadrado Médio <sup>1</sup>			
	Sólidos Solúveis Totais	Sacarose	Glicose	Frutose
<b>Produto (P)</b>	***	***	***	***
<b>Tempo (T)</b>	***	***	***	***
<b>P x T</b>	***	***	***	***
<b>Resíduo</b>	0,0064	1,06	0,00153	21,3
<b>Média</b>	4,968	23,27	6,229	11,96
<b>CV (%)</b>	1,61	4,42	4,33	5,43

<sup>1</sup>\*\*\*Significativo a  $p \leq 0,001$ .

**Apêndice F** - Médias para características relacionadas aos carboidratos em kefir de água, para quatro formulações<sup>1</sup>, em oito tempos.

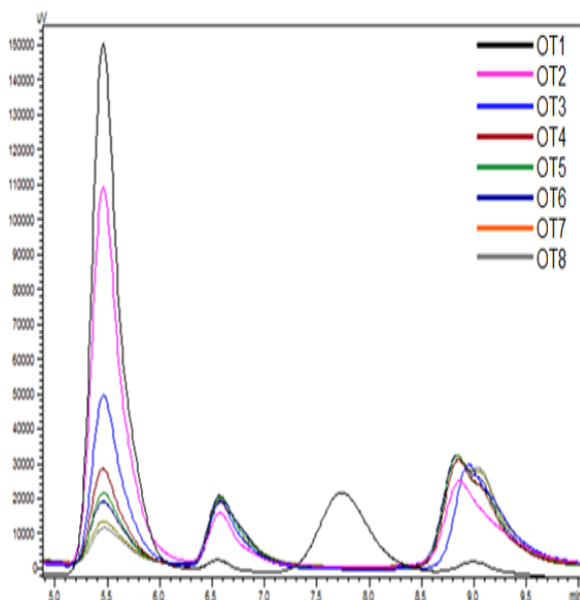
Formulação	<b>Sólidos Solúveis Totais (°Brix)</b>							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
<b>O</b>	6,17 bA2	5,36 bB	4,55 cC	4,44 bD	4,24 cDE	4,19 cE	4,05 cE	4,08 bE
<b>OJ</b>	6,41 aA	5,79 aB	5,29 aC	5,05 aD	4,87 aDE	4,82 aE	4,69 <sup>aEF</sup>	4,57 aF
<b>C</b>	6,10 bA	5,45 bB	4,84 bC	4,66 bCD	4,55 bDE	4,55 bDE	4,35 bE	4,51 aDE
<b>CJ</b>	6,43 aA	5,90 aB	5,29 aC	4,98 aD	4,75 abE	4,71 abE	4,55 abE	4,55 aE
Formulação	<b>Sacarose (g.L<sup>-1</sup>)</b>							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
<b>O</b>	55,29 bA	37,10 bB	17,46 bC	11,30 cD	6,15 cE	6,00 cE	3,81 cE	3,90 bE
<b>OJ</b>	57,87 abA	45,97 aB	28,43 aC	23,73 aD	17,53 aE	16,54 aEF	13,79 aFG	11,39 aG
<b>C</b>	57,41 bA	38,21 bB	19,90 bC	18,18 bC	13,13 bD	10,56 bDE	8,25 bE	9,84 aDE
<b>CJ</b>	60,23 aA	46,07 aB	28,39 aC	24,29 aD	16,66 aE	13,16 bF	11,74 aF	12,46 aF
Formulação	<b>Glicose (g.L<sup>-1</sup>)</b>							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
<b>O</b>	0,967 dC	5,059 bB	6,831 aA	6,857 aA	7,142 bcA	7,055 Ba	6,827 bA	6,766 bA
<b>OJ</b>	2,327 bD	5,15 abC	6,957 aB	7,359 aAB	8,097 aA	8,083 aA	7,658 aAB	7,891 aAB
<b>C</b>	1,651 cD	4,902 bC	5,651 bB	6,021 bAB	6,596 cA	6,569 bA	6,207 bAB	6,747 bA
<b>CJ</b>	3,193 aE	5,693 aD	6,627 aC	6,709 aC	7,78 abAB	8,567 aA	8,016 aAB	7,36 abBC
Formulação	<b>Frutose (g.L<sup>-1</sup>)</b>							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
<b>O</b>	1,237 cD	12,126 aC	14,499 aB	15,061 aAB	15,852 aA	15,595 aAB	15,216 aAB	15,033 aAB
<b>OJ</b>	4,211 bcD	8,560 cC	10,957 bcB	11,662 bcAB	12,666 cA	12,843 cA	12,580 cA	12,867 bA
<b>C</b>	6,061 bE	10,221 bD	12,226 bC	12,782 bBC	14,367 bA	14,319 bA	13,742 bcAB	14,487 aA
<b>CJ</b>	8,724 aD	8,701 bcD	10,901 cC	11,157 cC	12,702 cB	14,201 bA	13,993 bAB	13,205 bAB

<sup>1</sup>O = kefir com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir com açúcar mascavo convencional; CJ = kefir com açúcar mascavo convencional e jabuticaba.

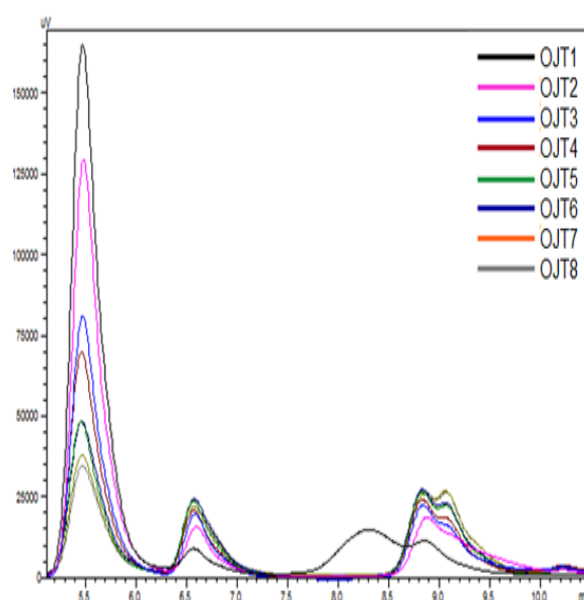
<sup>2</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística

significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de fermentação.

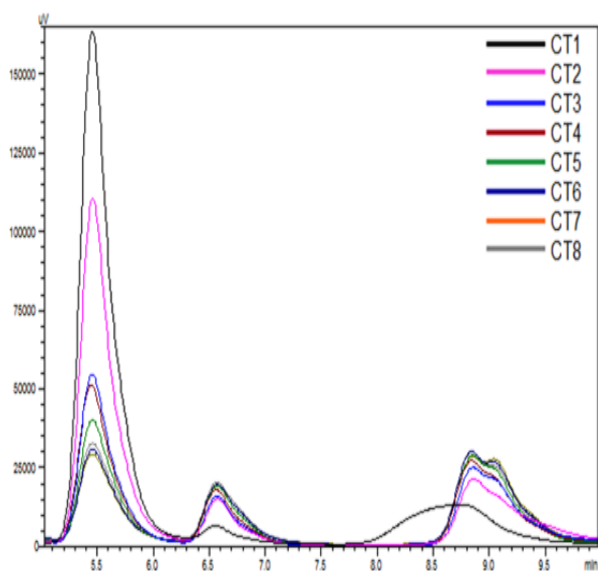
**Apêndice G** - Sobreposição dos cromatogramas dos carboidratos em quatro formulações de kefir de água em oito tempos.



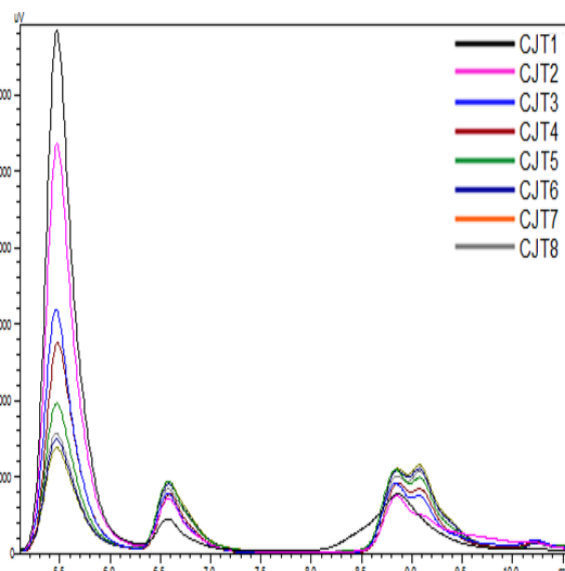
**A**



**B**



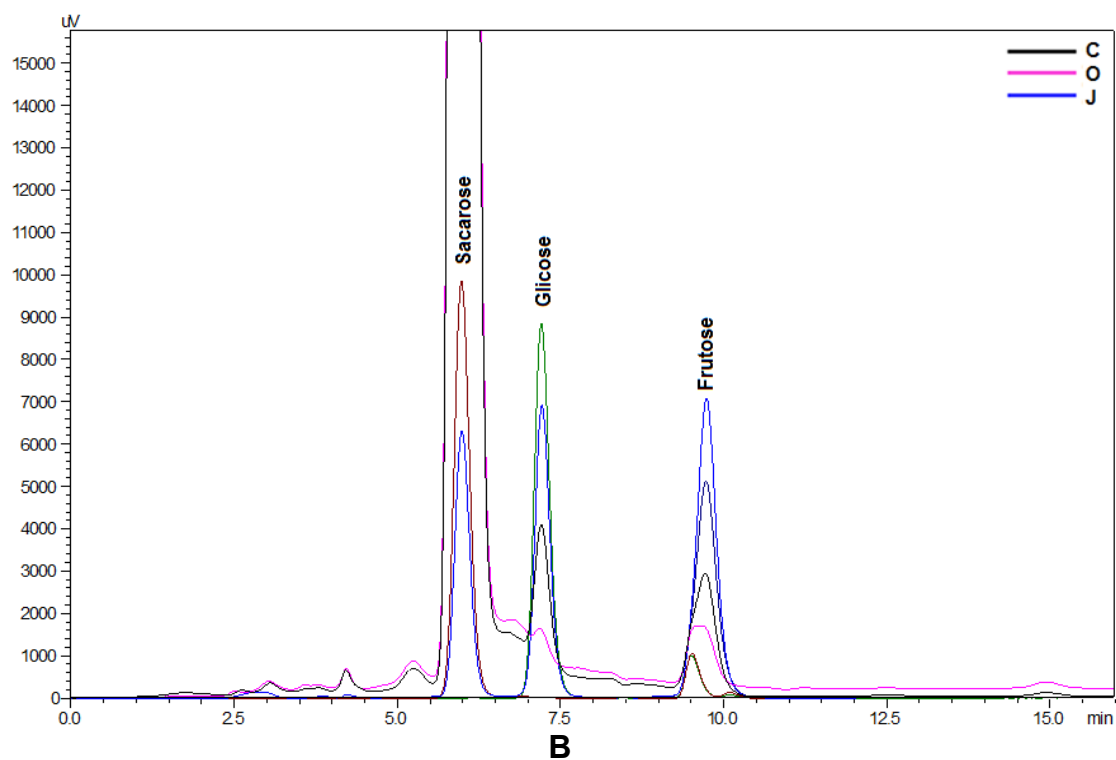
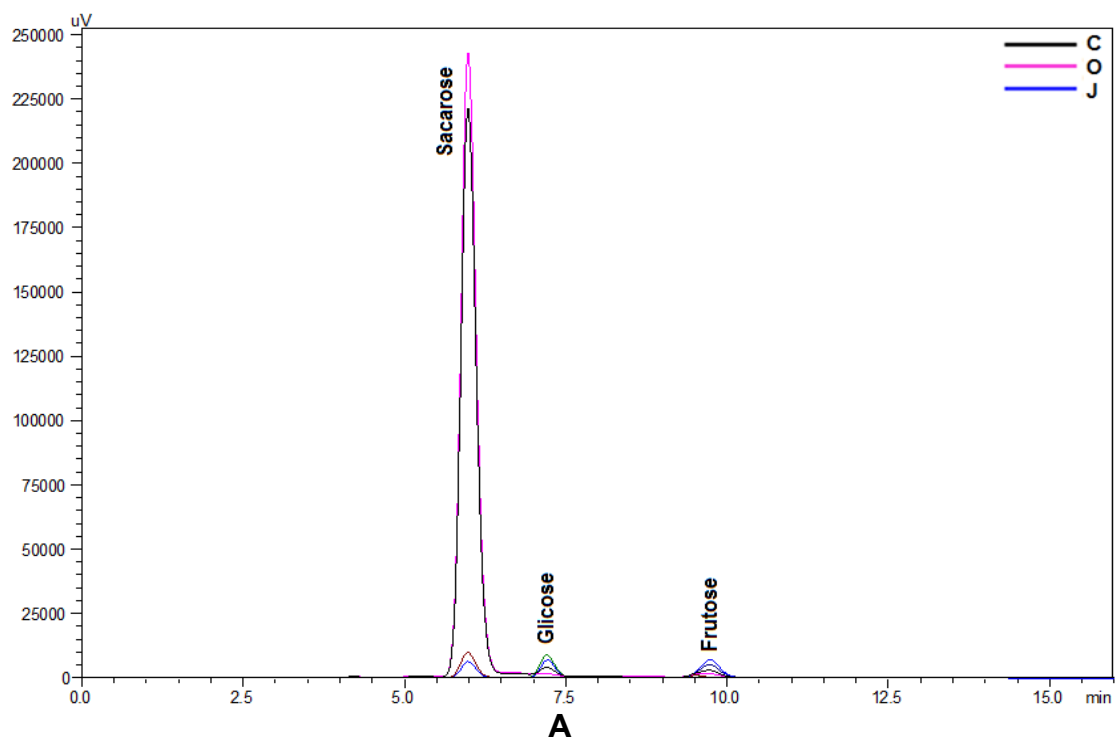
**C**



**D**

<sup>1</sup> A: O= Kefir de água fermentado com açúcar mascavo orgânico,  
 B: OJ = Kefir de água fermentado com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba,  
 C: C= Kefir de água fermentado com açúcar mascavo convencional e;  
 D: CJ = Kefir de água fermentado com açúcar mascavo convencional e jabuticaba.  
 Tempos de fermentação: T1 = 0 h; T2 = 8 h; T3 = 16 h; T4 = 24 h; T5 = 32 h; T6 = 40 h; T7 = 48 h e ; T8 = 56 h

**Apêndice H – Sobreposição dos cromatogramas dos padrões de carboidratos e matérias-primas.**



Com escala maior (A) e; com escala menor (B).

**Apêndice I** - Análise de variância (ANOVA) para açúcares totais no kefir de água, para quatro produtos, em dois tempos.

Fonte de Variação	Quadrado Médio <sup>1</sup>
<b>Produto (P)</b>	***
<b>Tempo (T)</b>	***
<b>P x T</b>	*
<b>Resíduo</b>	2,40
<b>Média</b>	47,64
<b>CV (%)</b>	3,24

<sup>1</sup>Significativo a  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*Significativo a  $p \leq 0,001$ .

Fonte: Própria autora (2017).

**Apêndice J** - Médias para açúcares totais em kefir de água, para quatro produtos<sup>1</sup>, dois tempos.

Formulação	Tempo		
	0h(g.L <sup>-1</sup> )	56h(g.L <sup>-1</sup> )	56 h (g.350mL <sup>-1</sup> )
<b>O</b>	57,49cA <sup>2</sup>	25,70bB	9,0
<b>OJ</b>	64,40bA	32,15aB	11,3
<b>C</b>	65,12bA	31,07aB	10,9
<b>CJ</b>	72,15aA	33,03aB	11,6

<sup>1</sup>O = kefir com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir com açúcar mascavo convencional; CJ = kefir com açúcar mascavo convencional e jabuticaba.

<sup>2</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de fermentação.

**Apêndice K-** Análise de variância (ANOVA) para treze minerais analisados no kefir de água, para quatro formulações, em dois tempos.

Fonte de Variação	Quadrado Médio <sup>1</sup>						
	P	K	Ca	Mg	S	Na	Cu
Produto (P)	***	***	**	***	***	ns	***
Tempo (T)	***	ns	**	***	ns	***	*
P x T	***	ns	ns	***	ns	ns	*
Resíduo	0,37	8835	242,2	0,000	0,000	2,38	0,4952
Média (mg/L)	15,68	449,23	120,76	46,98	38,63	17,76	0,2567
Coeficiente de Variação (CV) (%)	3,86	20,92	12,89	15,1	14,04	8,69	40,15

Fonte de Variação	Quadrado Médio					
	Fe	Zn	Mn	B	Ni	Cr
Produto (P)	ns	*	***	***	*	**
Tempo (T)	**	***	***	***	***	***
P x T	*	*	***	***	***	**
Resíduo	0,344	0,7923	0,0005	0,00806	0,00122	0,00102
Média (mg/L)	4,448	0,2403	0,3636	0,4973	0,1297	0,1659
Coeficiente de Variação (CV) (%)	13,18	29,7	6,02	18,06	26,9	21,68

<sup>1</sup>ns = não significativo ( $p > 0,05$ ); \*Significativo a  $p \leq 0,05$ ; \*\*Significativa a  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*Significativa a  $p \leq 0,001$ .

**Apêndice L** - Médias para treze minerais analisados em bebidas de kefir de água, para quatro formulações<sup>1</sup>, em dois tempos.

Formulação	Mineral (mg.L <sup>-1</sup> )		Formulação	Mineral (mg.L <sup>-1</sup> )	
	0h	56h		0h	56h
<b>P</b>			<b>Cu</b>		
O	8,59 <sup>bB</sup>	19,82 <sup>bA</sup>	O	0,669 <sup>aA</sup>	0,367 <sup>aA</sup>
OJ	13,55 <sup>aB</sup>	22,68 <sup>aA</sup>	OJ	0,362 <sup>abA</sup>	0,139 <sup>bB</sup>
C	6,37 <sup>cB</sup>	19,69 <sup>bA</sup>	C	0,117 <sup>cA</sup>	0,150 <sup>bA</sup>
CJ	9,58 <sup>bB</sup>	22,82 <sup>aA</sup>	CJ	0,235 <sup>bcA</sup>	0,153 <sup>bA</sup>
<b>K</b>			<b>Fe</b>		
O	423,6 <sup>bA</sup>	531,0 <sup>bA</sup>	O	3,74 <sup>aA</sup>	4,27 <sup>aA</sup>
OJ	730,3 <sup>aA</sup>	649,8 <sup>aA</sup>	OJ	5,09 <sup>aA</sup>	4,48 <sup>aA</sup>
C	217,0 <sup>cA</sup>	314,3 <sup>cA</sup>	C	5,14 <sup>aA</sup>	3,32 <sup>aB</sup>
CJ	298,9 <sup>bcA</sup>	420,4 <sup>bcA</sup>	CJ	5,22 <sup>aA</sup>	4,09 <sup>aB</sup>
<b>Ca</b>			<b>Zn</b>		
O	107,9 <sup>abB</sup>	138,7 <sup>abA</sup>	O	0,344 <sup>aA</sup>	0,163 <sup>bB</sup>
OJ	130,6 <sup>aB</sup>	152,9 <sup>aA</sup>	OJ	0,362 <sup>abA</sup>	0,182 <sup>abB</sup>
C	92,9 <sup>bB</sup>	111,9 <sup>bA</sup>	C	0,191 <sup>bA</sup>	0,179 <sup>abA</sup>
CJ	97,7 <sup>bB</sup>	129,3 <sup>bA</sup>	CJ	0,283 <sup>abA</sup>	0,253 <sup>aA</sup>
<b>Mg</b>			<b>Mn</b>		
O	27,50 <sup>cB</sup>	39,42 <sup>bA</sup>	O	0,356 <sup>cA</sup>	0,103 <sup>cB</sup>
OJ	39,56 <sup>bB</sup>	44,59 <sup>abA</sup>	OJ	0,507 <sup>aA</sup>	0,480 <sup>aA</sup>
C	49,88 <sup>aA</sup>	54,32 <sup>aA</sup>	C	0,354 <sup>cA</sup>	0,179 <sup>bB</sup>
CJ	56,31 <sup>aA</sup>	57,76 <sup>aA</sup>	CJ	0,417 <sup>bB</sup>	0,510 <sup>aA</sup>
<b>S</b>			<b>B</b>		
O	28,58 <sup>cA</sup>	31,62 <sup>cA</sup>	O	0,193 <sup>cA</sup>	0,351 <sup>aA</sup>
OJ	36,13 <sup>bA</sup>	33,47 <sup>bA</sup>	OJ	0,639 <sup>bA</sup>	0,424 <sup>aB</sup>
C	44,66 <sup>abA</sup>	40,67 <sup>abA</sup>	C	0,880 <sup>aA</sup>	0,287 <sup>aB</sup>
CJ	48,52 <sup>aA</sup>	42,03 <sup>aA</sup>	CJ	0,811 <sup>abA</sup>	0,292 <sup>aB</sup>
<b>Na</b>			<b>Ni</b>		
O	7,67 <sup>aB</sup>	23,13 <sup>aA</sup>	O	0,176 <sup>aA</sup>	0,128 <sup>bcA</sup>
OJ	12,41 <sup>aB</sup>	23,77 <sup>aA</sup>	OJ	0,105 <sup>abA</sup>	0,081 <sup>cA</sup>
C	11,66 <sup>aB</sup>	23,48 <sup>aA</sup>	C	0,082 <sup>bB</sup>	0,234 <sup>aA</sup>
CJ	11,68 <sup>aB</sup>	24,94 <sup>aA</sup>	CJ	0,052 <sup>bB</sup>	0,196 <sup>abA</sup>
<b>Cr</b>					
O	0,2175 <sup>aA</sup>	0,2267 <sup>aA</sup>			
OJ	0,1127 <sup>bB</sup>	0,2290 <sup>aA</sup>			
C	0,0460 <sup>bB</sup>	0,2343 <sup>aA</sup>			
CJ	0,0493 <sup>bB</sup>	0,2290 <sup>aA</sup>			

<sup>1</sup>O = kefir com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir com açúcar mascavo convencional; CJ = kefir com açúcar mascavo convencional e jabuticaba. <sup>2</sup>Letras minúsculas diferentes na mesma coluna

indicam que há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam que há diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de fermentação.

**Apêndice M-** Análise de variância (ANOVA) para as características de cor analisadas no kefir de água, para 4 formulações, em 8 tempos.

Fonte deVariação	Quadrado médio <sup>1</sup>				
	L	a*	b*	C*	Hue
<b>Produto (P)</b>	***	***	***	***	***
<b>Tempo (T)</b>	***	***	***	***	***
<b>P x T</b>	***	***	***	***	***
<b>Resíduo</b>	0,0000	0,0619	0,00141	0,00134	0,23
<b>Média</b>	28,34	6,57	11,21	13,15	57,48
<b>CV (%)</b>	1,12	3,79	3,97	3,73	0,83

<sup>1</sup>\*\*\* Significativo a  $p \leq 0,001$

**Apêndice N** - Médias para características relacionadas à cor em kefir de água, para quatro formulações<sup>1</sup>, em oito tempos.

Formulação	L*							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
O	26,04 bA2	28,44 bB	29,93 bCD	30,07 bCDE	30,33 bCDE	29,83 bC	30,74 bDE	30,84 bE
OJ	24,78 cAB	24,32 dA	25,18 dBC	25,45 dCD	25,52 dCD	25,79 dDE	26,38 dEF	26,57 dF
C	28,36 aA	30,97 aB	32,23 aDEF	31,86 aCDE	31,22 aBC	32,76 aEF	31,63 aBCD	32,91 aF
CJ	25,43 bcA	25,40 cA	27,00 cBC	26,70 cB	26,41 cB	27,60 cCD	28,35 cE	28,00 cDE
Formulação	a*							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
O	4,73 aB	7,96 aA	7,76 aA	7,62 aA	7,71 aA	7,41 <sup>aA</sup>	7,56 aA	7,72 <sup>aA</sup>
OJ	3,52 cD	6,78 bC	7,03 bBC	7,15 aBC	6,94 bBC	7,46 aAB	7,93 aA	7,97 <sup>aA</sup>
C	4,03 bcD	6,04 <sup>cA</sup>	5,29 cBC	5,38 bBC	4,81 cC	5,61 bAB	4,95 cC	5,92 bAB
CJ	4,08 bD	7,31 bAB	7,90 aA	7,29 aAB	6,62 <sup>bC</sup>	7,19 aBC	6,94 bBC	7,54 aAB
Formulação	b*							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
O	6,04 bC	14,27 aB	15,83 aA	15,72 aA	15,41 aAB	14,84 aAB	16,06 aA	15,69 aAB
OJ	3,07 <sup>cF</sup>	7,03 bE	8,16 <sup>bD</sup>	8,65 bCD	8,36 cD	9,22 bBC	10,40 cA	10,11 bAB
C	8,43 aD	15,21 aAB	15,76 aA	15,26 aAB	13,38 bC	15,67 aA	14,25 bBC	15,90 aA
CJ	3,39 <sup>cF</sup>	7,01 bE	8,95 <sup>bC</sup>	8,64 <sup>bC</sup>	7,78 cD	9,43 bBC	10,61 cA	10,08 bAB
Formulação	C*							
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h
O	7,68 bB	16,43 aA	17,63 aA	17,48 aA	17,23 aA	16,56 aA	17,75 aA	17,48 aA
OJ	4,65 <sup>dF</sup>	9,77 bE	10,77 cD	11,22 bCD	10,89 cCD	11,88 bBC	13,06 cA	12,88 bAB
C	9,35 aD	16,35 aAB	16,63 aA	16,18 aAB	14,21 bC	16,65 aA	15,09 bBC	16,96 aA

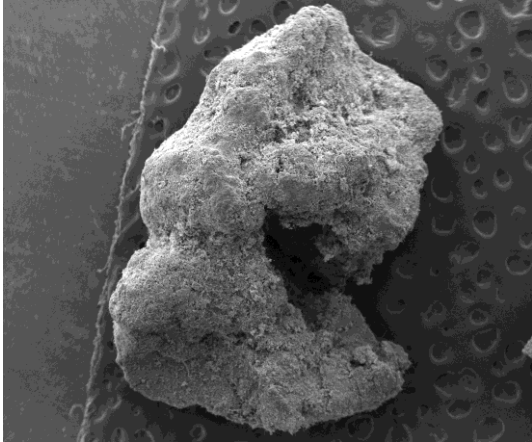
<b>CJ</b>	5,29 cD	10,13 bC	11,95 bAB	11,30 bB	10,21 cC	11,85 bAB	12,71 cA	12,61 bA
<b>Formulação</b>	<b>Hue</b>							
	<b>0h</b>	<b>8h</b>	<b>16h</b>	<b>24h</b>	<b>32h</b>	<b>40h</b>	<b>48h</b>	<b>56h</b>
<b>O</b>	51,97 bD	60,76 bC	63,85 bAB	64,15 bAB	63,43 bB	63,61 bAB	64,79 bA	63,86 bAB
<b>OJ</b>	41,21 cF	46,15 cE	49,24 cD	50,39 cCD	50,25 cCD	51,15 dBC	52,58 dA	51,72 dAB
<b>C</b>	64,58 aD	68,41 aC	71,45 aA	70,62 aAB	70,26 aAB	70,26 aAB	70,85 aA	69,60 aBC
<b>CJ</b>	39,57 dF	43,98 dE	48,36 cD	49,91 cC	49,61 cC	52,87 cB	56,80 cA	53,11 cB

<sup>1</sup>O = kefir com açúcar mascavo orgânico; OJ = kefir com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba; C = kefir com açúcar mascavo convencional; e CJ = kefir com açúcar mascavo convencional e jabuticaba.

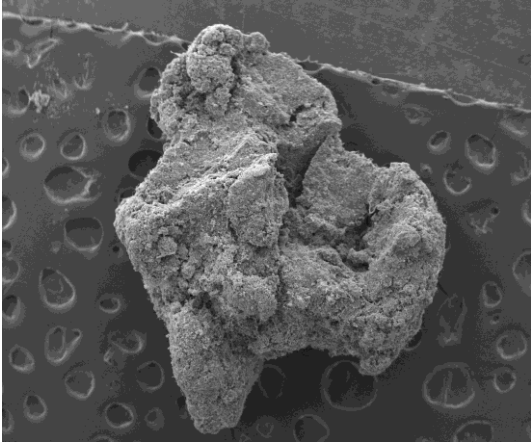
<sup>2</sup> As médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre as formulações. Letras maiúsculas

diferentes na mesma linha, indicam que há diferença estatística significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tempos de fermentação.

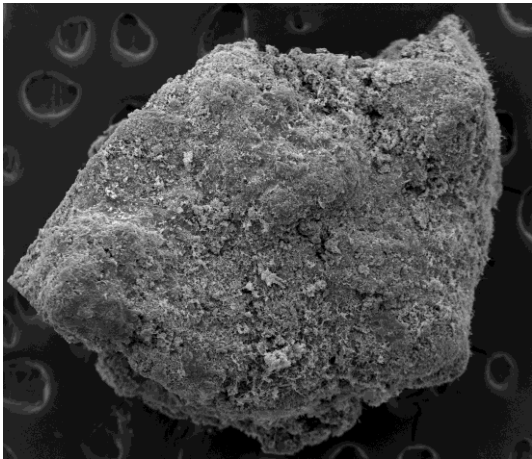
**Apêndice O –** Imagens de grãos de kefir de água em MEV.



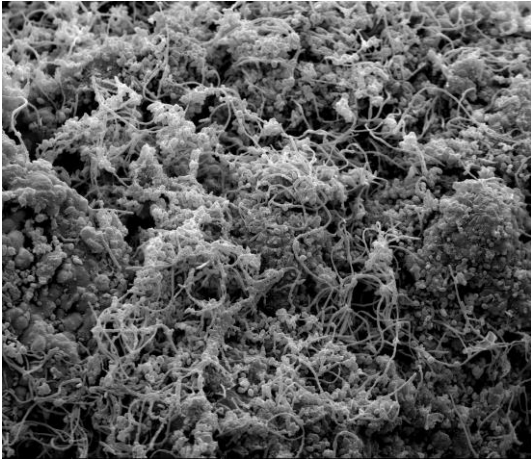
A.1



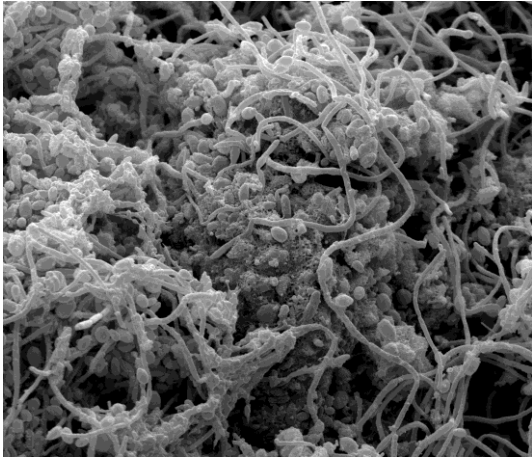
A.2



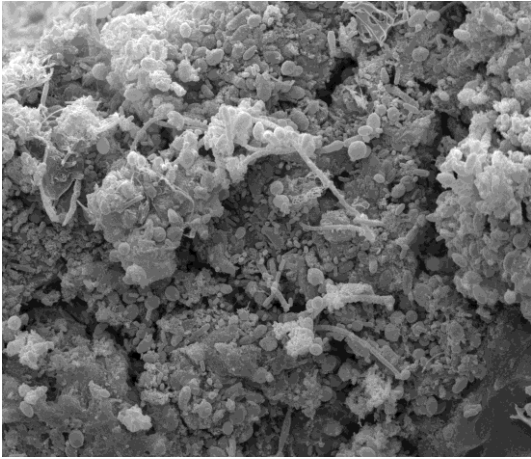
A.3



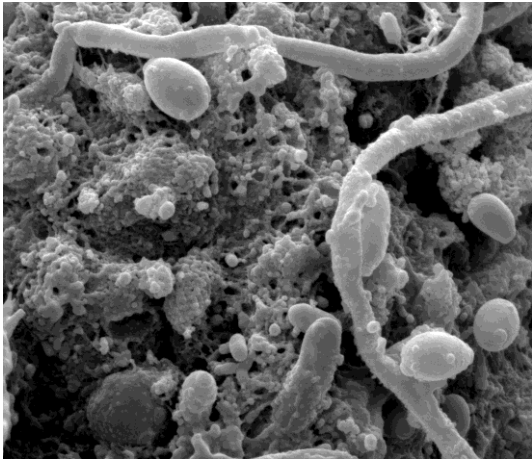
A.4



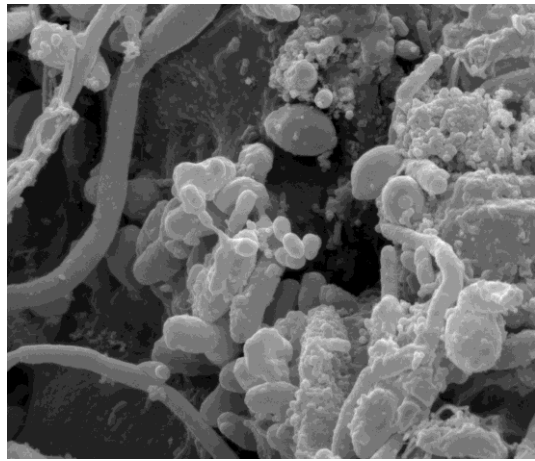
A.5



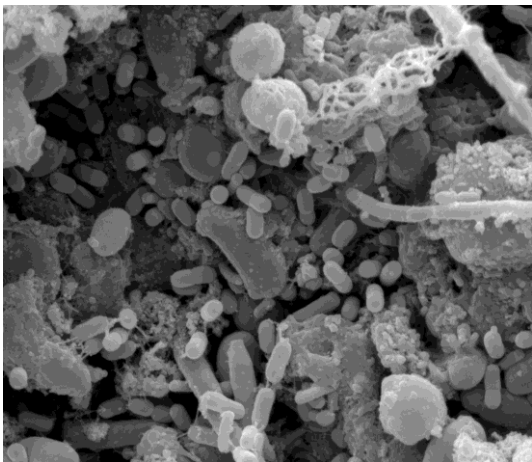
A.6



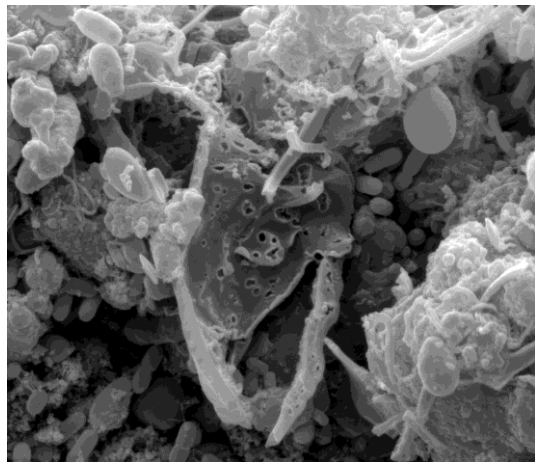
A.7



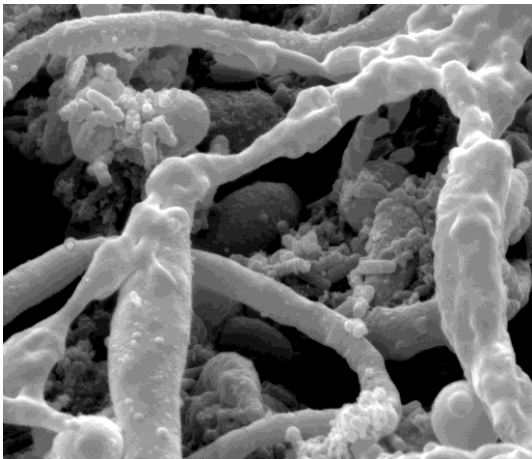
A.8



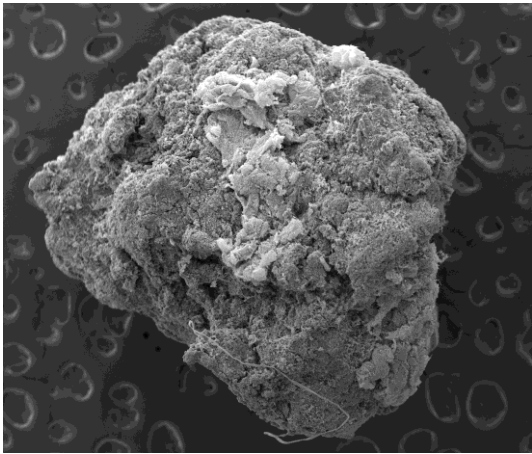
A.9



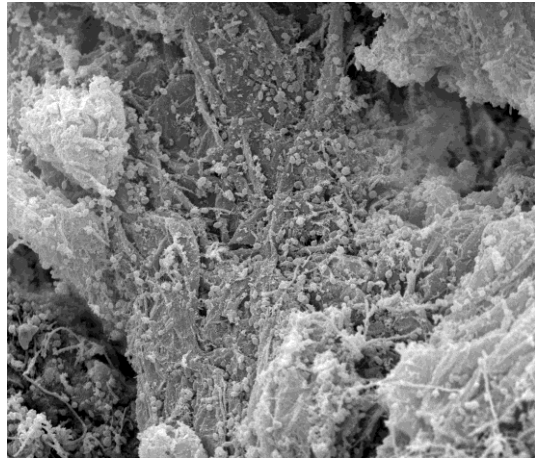
A.10



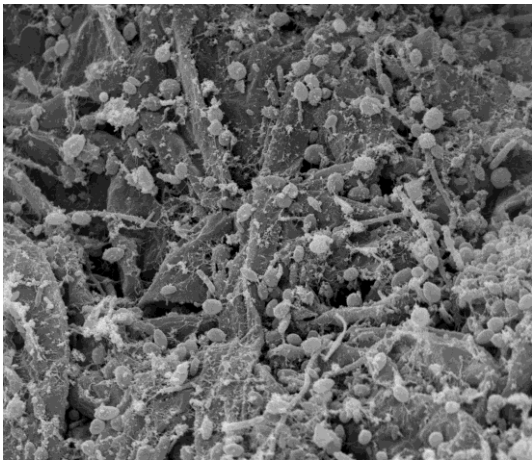
A.11



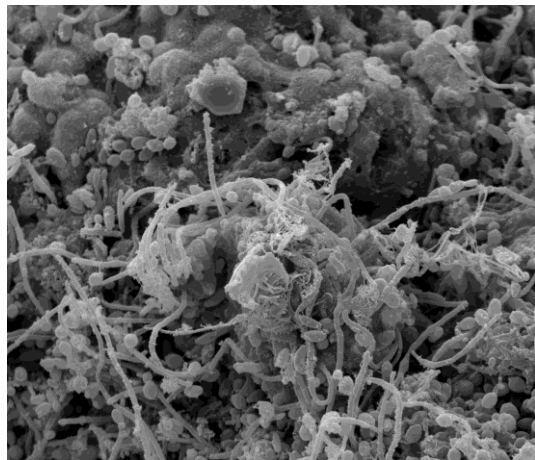
B.1



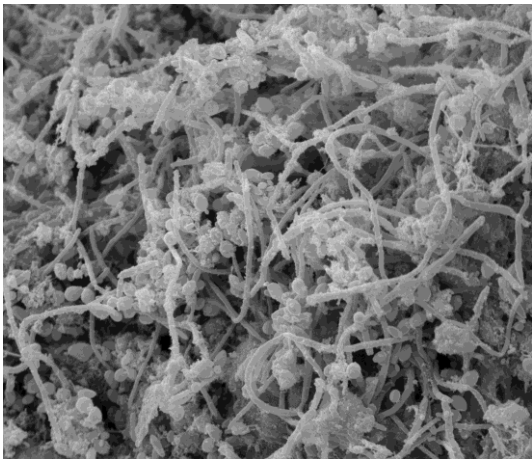
B.2



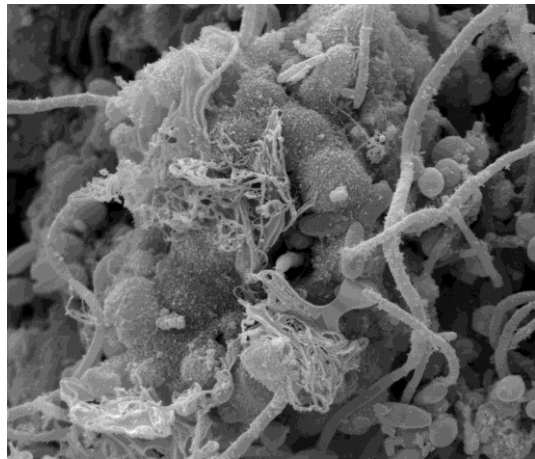
B.3



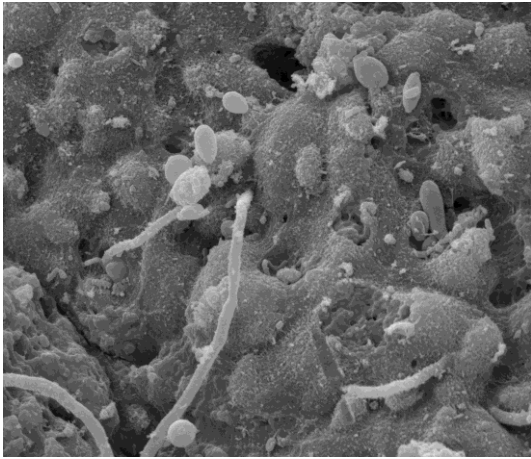
B.4



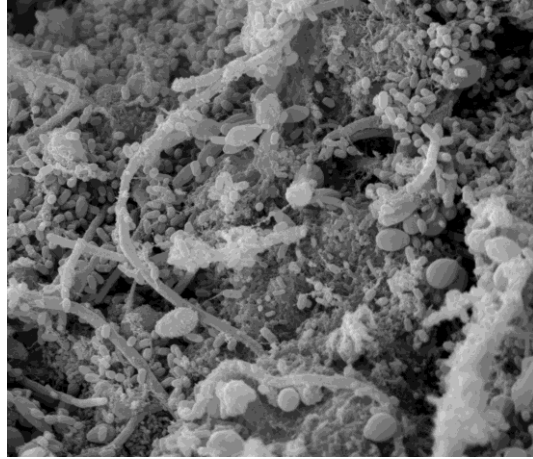
B.5



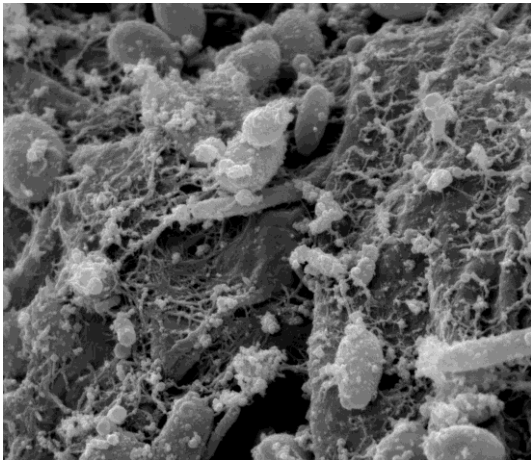
B.6



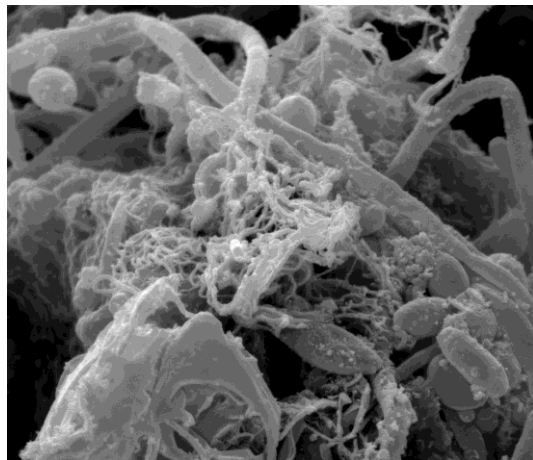
B.7



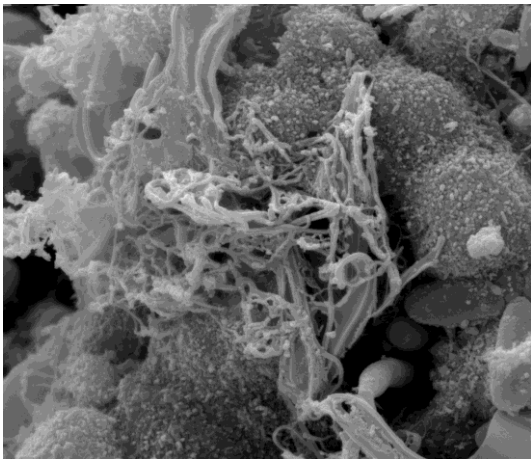
B.8



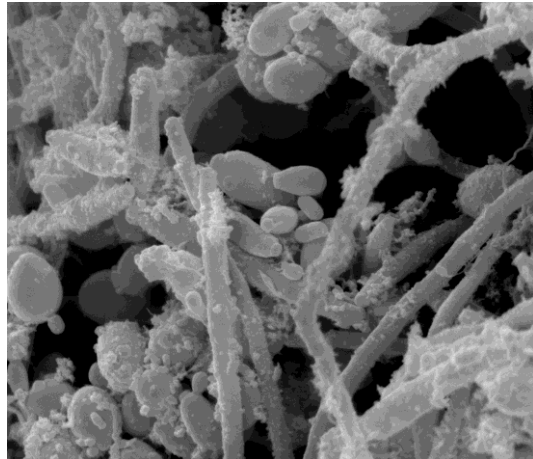
B.9



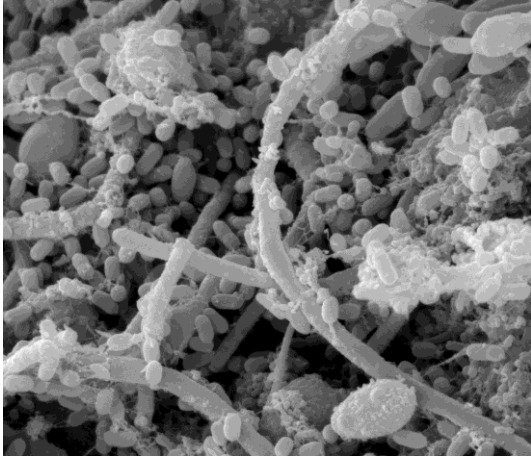
B.10



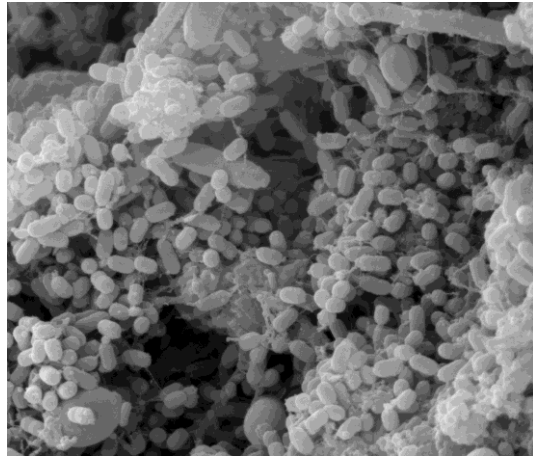
B.11



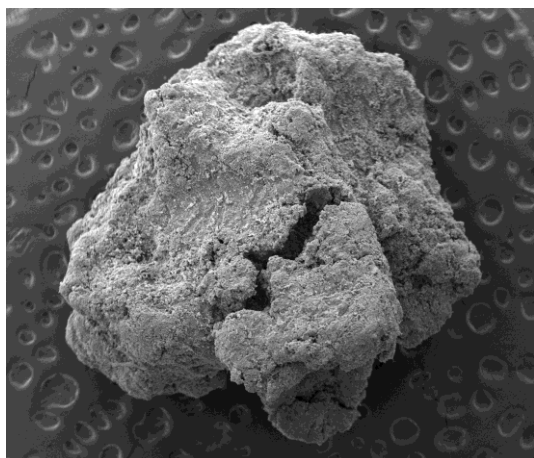
B.12



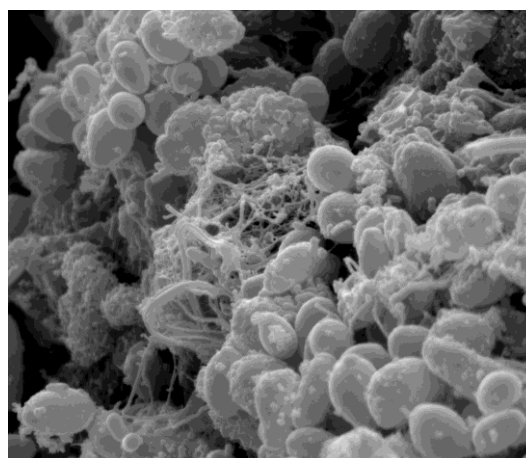
B.13



B.14



C.1



C.2

A: Grãos cultivados com açúcar mascavo orgânico. A.1: aumento (“x” vezes) 60; A.2: x 80; A.3: x 130; A.4: x 8.000; A.5 e A.6: x 2.000; A.7, A.8, A.9 e A.10: x 8.000; e A.11: x 12.000.

B: Grãos cultivados com açúcar mascavo orgânico e jabuticaba. B.1: x 80; B.2: x 800; B.3; B.4; e B.5: x 2.000; B.6; B.7; e B.8: x x 4.000; B.9; B.10; B.11; B.12; B.13; e B.14: x 8.000.

C: Grãos cultivados com açúcar mascavo convencional. C.1: x 60; e C.2: x 8.000.