



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS



CLARIANE TEIXEIRA PESSOA MAMONA

**SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS PARA  
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS KEFIR COM  
POTENCIAL PROBIÓTICO**

SALVADOR - BA  
202

CLARIANE TEIXEIRA PESSOA MAMONA

**SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS PARA  
DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS KEFIR COM  
POTENCIAL PROBIÓTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia - Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia de Oliveira Mamede

SALVADOR - BA  
2022

**Dedico este trabalho,**

*À minha filha Maria Pessoa Mamona que é minha fonte de inspiração e perseverança nessa caminhada.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao meu Deus pelos planos dEle sempre serem maiores que os meus.*

*A mim, por conseguir chegar até aqui*

*A minha filha Maria Pessoa Mamona pelo seu sorriso me trazer forças nos momentos mais difíceis.*

*Ao meu Esposo Alexsandro Mamona por ser um companheiro de vida e aos meus pais Eliane Pessoa e Carlos Pessoa pelo amor incondicional.*

*Aos meus irmãos Carla Pessoa e Carlos Pessoa, as minhas duas famílias Pessoa e Mamona e aos amigos pelo carinho e compreensão,*

*Aos meus colegas de curso Danilo Alves, Deise Azevedo, Luccas de Jesus, Mariana Fernandes e Pedro Tavares pela nossa rede de apoio.*

*A minha orientadora por me fazer pensar e questionar sobre e aos professores Karina Magalhães, Nelson Colauto e Giani Coloauto pelo apoio nessa caminhada.*

*Ao PGAlí pelo acolhimento e Priscila Oliveira pela dedicação,*

*À Coordenação Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida,*

Agradeço.

## RESUMO

O kefir é uma bebida fermentada oriunda da Europa oriental. Os substratos fermentativos mais utilizados são leite de vaca e água com açúcar mascavo. Nesse sentido, a utilização de outros tipos de substratos apresenta potencial interessante como abrangência ao público intolerante ao leite e uma bebida de menor valor calórico e mais saudável. O objetivo da pesquisa foi avaliar o uso dos grãos de kefir como cultura inicial para bebida kefir simbiótica de baixa caloria e valor nutricional agregado baseada em diferentes substratos (cristal, açúcar de coco, demerara, mascavo, melado de cana). A bebida foi avaliada através das análises físico-químicas (pH, Brix e Acidez), comportamento das bactérias ácido-láticas e leveduras e dos ácidos acéticos e láticos, com esses resultados e baseado em outros estudos de análise sensorial do público por Kefir açucarado como base em diferentes formulações, abre perspectivas para esta aplicação inovadora de grãos de kefir açucarados para o desenvolvimento de bebidas à base de diferentes substratos e posterior avaliação da aceitação dessa bebida apresentada nesse estudo.

Palavras-chave: *Kefir açucarado, baixo valor calórico, substrato alternativo*

## ABSTRACT

Kefir is a fermented drink from Eastern Europe. The most used fermentation substrates are cow's milk and brown water. In this sense, the use of other types of substrates presents interesting potential as the brand to the milk intolerant public and a drink with lower caloric value and healthier. The objective of the research was to evaluate the use of kefir starter grains as a culture for symbiotic kefir drink of low calorie and nutritional value based on different substrates (crystal, coconut sugar, demerara, brown, cane molasses). Heated with varieties of compounds of organic results and based on other chemical substances, Briidez and substances and of the organic results of sensorial analyzes of the sugary kefir as base in different formulas opens perspectives for application of innovative formulas, sugary kefir grains for the development of beverages based on different substrates and subsequent evaluation of different beverages presented in this study.

**Keywords:** : *Sugared kefir, low calorie, alternative substrate*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### **CAPÍTULO I.....**

**Figura 1-** Evolução anual de depósitos de patentes dos métodos e produtos probióticos entre 2010 a 2016.

**Figura 2** -Distribuição dos pedidos de patentes por país de origem relacionado aos métodos e produtos de probióticos entre 2010 a 2016.

**Figura 3-** Fluxograma de produção de bebida kefir

### **CAPITULO II.....**

**Figura 1:** Comportamento das bactérias ácido-láticas (a) e leveduras (b)

**Figura 2** - Comportamento dos ácidos acético (a) e láctico (b)

**Figura 3** Crescimento da biomassa de grãos de kefir

**Figura 4-** Análise multivariada sob forma de Heatmap dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos das bebidas kefir fermentadas em diferentes substratos

## LISTAS DE TABELAS

### CAPÍTULO I.....

**Tabela 1**-Microorganismos oficialmente considerados probióticos no Brasil.

**Tabela 2** - Comunidade microbiana dos grãos de kefir e bebida fermentada kefir de quinoa com cacau, identificada por PCRDGGE.

### CAPÍTULO II .....

**Tabela 1**-Análises físico-químicas realizadas em bebidas kefir com diferentes substratos fermentativos.

**Tabela 2**- Microorganismos presentes no grão de kefir utilizado para fermentação de substratos alternativos

## SUMÁRIO

<i>Capítulo I</i> .....	10
INTRODUÇÃO GERAL.....	11
1. OBJETIVOS .....	13
1.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	13
1.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	13
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1. ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS.....	14
1.10 Kefir.....	19
2. SUBSTRATOS ORGÂNICOS.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
CAPÍTULO II – SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS PARA DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS KEFIR COM POTENCIAL PROBIÓTICO .....	36
RESUMO .....	36
1. INTRODUÇÃO .....	38
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 MATERIAL .....	39
2.2 MÉTODOS.....	39
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
3. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

## *Capítulo I*

---

*REVISÃO DA LITERATURA*

## INTRODUÇÃO GERAL

Os probióticos são micro-organismos vivos benéficos para a saúde humana. Quando estão em equilíbrio, ajudam a manter a microbiota intestinal saudável, colaborando para o bom funcionamento do corpo, atuando em diferentes sistemas, como o digestivo e o imunológico, através dos fatores antimicrobianos inibindo o crescimento de microrganismo patogênicos.

Kefir é um alimento probiótico composto pela associação de vários microrganismos, como leveduras, lactobacilos e bactérias (principalmente ácido lácticas e ácido acéticas), sendo considerado um alimento funcional e sendo encontrado em forma de grãos ou como bebida fermentada. O kefir pode reduzir problemas intestinais, uma vez que as bactérias benéficas auxiliam na digestão e aceleram o trânsito intestinal, contém uma variedade de compostos bioativos, incluindo os ácidos orgânicos e os peptídeos.

Kefir é uma bebida fermentada, originária das montanhas do Cáucaso, cujo substrato mais comum é o leite, sua produção é realizada com a submersão temporária dos chamados “grãos de kefir” num substrato, como o leite ou água açucarada. No Brasil, onde a produção é caseira, eles são oferecidos sem custos.

Nos últimos anos tem-se aumentado a demanda por alimentos ricos em nutrientes e com propriedades funcionais que ajudem na prevenção de doenças, como resultado um crescimento no consumo de Kefir devido seus benefícios probióticos. Baseado em estudos observa-se o aumento crescente prospecção de patentes relacionados ao Kefir nos últimos anos em todo o mundo, destacando-se a Suíça e EUA, porém o Brasil está incluído nesse crescimento com menor proporção.

Alternativas de substratos estão sendo inseridos na produção da bebida Kefir, devido a quantidades mais elevadas de benefícios a saúde. O processo do refino no açúcar cristal resultada na remoção de uma quantidade de vitaminas e minerais fazendo com que outros açúcares com menor processo obtenha melhores percentuais, tais como: O sabor e coloração do demerara e mascavo é resultado da preservação do cálcio, o ferro e os sais minerais, na sua produção, o açúcar de coco possui índice glicêmico baixo, o melão é um caldo rico em potássio, cálcio, ferro, manganês e proteínas.

O objetivo do trabalho foi avaliar a viabilidade de elaboração de kefir a base de água com diferentes substratos fermentativos. A dissertação está apresentada em dois capítulos, organizados da seguinte forma: Capítulo 1 apresenta revisão bibliográfica contextualizada sobre os temas estudados para desenvolvimento do projeto de dissertação e o Capítulo 2 aborda o estudo da viabilidade de elaboração de kefir a base de água com adição de diferentes substratos (mascavo, demerara, cristal, coco e melão) em relação as análises (físico-química, microbiológica, ácidos acético e láctico) proporcionando a criação de novas bebidas com diferentes características.

## **1. OBJETIVOS**

### *1.1. Objetivo Geral*

- Avaliar a viabilidade de elaboração de kefir a base de água com diferentes substratos fermentativos

### *1.2. Objetivos específicos*

- Avaliar as características físico-químicas nas bebidas de Kefir a base de água.
- Avaliar o desenvolvimento dos microrganismos e a produção de ácidos orgânicos como láctico e acético nas bebidas de Kefir a base de água.

## CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

---

---

### 1. ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS

O conceito de alimentos funcionais surgiu na década de 80 no Japão, e posteriormente na década de 90 foi definido o termo FOSHU (Foods for Specified Health Use) para os alimentos com uso específico para saúde (MAZZA, 2000).

A Portaria n.º 398 de 30 de abril de 1999, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil, define como funcional "Todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica" (BRASIL, 1999).

O organismo necessita de diferentes alimentos a cada etapa do seu desenvolvimento desde a formação do embrião a sua fase adulta, e os alimentos funcionais auxiliam esse desenvolvimento através do seu consumo adequado (VIZZOTTO, M., KROLOW, A., TEIXEIRA F., 2010). O potencial benéfico à saúde ocorre quando estes alimentos são consumidos como parte de uma alimentação variada, de forma regular (PAIVA, 2013). Os alimentos Funcionais estão sendo inseridos na alimentação para os resultados benéficos a saúde (AGAZZI *et. al.* 2022, SAFRAID, G. *et.al.*,2022).

Os alimentos funcionais possuem compostos bioativos capazes de atuar como moduladores dos processos metabólicos, prevenindo o surgimento precoce de doenças degenerativas (VIZZOTTO, M., KROLOW, A., TEIXEIRA F., 2010)

O consumo de alimentos funcionais é afetado devido fatores: sociodemográficos devido a diferentes culturas, idade, fatores determinantes a saúde, condições financeiras, qualidade e sabor do alimento (SAFRAID, G. *et.al.*,2022).

Os alimentos funcionais podem ser utilizados com adição de outros componentes bioativos, obtendo-se resultados satisfatório a saúde como antioxidante, fibras alimentares, microrganismos vivos e outros (BALDISSERA *et al.*, 2011). Os probióticos são microrganismos vivos que beneficiam a saúde, pois reduzem doenças gastrointestinais auxiliando contra colonização dos patógenos e auxiliam ao equilíbrio

da flora intestinal (Khalil, T *et al.*, 2022; FERREIRA, A., *et al.* 2021, WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

De acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os probióticos são: "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO/OMS, 2002). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2014), a recomendação de consumo de probióticos é baseada na porção diária de microrganismos viáveis ingerida, sendo o mínimo de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/dia (BRASIL, 2007).

Segundo a definição da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC 241, 2018) que Probiótico são microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo.

Existem alguns critérios que devem ser atendidos para ser considerado probióticos tais como: resistência ao suco gástrico, a bile e enzimas pancreáticas e ter efeito benéfico ao hospedeiro, produção de peróxido de hidrogênio e bacterocinas para redução/exclusão do crescimento dos patogênicos e formação balanceada microbiota (FOOKS *et al.*, 1999; STÜRMER, 2012). A capacidade de produzir fatores antimicrobianos é umas das principais ações de um probiótico para atuação na inibição do crescimento de microrganismo patogênicos, sendo eles: ácidos, principalmente o láctico e o acético, dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, bacterocinas e peptídios antimicrobianos (KURITZA L, 2014; ROSA *et al.*, 2016).

Algumas espécies de bactérias que atendem critérios para serem consideradas probióticas, porém as cepas ácido-láticas são consideradas importantes com relação à nutrição e à alimentação, as espécies consideradas colonizadoras o *Lactobacillus* e *Enterococcus spp.* ou não colonizadoras, de trânsito intestinal livre, como o *Bacillus spp.* e o *Saccharomyces cerevisiae* (HUYGHEBAERT *et al.*, 2011; KURITZA, 2014).

Existem alguns critérios que devem ser atendidos para ser considerado probióticos tais como: resistência ao suco gástrico, a bile e enzimas pancreáticas e ter efeito benéfico ao hospedeiro (FOOKS *et al.*, 1999; STÜRMER, 2012).

Os probióticos são encontrados em diferentes superfícies como a mucosa urogenital e gastrointestinal, também são encontrados em alimentos fermentados, como produtos lácteos (MELLO, F. *et al.*, 2013). Os lácteos, principalmente iogurtes e leites

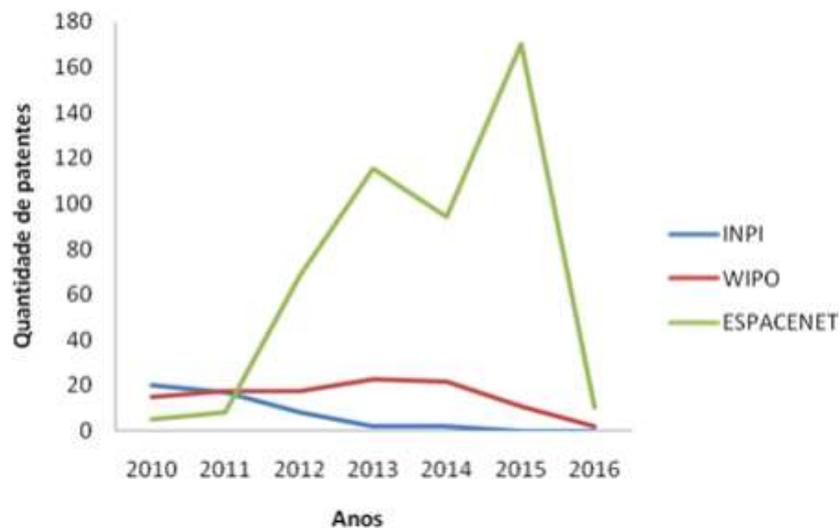
fermentados são considerados probióticos, sendo os queijos com menor frequência a utilização, como exemplo: Queijos Minas Frescal, Feta e requeijão, apesar de suas vantagens como maior pH e gordura, além de firmeza, proporcionando um ambiente favorável para a sobrevivência de bactérias probióticas no trato gastrointestinal (GOMES *et al.*, 2011; KARIMI *et al.*, 2012)

Os probióticos são um tipo de microorganismos ativos que altera a composição da flora trazendo benefícios para o corpo humano, produzindo microorganismos únicos propícios à saúde ou mistos microrganismo (ZENDEBOODI *et al.*, 2020). A flora intestinal é um microecossistema complexo, composto por 6-10 categorias de bactérias, sendo composta 90% por Firmicutes e Bacteroidetes, atua como regulares em distúrbios metabólicos, metabolismo, síntese de micronutrientes, desintoxicação, função imunológica e função das células epiteliais, proteção hospedeiro e obesidade.(KINROSS *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 2022).

Devido os consumidores ter o conhecimento dos leites fermentados conter microorganismos viáveis e os reconhecem como benéfico a saúde, a indústria de laticínios vem se destacando, aumentando o número de produtos funcionais, através da adição de probióticos e prebióticos em alimentos como o iogurte e os leites fermentados no geral (BALLUS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2016). O crescimento no mercado de probióticos vem ocorrendo, a partir de 2016 com um crescimento de 30%, isso equivale a 32,2 bilhões de dólares para o ano de 2017(BARROS, 2021).

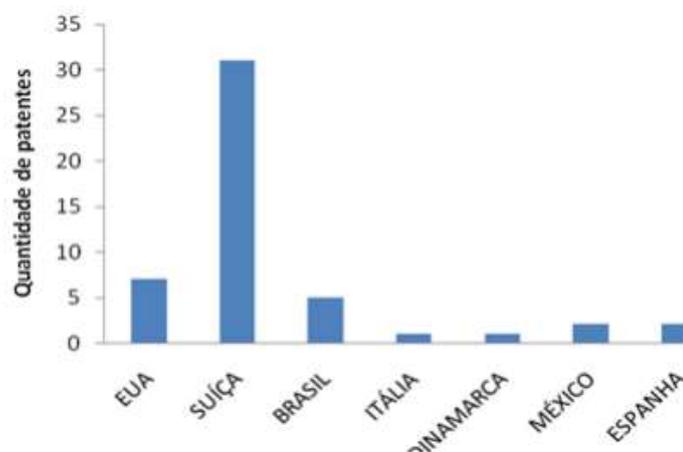
O mercado de alimentos funcionais resultou US\$ 264 bilhões em 2013 a América Latina representa 17% do mercado de alimentos e bebidas funcionais, movimentando valor próximo a US\$ 45 bilhões, o Brasil gerou US\$ 14,6 bilhões desse total, liderando a tendência de crescimento latino-americano nesse setor (MENDES, T; SANTOS, J. 2021).

De acordo com a base de dados Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) do Brasil, European Patent Office (Espacenet) e World Intellectual Property Organization(WIPO) observa a evolução de patentes entre 2010 a 2016 ( Figura 1), a distribuição dos pedidos de patentes por país (Figura2), mostrando respectivamente a Suíça com 31 pedidos de patentes, em seguida o EUA com 7 patentes e o Brasil com 5 patentes (MENDES, T; SANTOS, J. 2021).



Fonte: MENDES, T; SANTOS, J. 2021.

**Figura 1.** Evolução anual de depósitos de patentes dos métodos e produtos probióticos entre 2010 a 2016.



Fonte: MENDES, T; SANTOS, J. 2021.

**Figura 2.** Distribuição dos pedidos de patentes por país de origem relacionado aos métodos e produtos de probióticos entre 2010 a 2016.

---

**Espécies**

---

*Lactobacillus acidophilus*  
*Lactobacillus casei shirota*  
*Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*  
*Lactobacillus casei* variedade *defensis*  
*Lactobacillus paracasei*  
*Lactococcus lactis*  
*Bifidobacterium bifidum*  
*Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *Bifidobacterium. lactis*)  
*Bifidobacterium longum*  
*Enterococcus faecium*

---

Fonte: Brasil, 2014

**Tabela 1.** Microrganismos oficialmente considerados probióticos no Brasil.

O probiótico tem ação de sintetizar ácido láctico o qual reduz o pH intestinal, e dificulta a proliferação de patógenos, resultando em uma melhor defesa do organismo contra infecções, o *Lactobacillus acidophilus* é o componente bioativo mais utilizado (AURELI et al., 2011). A ANVISA considera 11 microrganismos como probióticos, de acordo com comprovações científicas, dentre os quais, a maioria corresponde ao gênero *Lactobacillus*.

Baseado em DYSHLYUK, 2021 que realizou uma pesquisa usando cepas de *bifidobacterium* e *propionibacterium* em consórcios probióticos para normalizar o trato gastrointestinal, sendo avaliado atividade antimicrobiana e antioxidante, bem como a resistência a antibióticos e condições gastrointestinais adversas, obtendo como resultado satisfatório e de relevância para esse fim.

Os probióticos tem capacidade de desintoxicação de aflatoxinas (AF) encontrados em produtos fermentados e TGI de animais. Em estudos realizados pode-se observar melhora no desempenho produtivo e nos parâmetros bioquímicos, na diminuição na gravidade da toxicidade com ingestão de *Lactobacillus* ( YASMEEN et. al., 2021). Aflatoxina (AF) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Aspergillus* em condições favoráveis de temperatura e umidade, e é comumente encontrada em alguns alimentos como nozes, amendoins e outras sementes oleosas, incluído o milho, especiarias e frutas secas. Apresentam alta estabilidade, por isso são difíceis de degradação, permanecendo intactas no alimento por um longo período (Nerilo et. al.,

2020). No organismo, a depender do metabolismo, essas micotoxinas podem causar cirrose e alguns tipos de carcinoma.

### 1.10 Kefir

Os grãos de kefir são uma agregação de leveduras, ácido láctico e bactérias do ácido acético que coexistem em simbiose e são envolvidas por uma matriz de polissacarídeos (ALSAYADI, AZIZI-LALABADI & KHEIROURI, 2014). A fermentação do Kefir se realiza através dos lactobacilos, leveduras, bifidobacterias, presentes nos grãos do Kefir, com produção do ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (BRASIL, 2007).

O Kefiran é uma matriz de polissacarídeos ramificável solúvel em água que envolve o grão do Kefir (MIRANDA, PEREIRA, ARAUJO, 2014 ; SANTOS, F. *et al.*, 2015). O Grão do Kefir é constituído de vitaminas do complexo B (biotina, niacina, ácido pantotênico, piridoxina, ácido fólico e B12) e vitamina K, leveduras, cálcio, carboidratos, gordura, fósforo, magnésio, aminoácidos e várias culturas bacterianas e leveduras CAETANO, MONTANHINI, 2014; ALMEIDA, F. A. *et al.*, 2011)

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2007), define kefir como: Leite fermentado, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, cuja fermentação se realiza com cultivos de 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.

O processo fermentativo gera uma série de compostos que conferem sabor e aroma característicos ao kefir, além de substâncias bioativas, responsáveis por propriedades nutracêuticas (AHMED *et al.*, 2013). A produção do Kefir necessita de um controle de tempo de fermentação, quantidade do grão utilizado e temperatura aplicada, para obtenção de uma bebida de qualidade (TAVARES *et al.*, 2018; SOUZA & da SILVA, 2017).

O kefir encontra-se distribuído em produção artesanal nos mais diversos locais do mundo (FARNWORTH, 2005). No Brasil, o Kefir é produzido em escala familiar e para consumo próprio. (FERREIRA, 2021). O Kefir de água é chamado de Kefir

açucarado devido a fermentação ser feita a partir de soluções com sacarose ou frutas, ou seja, trata-se de Kefir isento de leite (RANDAZZO *et al.*, 2016).

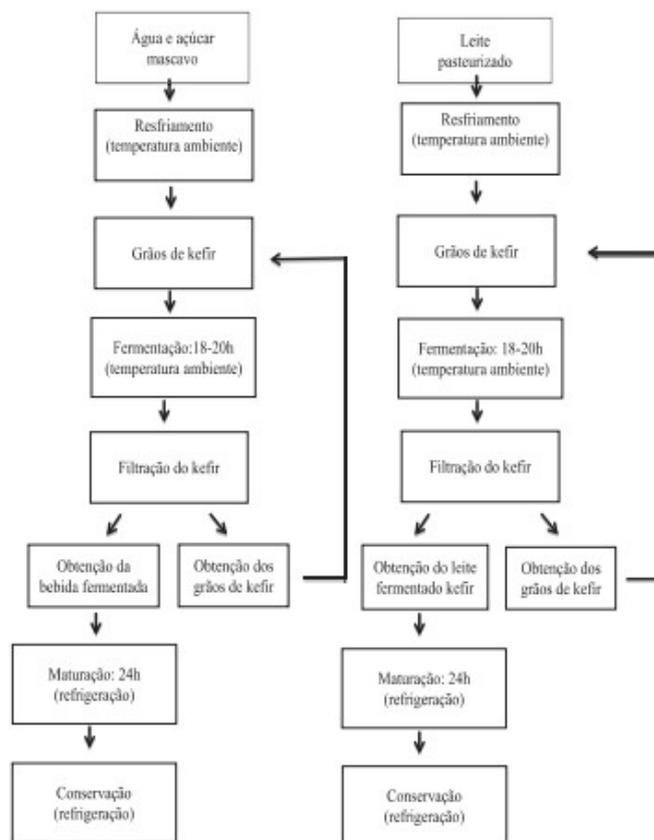
A origem do grão, métodos e substratos utilizados interferem diretamente nos microrganismos presentes no grão do Kefir (GRONNEVIK, FALSTAD E NARVHUS, 2011). Os grãos de kefir apresentam consistência gelatinosa, forma irregular e tamanho de 3 a 35 mm de diâmetro. (SANTOS *et al.*, 2012). O crescimento diário médio do grão em leite é de 5% e de água 45%, o processo de lavagem, agitação no frasco durante o processo de fermentação e prensa do grão na peneira, são fatores que interferem diretamente o crescimento do grão. (SANTOS, 2013).

O kefir açucarado é uma bebida fermentada obtida pela adição de grãos de kefir açucarados que agem como inóculo a uma mistura de diferentes substratos ao invés de água, sacarose ou açúcar, enquanto o kefir de leite tradicional é obtido com a fermentação do leite utilizando grãos de kefir; na produção industrial de kefir, com cultivo de microrganismos obtidos de grãos (AÇIK *et al.*, 2020).

Grãos de kefir açucarados e grãos de kefir de leite são semelhantes em termos de conteúdo estrutural e de microorganismos. No entanto, diferentes tipos de estrutura ou componentes de carbono, que são a fonte de energia dos substratos, podem ser eficazes no crescimento microbiano (Tomar *et al.*, 2020).

A Produção da bebida kefir a base de leite pasteurizado e água com açúcar mascavo, conforme apresentado na Figura 3, não diferem muito na produção de leite. Após a pesagem os grãos são adicionados a água com um substrato ou adicionado ao leite, posteriormente é realizada a fermentação em temperatura ambiente no período estabelecido pelo processo, sendo na figura 3 no período de 18-20h, sendo realizadas as análises no tempo 0h e nos tempos marcos pela produção para comparação. Após o tempo de fermentação é realizada a filtragem para separação dos grãos da bebida, logo após é realizada a maturação da bebida no período de 24h e a conservação com maior durabilidade é através da refrigeração.

Na Figura 1 Produção da bebida kefir a base de leite pasteurizado e água com açúcar mascavo.



FONTE: Santos, F L et al., 2015

**Figura 3-** Fluxograma de produção de bebida kefir

A bebida Kefir no decorrer dos anos vem se tornando uma alternativa com função probiótica com valor nutricional, atendendo dietas à base de plantas veganas e sem lactose, isso resulta em estudos que realizem pesquisas para novas bebidas com esse fim (AÇIK *et.al.*, 2020, MORETTI *et al.*, 2022). Realizada uma pesquisa de preferência do consumo da bebida de Kefir, obtendo como maior resultado uma bebida acrescida de frutas ou adoçado com açúcar, açúcar mascavo ou mel, amenizando a sensação ácida e facilitando seu consumo (IRMÃO, COSTA. 2018).

De acordo com Tavares et al 2021, que realizou estudo com bebidas de kefir de baixa caloria e à base de frutas adoçada com estevia e outra com açúcar mascavo, fazendo uma comparação entre as bebidas em relação as análises, aceitação sensorial e intenção de compra, obtendo como resultado potencial probiótico em ambas bebidas, em decorrência das suas bactérias lácticas e contagem de leveduras. Devido a boa aceitação

sensorial e resultados das análises satisfatórios, conclui-se a possibilidade de desenvolver bebidas de kefir de baixa caloria e à base de frutas.

Baseado na pesquisa de SOUSA, 2022 na substituição do leite, foi elaborado uma bebida à base de extrato hidrossolúvel de castanha de caju (WCNE), fermentado com a cepa probiótica *Lactobacillus paracasei*, o tempo e a temperatura de fermentação da análise foram constantes em todas as combinações, os experimentos foram realizados em triplicata, após a inoculação, os extratos foram incubados a 35°C e fermentados por 6 horas. Em seguida, o WCNE foi armazenado sob refrigeração a 4 °C ± 2 para posterior análise. Obteve-se um resultado positivo a concentração de castanha de caju influenciando significativamente ( $P < 0,05$ ) em todos os parâmetros físico-químicos e atributos sensoriais do WCNE fermentado, demonstrando-se como fator determinante para a qualidade nutricional do produto.

Avaliação do estudo de Tavares et al 2018, foi o desenvolvimento de uma bebida Kefir a base de cereias com adição de quinoa (*Chenopodium quinoa*) e saborizada com cacau em pó (*Theobroma cacao*), obtendo um produto positivo devido aceitação da análise sensorial e pela obtenção da população microbiana, conforme tabela 2, identificada nas análises realizadas no estudo. A microbiota da bebida foi analisada, e 10 bactérias (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus Kefiri*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *Tolerans*, *Lactobacillus buchneri* e *Acetobacter lavaniensis*) e 4 leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *kluveromyces lactis*, *lachancea meyersii*, *kazachtania aeróbia*) foram identificadas usando análise PCR-DGGE.

MICRO-ORGANISMO	IDENTIDADE (%)
<b>Bactérias</b>	
Lactobacillus paracasei	98
Lactobacillus parabuchneri	99
Lactobacillus Kefiri	99
Lactobacillus lactis	99
Lactobacillus casei	99
Lactobacillus paracasei subsp. Paracasei	99
Leuconostoc citreum	99
Lactobacillus paracasei subsp. Tolerans	98
Lactobacillus buchneri	99
Acetobacter lavaniensis	98
<b>Leveduras</b>	
Saccharomyces cerevisiae	100
kluveromyces lactis	99
lachancea meyersii	99
kazachantania aeróbia	99

Fonte TAVARES et al, 2018

Tabela 2 - Comunidade microbiana dos grãos de kefir e bebida fermentada kefir de quinoa com cacau, identificada por PCR-DGGE.

Ampliando as alternativas de utilização de grãos do Kefir, uma bebida a base de pituaia vermelha e polpa de maçã foi desenvolvida . As bebidas foram armazenadas a 7°C por 28 dias, sendo realizadas análises a cada 7 dias, foram realizadas análises de bactérias, pH, acidez, sólidos solúveis totais, como resultado foi aumento da capacidade de antioxidante, reduções na atividade bioativo e identificados em maiores quantidades as espécies de leveduras e bactérias *Brettanomyces bruxellensis* e *Liquorilactobacillus satsumensis*, dessa forma resulta em favorável a produção e consumo dessa bebida ( BUENO *et. al.*, 2021)

Baseado no estudo de elaboração de um Petit Suisse à base de kefir aromatizado com nibs e mel de cacau, sendo uma alternativa de sobremesa mais saudável devido valores nutricionais obtidos através das análises físico-químicos, microbiológicos e boa aceitação na análise sensorial, tendo como destaque na fermentação o aumento das bactérias lácticas que tem como importância o sabor e inibição dos patogênicos (AGAZZI *et. al.* 2022)

Recentemente, Batista et al., (2021) relataram que a ingestão de kefir pode fortalecer o DNA contra agentes degenerativos, como os que causam o Alzheimer. A composição da microbiota foi sequenciada, e a sobrevivência de células neurológicas de modelo (*Drosophila melanogaster*) foi aumentada. Assim, os autores mostraram a relação benéfica entre a ingestão da bebida Kefir e a queda da degeneração celular ligada ao Alzheimer. O Kefir é um psicobiótico, que são microrganismos probióticos que através do eixo intestino-cérebro atuam no equilíbrio microbiano intestinal e distúrbios psiquiátricos como: ansiedade, depressão, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, transtorno do espectro do Autismo e Tourette (MAGALHÃES- GUEDES et. al. 2020).

O kefir auxilia no sistema imunológico e no trato digestivo/gastrointestinal diminuindo o colesterol, alergias, cicatrização de feridas, prevenindo a intolerância à lactose causando efeitos antimutagênicos, anticancerígenos e antimicrobianos na saúde humana (LIM *et.al.*, 2019). A microflora do Kefir possui muitos microrganismos que favorecem na microbiota intestinal, efeitos antibacterianos, imunológicos, antitumorais, anticancerígenos e hipocolesterolêmicos e atividade de  $\beta$ -galactosidase. (ARSLAN 2015). Através dos microrganismos existentes no Kefir resulta na inibição do crescimento das bactérias patogênicas na mucosa intestinal (KIM *et.al.*, 2019, COSTA *et. al.*, 2022).

O Kefir é um dos principais produtos probióticos na indústria de laticínios. O Kefir é uma bebida probiótica natural, produzida a partir de grãos de Kefir (MATOS *et. al.*, 2020). São poucos produtos probióticos que são utilizados na indústria avícola para melhora de peso e crescimento da espécie, porém o Kefir devido seus resultados está sendo implementado para esse fim (CETINGUL *et. al.*, 2019).

Conforme AGAZZI *et. al.* 2022, o aumento do consumo de Kefir está em projeção baseado ao resultado de 50% de consumidores, preocupados com alimentação saudável, certamente compraria a bebida. Consumidores relataram consumir a bebida, com base nos dados dos amplos efeitos benéficos à saúde.

## 2. SUBSTRATOS ORGÂNICOS

Nos últimos anos está ocorrendo a utilização de novos substratos alternativos, formando bebidas fermentadas inovadoras e com valor agregado resultando em bebidas com alto valor nutricional (MORETTI *et al.*, 2020).

Devido a necessidade do consumidor pela busca de uma alimentação com menor ingestão de açúcar, se faz necessário elaboração de bebidas com produtos similares mais saudáveis, porém com o desafio de preservação das propriedades do produto como textura, cor, sabor e prazo de validade (SUAREZ *et. al.*, 2021). Os açúcares devido ao processamento obtém-se uma melhora visual, porém pode ocorrer alteração nos valores nutricional (IQPAL *et. al.*, 2017).

A cultura do kefir pode ser realizada em ambiente açucarado e fermentado, aquoso, leitoso ou com suco de frutas (Machado *et al* 2014). O tipo do substrato e do grão do Kefir influencia diretamente a microbiota das bebidas de Kefir de água, essas diferenças estão relacionadas às espécies encontradas em cada tipo de grão e aos nutrientes disponíveis nos substratos ( HSIEH *et. al.*, 2012)

Os microrganismos presentes nos grãos de Kefir de água possuem alta capacidade de se adaptarem a diferentes substratos, a bebida pode ser produzida a partir de uma grande variedade de fontes de açúcar (Bueno *et al.*, 2021). O uso de substratos alternativos leva à produção de bebidas funcionais com diferentes compostos metabólicos, portanto, com diferentes características sensoriais e com diferentes propriedades biológicas ( Fiorda *et al.*, 2017 ).

Os açúcares são obtidos a partir de culturas de cana-de-açúcar e beterraba, sendo o açúcar bruto (açúcar mascavo), que é um açúcar sacarose com coloração marrom devido à presença do melaço, que é um açúcar não refinado ou parcialmente refinado (IQPAL *et. al.*, 2017). O açúcar mascavo é composto por glicose, frutose e sacarose, além de outros componentes como proteínas, sólidos insolúveis e um grupo de minerais (K, Ca, P, Mg, Na, Fe, Mn, Zn e Cu).

O açúcar de coco, extraído da flor do coco (*Cocos nucifera* L.), sendo rico em proteínas, minerais, antioxidantes e vitaminas, contém 80% de sacarose, 3% de glicose e 7% de frutose, com baixo índice glicêmico, quando em relação aos açúcares refinados ( WRAGE *et.al.*, 2019; SUAREZ *et. al.*, 2021).

O estudo de BARROS *et.al.*, 2019 & SUAREZ *et.al.* 2021, foram utilizados alguns parâmetros de comparação de uma geleia adicionado diferentes substratos (cristal, mascavo e demerara). No resultado de BARROS observou que os altos teores de sólidos solúveis totais (SST), associados aos baixos teores de água e de pH, asseguram a estabilidade microbiológica do produto independentemente do tipo do substrato. De acordo com SUAREZ as geleias analisadas em diferentes substratos não afetam a elasticidade do produto, sendo assim a viabilidade da produção de uma geleia com um substrato mais saudável.

Baseado no estudo ALVES *et. al.*, 2021, de viabilidade dos micro-organismos de kefir de água, verifica-se a o favorecimento do substrato de coco em relação as LAB's e leveduras analisados, sendo as espécies que tiveram o maior percentual foram *Lactobacillus uvarum* e *Lactobacillus mali* para bactérias e para leveduras as *Lasioplodia brasiliensis* e *Saccharomyces cerevisiae*

## REFERÊNCIAS

- ABIA, Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. Faturamentos do Setor, 2020. Disponível em: <[https://www.abia.org.br/vsn/tmp\\_2.aspx?id=422](https://www.abia.org.br/vsn/tmp_2.aspx?id=422)> Acessado em 18/03/2022.
- AGAZZI, A S et.al., Kefir-based Petit Suisse: new dessert flavored with nibs and cocoa hone, **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.7, p.52682-52696,2022.
- ALVES et. al., Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition, *LWT*, 2021
- ANVISA RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018. Disponível em:<[https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241\\_26\\_07\\_2018.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2018/rdc0241_26_07_2018.pdf)> Acessado em 15/07/2022
- AHMED, B.; HOSSAIN, M.; ISLAM, R.; SAHA, A.K.; MANDAL, A. A review on natural sweetener plant stevia having medicinal and commercial importance. **Agro**, v. 73, p. 75-91, 2011
- AL-SHERAJI, S. et.al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, V. 5, 2013, p 1542-1553.
- ALIZADEH, M., AZIZI-LALABADI, M., & KHEIROURI, S., Impact of Using Stevia on Physicochemical, Sensory, Rheology and Glycemic Index of Soft Ice Cream. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 390-396,2014.
- ALMEIDA, F. A. et. al., Análise sensorial e microbiológica de kefir Artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca, *Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”*, Jan/Fev, nº 378, 66, p.51:56, 2011.
- ARSLAN A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir, *CyTA - Journal of Food*, p. 340-345, 2015
- AURELI, P.et al. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacol Res.** v.63, p. 366–376, 2011.

- BALDISSERA, A. C. et al., D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas proteicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, out./dez, 2011
- BALLUS, C. A., et. al, Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: Revisão. **Ceppa**, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.
- BARROS et. al., Efeito da adição de diferentes tipos de açúcar sobre a qualidade físico-química de geleias elaboradas com abacaxi e canela, **Revista Principia**, N.45, 2019
- BATISTA et al., Kefir metabolites in a fy model for Alzheimer's disease, **Scientific Reports**, 2021.
- BERNAUD, F., RODRIGUES, T., Dietary fiber – Adequate intake and effects on metabolism health, **Arq Bras Endocrinol Metab.** p. 57-56, 2013.
- BARROS, V.C., et al., Uma análise de consumo de alimentos probióticos com estudantes de uma instituição de ensino superior. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 202
- BLAUT, MICHAEL. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition** v. 41, p.11–16,2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 3 maio 1999. Seção 1. Disponível em:<[https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398\\_30\\_04\\_1999.html](https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/1999/prt0398_30_04_1999.html)> . Acesso em: 29 maio. 2022.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos N° 46. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. Atualizado em agosto de 2007
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alegações de propriedade funcional aprovadas**. 2014. Disponível em:  
[www.ufrgs.br/alimentus/disciplinas/tecnologia-de-alimentos-especiais/alimentos-](http://www.ufrgs.br/alimentus/disciplinas/tecnologia-de-alimentos-especiais/alimentos-)

funcionais/Anvisa\_Alegacoesdepropriedadefuncionalaprovadas.pdf. Acesso em: 13/06/2022.

BUENO, R S, et. al., Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya, **LWT**, v140, 2021.

CETINGUL, et.al., Effects of dietary supplementation of kefir on body measurements, weight of visceral organs, and gut morphology in geese, **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2019.

CAETANO D. R., Maike Montanhini T. M., Análise Microbiológica de Leite Fermentado Kefir Produzido com Leite Contaminado por Escherichia Coli, **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos** v. 5, n. 1, p. 33–38, 2014.

COSTA et. al., Preferred attribute elicitation methodology compared to conventional descriptive analysis: A study using probiotic yogurt sweetened with xylitol and added with prebiotic components, **Journal of Sensory Studies**, V.35, 2022.

DELZENNE, N.; WILLIAMS, C., Prebiotics and lipid metabolism, **Current Opinion in Lipidology**, V.13 , p 61-67. 2002.

DYSHLYUKA. L S, et. al., Using bifidobacterium and propionibacterium strains in probiotic consortia to normalize the gastrointestinal tract, **Brazilian Journal of Biology**, V. 84, 2021.

FERREIRA, A., et.al., Synergistic immunomodulatory activity of probiotics Bifidobacterium animalis and Lactobacillus casei in Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC)-infected Caco-2 cells, **Arq Gastroenterol**, v.58, 2021.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED STATES/WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic). Acesso em: 09 de maio 2022.

FOOKS, L. J.; FULLER, R.; GIBSON, G. R. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. **International Dairy Journal**. v. 9, p. 53-61,1999.

GRONNEYIK, H., FALSTAD, M., NARVHUS, J. A.. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 601-606, 2011.

GOMES, A.A. et al. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal of Dairy Science**, v.94, n.10, p.4777-4786, 2011.

HSIEH HH, Wang SY, Chen TL, Huang YL, Chen MJ. Efeitos do leite de vaca e cabra como meio de fermentação na ecologia microbiana de grãos de kefir açucarados. **Int J Food Microbiol**, p. 73-81, 2012.

IQBAL et. al., Total phenolic, chromium contents and antioxidant activity of raw and processed sugars, **Information Processing in Agriculture**, V.4, P. 83-89, 2017

IRMÃO, J S; COSTA, M R; Conhecimento e hábitos de consumo de kefir na comunidade acadêmica da UFMS, **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 1, p. 27-36, 2018.

KARIMI, R. et al. Incorporation of *Lactobacillus casei* in Iranian ultrafiltered Feta cheese made by partial replacement of NaCl with KCl. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.8, p.4209-4222, 2012.

KHALIL, T., et al., Tracing probiotic producing bacterial species from gut of buffalo (*Bubalus bubalis*), South-East-Asia. **Brazilian Journal of Biology**, v.84, 2022

KINROSS, J. M., et al., The human gut microbiome: implications for future health care. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, p.396-403, 200

KURITZA, L N, WESTPHAL P, SANTIN W E, Probióticos na avicultura. **Ciência Rural, Santa Maria** v.44,n.8, p.1457-1465,2014.

KIM et. al., Reviews Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** ,v.59, 2019.

LIM, H. W. et.al, Biochemical characteristics, virulence traits and antifungal resistance of two major yeast species isolated from kefir: *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces unisporus*. **International Journal of Dairy Technology**, p.275-281, 2019.

MACHADO, B. A. et al. Mapeamento tecnológico de patentes de kefir. *Cadernos de Prospecção*, v. 5, n. 2, p. 86, 2014

MAGALHÃES- GUEDES K T , et. al., Psychobiotics in daily food against psychiatric Disorder, **African Journal of Food Science** v.14, 2020.

MAPA, instrução normativa nº 46,Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, 2007

MAZZA, G. Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado.**Zaragoza: Editora Acribia**, 2000

MELLO, F., et. al., Efeitos benéficos do probióticos no intestino de juvenis de Tilápia-do-Nilo, *Pesq. Vet. Bras.*, v.33, p.724-730, 2013.

MENDES, T; SANTOS, J. 2021, Analysis of the landscape of probiotic products patents via INPI,Espacenet and WIPO Technological Bases, **Brazilian Journal of Development** v.7, n.12, 2021.

MIRANDA, R.F., PEREIRA C.S.S., ARAÚJO I.O., Análise da fermentação alcoólica do kefir em biorreator, **Revista Teccen.**, v.07 (1/2) p.21-26, 2014MORETTI et. al., Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient

and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization, **Future Foods**, 2022.

MORRETI, A F, et al, Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization, *Future Foods*, V 5, 2022PINEIRO, M. FAO technical meeting on prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. 156S-159S, 2008.

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

ROSA L J B et al., Viabilidade de microrganismo probiótico *Lactobacillus acidophilus* em sobremesa láctea de chocolate e ação sobre patógenos alimentares, **Food technology ciência rural**, v46, n2, p368-374, 2016.

SAFRAID, G., et. al., Profile of functional food consumer: identity and habits. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, 2022.

SAMUEL B N, et. al., Antifungal activity and inhibition of aflatoxins production by *Zingiber officinale* Roscoe essential oil against *Aspergillus flavus* in stored maize grains, **Ciência Rural** v.50, 2020

SANTOS, F L, et.al. Kefir Propriedades funcionais e gastronômicas, Cruz das Almas, Editora UFRB, 2015.

SANTOS, F. L., et al., Kefir Produção artesanal e desenvolvimento de produtos, Cruz das Almas, Editora UFRB, 2013.

SANTOS, F.L., et.al., Kefir: uma nova fonte alimentar funcional, **Diálogos & Ciência**, v.10, p.1-14, 2012.

SILVA, V, S., & ORLANDELLI, R. C. (2019). Desenvolvimento de alimentos funcionais nos últimos anos: uma revisão, **Revista Uningá**, 56, 182-194.

SOUSA T L T L et. al., Drink with probiotic potential based on water-soluble extract from cashew nuts, *CIÊNCIA RURAL*, V.52:11, 2022.

SOUZA, U.S.; DA SILVA, M.R. Avaliação de pH, acidez titulável e crescimento de massa colônica de grãos de kefir de água inoculados em extrato hidrossolúvel de arroz (*Oryza sativa*). **Higiene Alimentar**, v. 31, n. 264/265, p. 1-6, 2017.

STÜRMER E. S. et. al., A importância dos probióticos na microbiota intestinal Humana, *Rev Bras Nutr Clin*, p. 264-72, 2012.

SUAREZ et, al., Consumer profile: blackberry processing with different types of sugars, **Food Science and Technology**, P. 653 – 660, 2021.

TAVARES, P.P.L.G., SILVA, M.R., SANTOS, L.F.P., NUNES, I.L., & MAGALHÃES-GUEDES, K.T.. Produção de bebida fermentada kefir de quinoa (*Chenopodium quinoa*) saborizada com cacau (*Theobroma cacao*) em pó. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.1, p.1-7,2018.

TOMAR Q. et. al., The effects of kefir grain and starter culture on kefir produced from cow and buffalo milk during storage periods, **Food Science and Technology**, v. 40, p. 238-244, 2020.

VIZZOTTO, M., KROLOW, A., TEIXEIRA F., Alimentos Funcionais: Conceitos Básicos, **Embrapa Clima Temperado, Pelotas**, 2010

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

WSZOLEK, M.; TAMIME, A.Y.; MUIR, D.D.; BARCLAY, M.N.I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, Caprine and ovine milk with different starter cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v.34, p.251-261, 2001.

WRAGE et. al., Coconut sugar (*Cocos nucifera* L.): Production process, chemical characterization, and sensory properties, **LWT**, V.112, 2019

YASMEENA R et. al., Ameliorative effects of Lactobacillus against Aflatoxin B1, **Brazilian Journal of Biology**, V. 84, 2021.

ZENDEBOODI, F., et al., Probiotic: conceptualization from a new approach. **Food Science**, v.32, p.103-123, 2020.

ZHANG J et al, Relationship between probiotics and obesity: a review of recent research, **Food Science and Technology**, 2022

## ***Capítulo II***

---

*SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS PARA DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS KEFIR COM  
POTENCIAL PROBIÓTICO*

## CAPÍTULO II – SUBSTRATOS NÃO CONVENCIONAIS PARA DESENVOLVIMENTO DE BEBIDAS KEFIR COM POTENCIAL PROBIÓTICO

---

---

### RESUMO

Kefir é uma bebida fermentada desenvolvida através de inoculação de grãos de kefir em determinado substrato fermentativo. O açúcar mascavo é conhecido como substrato mais comum para preparação de kefir de água. Por outro lado, há escassez de estudos que avaliem a influência da aplicação de diferentes açúcares, comumente comercializados, na produção de bebida kefir. O presente estudo teve como objetivo avaliar a fermentação de grãos de kefir em distintas soluções contendo açúcares mascavo, demerara, cristal, de coco e melaço de cana. Os substratos fermentativos foram desenvolvidos considerando uma proporção de 10% do respectivo açúcar dissolvido em água, com inoculação de 10% de grãos de kefir, a fermentar por um período de 48 horas em temperatura ambiente. Foram realizadas análises de pH, acidez, sólidos solúveis, ácidos lático e acético, contagens de bactérias ácido-láticas e leveduras, além de pesagem dos grãos nos tempos 0h, 24h e 48h. O melaço de cana apresentou um processo fermentativo mais intenso, verificado pela maior produção de ácidos orgânicos e multiplicação de microrganismos. Suas contagens de bactérias ácido-láticas e leveduras foram as maiores ao fim da fermentação, de 7,46 e 7,49 log CFU/mL, respectivamente, indicando potencial probiótico. Por outro lado, o açúcar cristal resultou em fermentação mais discreta, com a menor contagem de bactérias ácido-láticas (6,87 log CFU/mL no tempo 48h). De forma geral, os resultados indicam potencial de aplicabilidade das fontes alternativas de açúcares no desenvolvimento de bebidas kefir com características físico-química e microbiológicas distintas entre si.

**Palavras-chave:** : *melaço, mascavo, kefir não-lácteo, bactérias ácido-láticas, leveduras, ácido lático.*

## ABSTRACT

Kefir is a fermented beverage developed by inoculating kefir grains into a given fermentative substrate. Brown sugar is known as the most common substrate for the preparation of water kefir. The present study aimed to evaluate the fermentation of kefir grains in different solutions containing brown, demerara, crystal, coconut and sugarcane molasses sugars. The fermentative substrates were developed considering a proportion of 10% of the respective sugar dissolved in water, with inoculation of 10% of kefir grains, to ferment for a period of 48 hours at room temperature. Analyses of pH, acidity, soluble solids, lactic and acetic acids, counts of lactic acid bacteria and yeasts were performed, as well as weighing of grains at 0h, 24h and 48h times. Their counts of lactic acid bacteria and yeasts were the highest at the end of fermentation, of 7.46 and 7.49 log CFU/mL, respectively, indicating probiotic potential. On the other hand, crystal sugar resulted in more discrete fermentation, with the lowest count of lactic acid bacteria (6.87 log CFU/mL in 48h time). In general, the results indicate potential applicability of alternative sources of sugars in the development of kefir beverages with different physicochemical and microbiological characteristics.

**Keywords:** *molasses, brown, non-dairy kefir, lactic acid bacteria, yeasts, lactic acid.*

## 1. INTRODUÇÃO

O kefir é uma bebida de origem na região das montanhas do Cáucaso, limite entre Europa e Ásia (ALMEIDA et al., 2011). O kefir pode ser considerado como uma bebida probiótica por conter microrganismos que auxiliam na manutenção de uma microbiota intestinal saudável (TAVARES et al., 2021) e seu consumo apresenta diversos efeitos positivos na saúde humana, tais como: controle do colesterol e glicemia, potencial anti-hipertensivo e anti-inflamatório, dentre outros (ROSA et al., 2017). O kefir de água é o grão de kefir cultivado em solução contendo açúcar e água (MIGUEL et al., 2011). Dessa forma, trata-se de bebida probiótica isenta de leite (RANDAZZO et al., 2016).

O grão de kefir é formado por microrganismos que desenvolvem o processo fermentativo na presença de fontes energéticas, como sacarose (WALSH, et al., 2016). Trata-se de junção de bactérias ácido-láticas, ácido-acéticas, leveduras e fungos filamentosos (TOMISLAV et al., 2013; AGAZZI et al 2022). As bactérias mais comuns são: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Oenococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc*. Quanto às leveduras, o gênero *Saccharomyces* é o mais predominante (KUMAR et al., 2021). As fermentações resultantes do metabolismo dos microrganismos do kefir, como alcoólica, láctica e acética, são capazes de gerar uma bebida rica em ácidos, como lático e acético, além de outros metabólitos, tais como etanol, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos. Essas substâncias são responsáveis pelas características sensoriais únicas do kefir (WESCHENFELDER et al., 2011).

A sacarose é o principal substrato fornecido para a fermentação do kefir de água (PLETSCH; RAAB, 2018). Diversas são as fontes de sacarose no mercado de alimentos. Como exemplos: o açúcar de coco, obtido através da seiva do coqueiro (PRIJONO; RACHMATIKA, 2019); o melão de cana, subproduto da indústria processadora da cana-de-açúcar (LUO et al., 2018); açúcar refinado de cana e suas versões com menor processo de refino (demerara e mascavo) (MOHAN; SINGH, 2020). O açúcar mascavo é a fonte energética mais comum no desenvolvimento de kefir de água (BORGUINI; TORRES, 2006; BETTANI et al., 2014; TAVARES et al., 2018), por outro lado, o uso de outras fontes de carboidrato pode ser capaz de gerar bebidas com características únicas. De acordo com Silva et al. (2009), açúcares refinados e não refinados podem afetar diferentemente a microbiota do kefir, dessa forma, produzindo bebidas com acidez e concentração de microrganismos e metabólitos variadas. Sendo assim, o objetivo do

presente estudo foi desenvolver bebidas kefir com diferentes substratos fermentativos, avaliando o processo fermentativo através de análises físico-químicas e microbiológicas.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAL**

*Melaço, açúcar de coco, açúcar mascavo, açúcar cristal e açúcar demerara foram comprados no mercado local de Salvador, Bahia, Brasil. Os grãos de kefir foram doados pela Universidade Federal do Recôncavo Baiano (UFRB).*

### **2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.1 Preparo dos substratos e fermentação**

Preparou-se cinco substratos distintos, cada um contendo 280 mL água deionizada e 35 g de seu respectivo tipo de açúcar (cristal, de coco, demerara, mascavo, melaço de cana). Acrescentou-se 35 g de grãos de kefir de água ao substrato, o que representou um volume de 10% do conteúdo total. A fermentação ocorreu durante um período de 48 horas, em temperatura ambiente, no Laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Farmácia da UFBA, em frascos de vidro de 500ml, destampados e com suas aberturas protegidas com tecido poroso para proteger de entrada de vetores e não comprometer a passagem de ar. A temperatura foi acompanhada com uso de termômetro digital à prova d'água (AK05 - AKSO).

#### **2.2.2 Análise da Cinética de Fermentação**

Para as análises físico-químicas, usou-se como base a metodologia da Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2019). Official methods of analysis of AOAC international. (21st ed.). Gaithersburg: AOAC International. Para as análises microbiológicas, usou-se American Public Health Association (APHA). (2015). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. (5th ed.). Washington: APHA Press.

As Análises realizadas foram:

**pH:** A análise do pH foi determinado por potenciometria direta, através do pHmetro digital (modelo K39-1014B, Kasvi).

**Brix:** A determinação de sólidos solúveis foi realizada por refratometria digital através da medida do °Brix, em refratômetro (modelo DR 201-95, Kruss). com escala 0 a 32 °Brix.

**Acidez titulável:** Foram pipetadas 10 ml das amostras de kefir transferidas para um frasco Erlenmeyer adicionando-se 50 ml de água, 3 gotas da solução de fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 N, até atingir a coloração rósea.

**Contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras:** Para contagem de bactérias utilizou o meio MRS (Man Rogosa Sharpe) suplementado com 100mg/L de cicloheximida e para contagem de leveduras, utilizou-se o meio Ágar Saboraud suplementado com 50mg/L de cloranfenicol. Realizou-se diluições seriadas das amostras de 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> para ambas as análises, com posterior plaqueamento em superfície, de acordo com a APHA (2015).

**Ácidos láctico e acético:** Foram identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (Series 200, Perkin Elmer) usando uma coluna de polypore H de 220 mm x 4,6 mm x 10 µm (Perkin Elmer), volume de injeção: 10 µL, detector Uv-Vis a 220nm, fluxo: 0,8 mL / min e fase móvel: água ultrapura acidificada com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a pH 2,0. Os picos correspondentes a cada ácido foram identificados a partir dos tempos de retenção de acordo com os padrões.

**Estatística:** Os resultados foram avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA). Todas as análises foram realizadas em triplicata e o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) foi aplicado para as comparações das médias. Um heatmap clusterizado foi elaborado no aplicativo ClustVis Webtool, com distância de clusterização euclidiana e algoritmo ward como método de clustering.

### *2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO*

A Tabela 1 apresenta os resultados encontrados para os parâmetros de sólidos solúveis totais (BRIX), pH e acidez dos diferentes substratos fermentativos de kefir. Quanto aos sólidos solúveis, de forma geral, houve redução discreta de seus valores ao longo do período analisado, o que é justificado pelo metabolismo dos microrganismos, capazes de

utilizar os açúcares presentes no meio e convertê-los em metabólitos, como os ácidos acético e láctico. Por sua vez, a maior presença de ácidos no meio é capaz de reduzir o pH e aumentar sua acidez. Tavares et al. (2018) e Agazzi et al (2022) relataram que a produção de ácido durante a fermentação do kefir é de grande importância, devido ao seu efeito inibitório tanto na deterioração do produto quanto na presença de microrganismos patógenos.

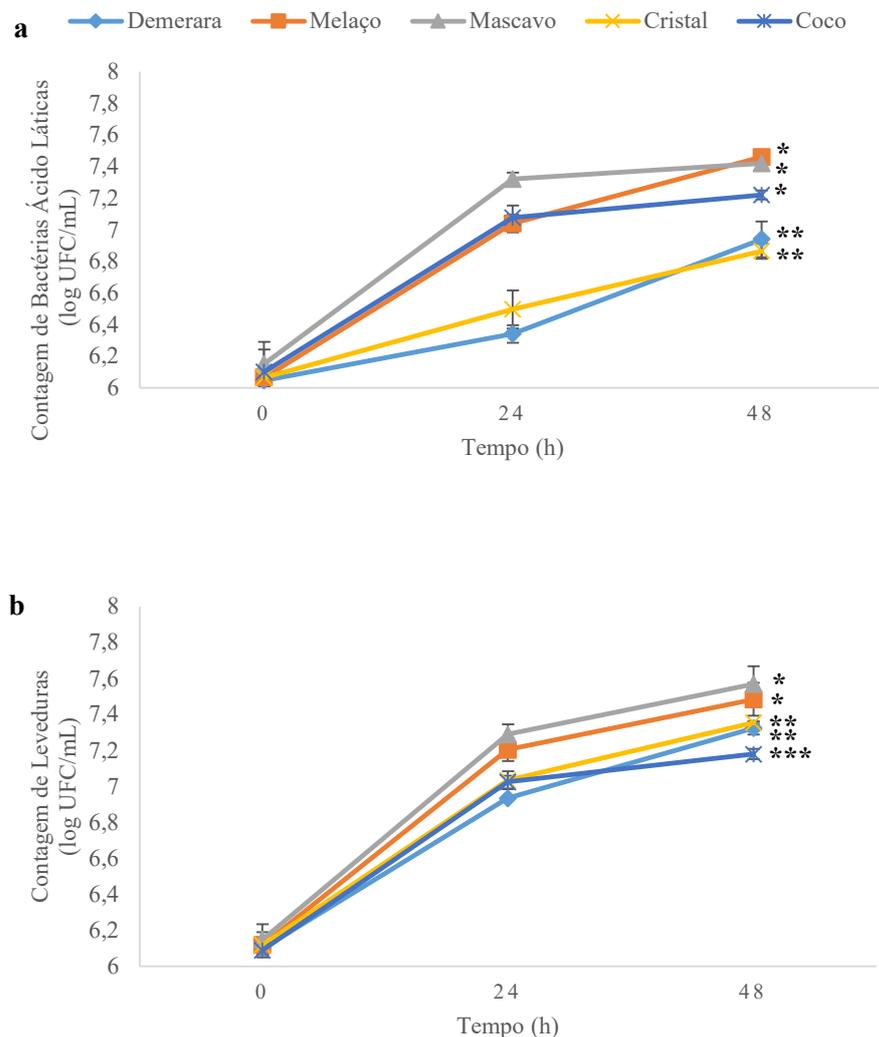
	°Brix			pH			Acidez (% m/v)		
	0h	24h	48h	0h	24h	48h	0h	24h	48h
<b>Demerara</b>	10,47 <sup>bA</sup> ±0,11	10,37 <sup>bB</sup> ±0,05	10,83 <sup>aB</sup> ±0,05	3,23 <sup>cC</sup> ±0,04	3,11 <sup>cB</sup> ±0,01	2,87 <sup>cA</sup> ±0,01	0,29 <sup>cC</sup> ±0,05	1,22 <sup>cB</sup> ±0,02	1,95 <sup>dA</sup> ±0,02
<b>Melaço</b>	8,17 <sup>cA</sup> ±0,05	7,80 <sup>dB</sup> ±0,1	7,38 <sup>dB</sup> ±0,02	4,17 <sup>bC</sup> ±0,01	3,17 <sup>cB</sup> ±0,01	2,79 <sup>dA</sup> ±0,01	1,01 <sup>aC</sup> ±0,01	2,87 <sup>aB</sup> ±0,11	6,48 <sup>aA</sup> ±0,02
<b>Mascavo</b>	10,03 <sup>dA</sup> ±0,05	9,68 <sup>cB</sup> ±0,02	9,47 <sup>cB</sup> ±0,05	4,25 <sup>aC</sup> ±0,02	3,48 <sup>bB</sup> ±0,08	3,01 <sup>bA</sup> ±0,00	0,47 <sup>bC</sup> ±0,05	2,56 <sup>bB</sup> ±0,03	4,61 <sup>cA</sup> ±0,02
<b>Cristal</b>	10,80 <sup>aA</sup> ±0,05	10,73 <sup>aAB</sup> ±0,05	11,10 <sup>aAB</sup> ±0,30	3,15 <sup>dC</sup> ±0,02	3,00 <sup>dB</sup> ±0,02	2,80 <sup>dA</sup> ±0,01	0,20 <sup>cC</sup> ±0,05	1,21 <sup>cB</sup> ±0,01	1,61 <sup>eA</sup> ±0,01
<b>Coco</b>	10,27 <sup>cA</sup> ±0,05	9,77 <sup>cB</sup> ±0,05	8,60 <sup>cB</sup> ±0,10	4,15 <sup>bC</sup> ±0,01	4,00 <sup>aB</sup> ±0,01	3,74 <sup>aA</sup> ±0,01	0,43 <sup>bC</sup> ±0,05	2,75 <sup>aB</sup> ±0,08	4,90 <sup>bA</sup> ±0,08

**Tabela 1:** Análises físico-químicas realizadas em bebidas kefir com diferentes substratos fermentativos.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Os resultados nos tempos 0h, 24h e 48h são apresentados sob forma de média ± desvio padrão. Letras minúsculas iguais no mesmo tempo de fermentação indicam que não há diferença estatística para distintas amostras. Letras maiúsculas iguais nos distintos tempos de fermentação indicam que não há diferença estatística para a mesma amostra.

O substrato contendo açúcar de coco apresentou redução mais significativa de seus sólidos solúveis totais. Alves et al. (2021) também verificaram redução significativa para esse parâmetro em kefir de água desenvolvido com açúcar de coco e inulina. Para o pH e a acidez das bebidas é possível verificar relação inversa, onde, na medida em que o pH reduziu, a acidez aumentou durante a fermentação. O melaço como substrato fermentativo resultou em uma redução de pH mais intensa. Já sua acidez titulável apresentou o aumento mais significativo, em comparação com os demais substratos. A maior intensidade do processo fermentativo no melaço pode se justificar pelo seu maior teor de glicose (CHOTINEERANAT et al., 2010), em comparação com as demais amostras (SEGUÍ et al., 2015; LUO et al., 2018). De acordo com Laureys e De Vuyst (2017), a glicose é o substrato preferido durante a fermentação do kefir de água, justificando os resultados encontrados para o presente estudo.

A Figura 1 indica as contagens de bactérias ácido-láticas e leveduras ao longo do processo fermentativo do kefir. O padrão de crescimento microbiano reflete a dinâmica de fermentação em relação à utilização de substrato e produção de metabólitos durante a fermentação (TU et al., 2019). Percebe-se que os substratos desenvolvidos com melaço e açúcar mascavo obtiveram contagens de microrganismos estatisticamente maiores que os demais. Por outro lado, para a contagem de bactérias (Figura 1a), os açúcares cristal e demerara resultaram em substratos com menor potencial de crescimento, enquanto, para as leveduras (Figura 1b), o substrato com açúcar de coco apresentou valores inferiores. De acordo com Lynch et al. (2021), um pH inicial baixo pode se associar com um comprometimento do processo fermentativo, como no caso das bebidas desenvolvidas com açúcar demerara e cristal, que apresentaram pH de 3,23 e 3,15, respectivamente, e obtiveram valores reduzidos de contagens de microrganismos

**Figura 1:** Comportamento das bactérias ácido-láticas (a) e leveduras (b)<sup>2</sup>

Fonte: autoria própria, 2022.

Em estudo, Tu et al. (2019) verificaram crescimento de microrganismos no kefir de água para valores acima de 7,00 logUFC/mL para bactérias lácticas e leveduras. No presente estudo, resultados semelhantes foram encontrados, onde, apenas as amostras produzidas com demerara e cristal não apresentaram contagens acima de 7,00 (para BAL) após o fim do processo fermentativo. Isto indica que as contagens encontradas, de forma geral,

<sup>2</sup> Figura 1 – Comportamento das bactérias ácido-láticas (a) e leveduras (b) durante o processo de fermentação de grãos de kefir em distintos substratos fermentativos. Os asteriscos indicam grupos sem diferença estatística (\*, \*\* ou \*\*\*), de acordo com o teste de Tukey realizado para os resultados no tempo 48h.

estariam dentro da recomendação para que as bebidas sejam consideradas como potencialmente probióticas (MINELLI; BENINI, 2008; TAVARES et al., 2021).

Em relação aos microrganismos do kefir, estudo prévio realizou análise PCR-DGGE com os mesmos grãos utilizados no presente trabalho (TAVARES et al., 2018) (Tabela 2) e foram encontradas bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, além das leveduras *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Lachancea* e *Kazachstania*. As bactérias do gênero *Lactobacillus* apresentam atividade probiótica comprovada, principalmente, pela sua capacidade de auxiliar na imunidade corporal e na defesa contra microrganismos patógenos (CORTHÉSY; GASKINS; MERCENIER, 2007). Especificamente, *Lactobacillus kefir* produz vitaminas durante a fermentação, sendo capaz de enriquecer o fermentado nutricionalmente (MAGALHÃES-GUEDES et al., 2020). Quanto às leveduras, *Saccharomyces cerevisiae* também apresenta potencial imunomodulador, por estimular a resposta proliferativa específica de linfócitos T e possui atividade antibacteriana (FAKRUDDIN; HOSSAIN; AHMED, 2017).

**Tabela 2:** Microrganismos presentes no grão de kefir utilizado para fermentação de substratos alternativos

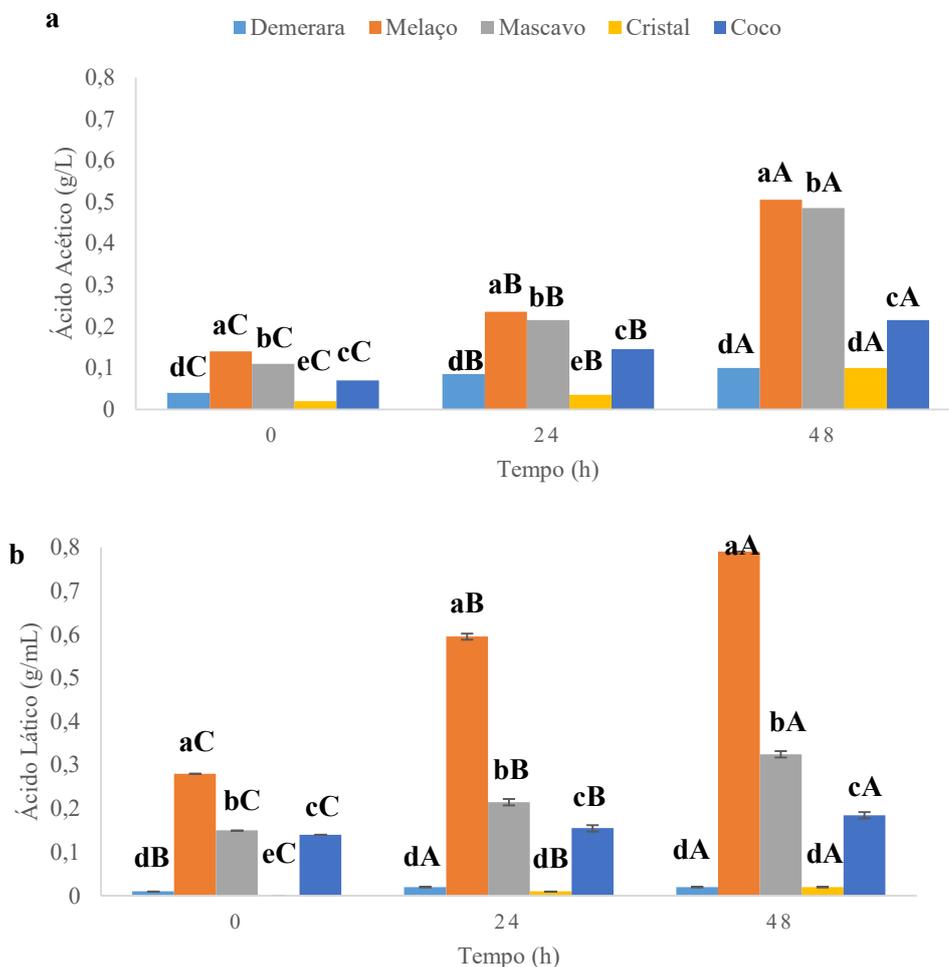
Espécies
<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> subespécie <i>paracasei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i> subespécie <i>tolerans</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>
<i>Leuconostoc citreum</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>
<i>Acetobacter lovaniensis</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Lachancea meyersii</i>
<i>Kazachstania aerobia</i>

Fonte: TAVARES et al., 2018.

A Figura 2 trata da produção de ácidos orgânicos pelos microrganismos do kefir durante o processo fermentativo. Corroborando com os resultados encontrados na Figura

1, percebe-se que, por conta do maior número de microrganismos nos substratos fermentados com melão e açúcar mascavo, é possível verificar neles também maior presença de ácidos láctico e acético. De acordo com Viana et al. (2017), os ácidos orgânicos são metabólitos dos grãos de kefir. A presença deles, portanto, é esperada, e produzem efeitos de interesse no produto, como inibição da proliferação de patógenos, além do sabor próprio da bebida fermentada (AGAZZI et al., 2022; VIANA et al., 2017). Os resultados para ácido láctico se aproximaram dos apresentados por Destro et al. (2019), de 0,78 g/L para kefir elaborado com açúcar mascavo e jabuticaba. Por outro lado, Magalhães et al. (2010), verificaram valores maiores de ácido acético ao fim da fermentação de kefir de água brasileiro tradicional, o que pode indicar menor intensidade de metabolismo das bactérias ácido-acéticas no processo de produção das bebidas do presente estudo. De acordo com Puerari, Magalhães e Schwan (2012), a maior concentração de ácidos orgânicos pode ser um fator que comprometa a aceitação sensorial de bebida kefir, pela tendência a um paladar mais inclinado ao gosto doce, em detrimento da acidez. No caso do presente estudo, as bebidas desenvolvidas com açúcar cristal e demerara podem apresentar maior aceitação do mercado consumidor por conta dos menores valores de ácidos.

**Figura 2** Comportamento dos ácidos acético (a) e lático (b)<sup>3</sup>



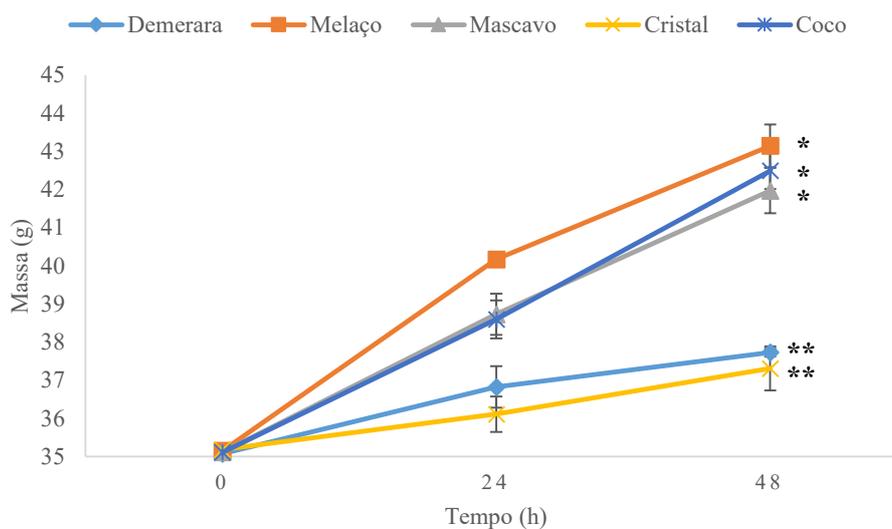
Fonte: autoria própria, 2022.

Quanto à biomassa de grãos de kefir, a Figura 3 trata do seu comportamento em diferentes substratos fermentativos. Estatisticamente, as bebidas kefir fermentadas com melaço, açúcar de coco e mascavo apresentaram maior massa de grãos. Por outro lado, demerara e cristal estimularam um menor crescimento da biomassa de kefir ao fim do processo fermentativo. Os grãos fermentados no meio contendo melaço apresentaram o maior percentual de crescimento (19,15%) em 48h. Dessa forma, com o intuito de produção de biomassa, esse substrato obteve melhores resultados. Já os grãos em meio

<sup>3</sup> Figura 2. Comportamento dos ácidos acético (a) e lático (b) durante o processo de fermentação de grãos de kefir em distintos substratos fermentativos. Letras minúsculas iguais no mesmo tempo de fermentação indicam que não há diferença estatística para as distintas amostras. Letras maiúsculas iguais nos distintos tempos de fermentação indicam que não há diferença estatística para a mesma amostra, de acordo com o teste de Tukey.

de açúcar cristal aumentaram apenas em 5,71% do seu peso inicial. Uma possível explicação para isso é que os microrganismos do kefir apresentam seu metabolismo comprometido na presença de açúcares refinados, talvez por apresentarem características deletérias, como um pH baixo (ÇEVIK et al., 2019).

**Figura 3** Crescimento da biomassa de grãos de kefir<sup>4</sup>



Fonte: autoria própria, 2022.

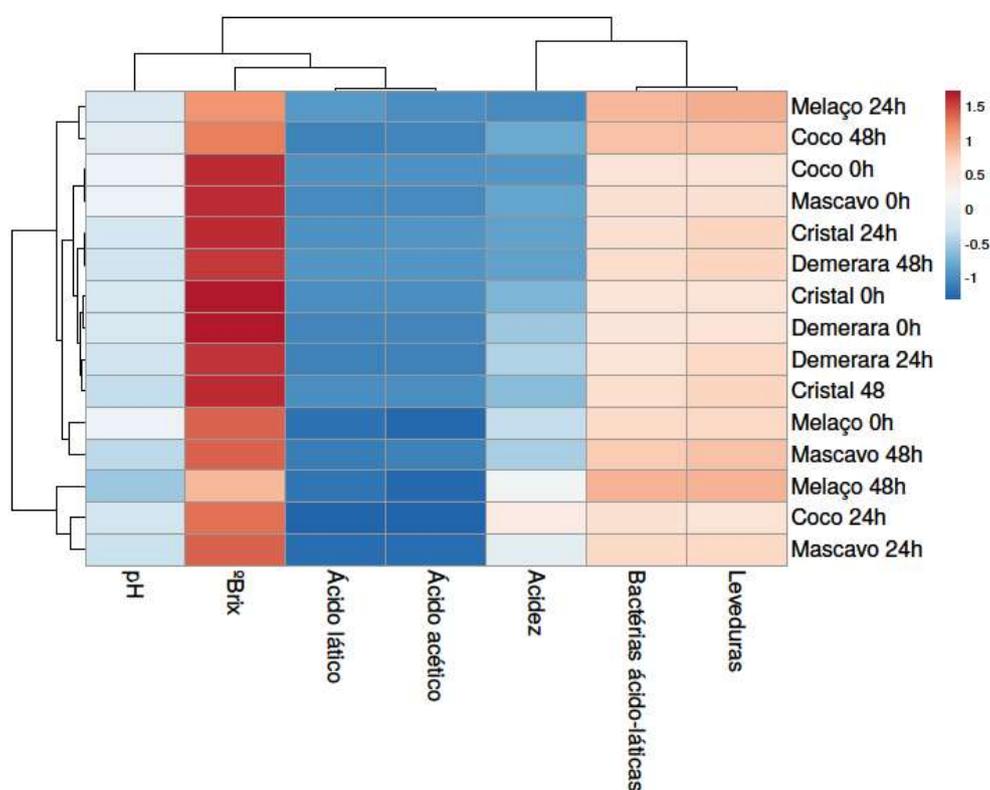
O agrupamento da análise estatística multivariada sob forma de *Heatmap* está apresentado na Figura 4. A análise foi realizada considerando os parâmetros físico-químicos e microbiológicos das bebidas fermentadas, de acordo com o tipo de açúcar utilizado e o tempo de fermentação. Pode-se observar a formação de 2 clusters maiores entre as análises. O primeiro cluster, à esquerda, se subdivide em: pH; °Brix; Ácidos láctico e acético. O cluster à direita se subdivide em Acidez; Bactérias ácido-láticas e Leveduras. Quanto às amostras, percebe-se que estão em maior grau de subdivisão. Há uma divisão inicial em 2 clusters maiores. O cluster abaixo apresenta as amostras coco 24h e mascavo 24h e melaço 48h. Essas bebidas apresentaram características

<sup>4</sup> Figura 3. Crescimento da biomassa de grãos de kefir durante o processo de fermentação em distintos substratos fermentativos. Os asteriscos indicam grupos sem diferença estatística (\*, \*\* ou \*\*\*), de acordo com o teste de Tukey realizado para os resultados no tempo 48h.

semelhantes, em geral, com altas contagens de bactérias ácido-láticas e fermentação mais intensa. Em contrapartida, as bebidas contendo açúcar cristal e demerara também formaram clusters entre si, indicando que são semelhantes por conta do processo fermentativo menos perceptível, além de contagens menores de microrganismos, sendo menos indicadas para o desenvolvimento das bebidas kefir.

**Figura 4:** Análise multivariada sob forma de Heatmap dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos das bebidas kefir fermentadas em diferentes substratos.

Fonte: autoria própria, 2022.



Fonte: autoria própria, 2022.

### 3 CONCLUSÃO

Em termos gerais, os açúcares avaliados no presente estudo resultaram em bons substratos para desenvolvimento de novas bebidas kefir. As bactérias ácido-láticas e leveduras foram capazes de se multiplicarem de forma aceitável, gerando bebidas com potencial probiótico e de características distintas entre si. Os substratos contendo melaço de cana e açúcar mascavo apresentaram processos fermentativos mais intensos, verificados através de maior contagem de microrganismos e produção de ácidos orgânicos. Isto pode ser

explicado por serem açúcares com características intrínsecas mais interessantes. Por outro lado, os substratos contendo açúcares cristal e demerara ocasionaram uma fermentação mais discreta. Novos estudos são necessários de forma a avaliar a influência desses novos substratos na aceitação sensorial das bebidas kefir.

## REFERÊNCIAS

- AGAZZI A S *et al.* Kefir-based Petit Suisse: new dessert flavored with nibs and cocoa honey / Petit Suisse à base de Kefir: nova sobremesa aromatizada com nibs e mel de cacao. **Brazilian Journals Publicações de Periódicos**, v. 8, n. 7, 2022.
- ALMEIDA, F. A. *et al.* Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e leite de vaca. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 378, p 51-56, 2011.
- ALVES, V. *et al.* Development of fermented beverage with water kefir in water-soluble coconut extract (*Cocos nucifera* L.) with inulin addition. **LWT**, v. 145, 2021.
- APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. Washington: APHA Press. 2015.
- BETTANI, S. R. *et al.* Avaliação físico-química e sensorial de açúcares orgânicos e convencionais. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, p. 155-162, 2014.
- BORGUINI, R. G.; TORRES, E. A. F. S. Alimentos orgânicos: Qualidade nutritiva e segurança do alimento. **Segurança Alimentar e nutricional**, p. 64-75, 2006.
- CHOTINEERANAT, S. *et al.* Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Sugar Tech**, v. 12, p. 120–124, 2010.
- CORTHÉSY, B.; GASKINS, H.R.; MERCENIER, A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. **Journal of Nutrition**, 2007.
- ÇEVIK, T. *et al.* The Effect of Different Sugars on Water Kefir Grains. **Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology**, v. 7. 2019.
- DESTRO, T.M. *et al.* Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation. **Food Science and Technology**, v. 43, 2019.
- FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, M.N.; AHMED, M. M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 2017.
- KUMAR, M.R. *et al.* Metagenomic and phytochemical analyses of kefir water and its subchronic toxicity study in BALB/c mice. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, p. 183, 2021.
- LAUREYS, D.; DE VUYST, L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 3, 719-732, 2017.
- LUO, J.; GUO, S.; WU, Y.; WAN, Y. Separation of Sucrose and Reducing Sugar in Cane Molasses by Nanofiltration. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, p. 913–925, 2018.

- LYNCH, K.M. *et al.* An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, 2021.
- MAGALHÃES-GUEDES, K.T. *et al.* Effect of kefir biomass on nutritional, microbiological, and sensory properties of mango-based popsicles. **International Food Research Journal**, v. 27, n. 3, p. 536–545, 2020.
- MAGALHÃES, K.T. *et al.* Brazilian kefir: structure microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 26, p. 1241–1250. 2010.
- MATOS *et. al.*, Nanoscale morphology, structure and fractal study of kefir microbial films grown in natura, *Polímeros Ciências e Tecnologia*, 2020.
- MIGUEL, M. G. C. P. *et al.* Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States, **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n.8, p. 1875-1884. 2011.
- MINELLI, E.B.; BENINI, A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effects, **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 20, n. 4, p. 180-183. 2008.
- MOHAN, N.; SINGH, P. Sugar and Sugar Derivatives: Changing Consumer Preferences, 1st ed., Buch, Fachbuch, 2020.
- PLETSCH, K.; RAAB, F. Taste and flavour modulation with organic acids in sugar confectionery. **Facts. Basel, Switzerland: Jungbunzlauer**. 2018.
- PRIJONO, S.; RACHMATIKA, R. Potency of Brown Sugar as a Nectar Substitute for *Trichoglossus haematodus* in Captivity. **Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education**, v. 11, n. 2, p. 186-193, 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.
- RANDAZZO, W. *et al.* Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40-51, 2016.
- ROSA, D. D. *et al.* Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n.1, 82-96, 2017.
- SEGUÍ, L. *et al.* Physicochemical and antioxidant properties of non-refined sugarcane alternatives to white sugar. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 50, p. 2579-2588, 2015.
- SILVA, K.R. *et al.* Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, p. 316-325, 2009.

TAVARES, G. et al. Chemical, microbiological and sensory viability of low-calorie, dairy-free kefir beverages from tropical mixed fruit juices. **CyTA - Journal of Food**, v. 19, n. 1, p. 457-464. 2021.

TAVARES, G. et al. Produção de bebida fermentada kefir de quinoa (*Chenopodium quinoa*) saborizada com cacau (*Theobroma cacao*) em pó. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 13, n. 4, e5593. 2018.

TOMISLAV, Pogačić. et al. Microbiota of kefir grais, **Mljekarstvo**, p. 3-14, 2013.

TU, C.; AZI, F. et al. Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains, **LWT**, v. 113, 2019.

VIANA, R. O. et al. Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: Microbial, chemical and sensory analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 592-601. 2017.

WALSH, Aaron M., et al. Microbial Succession and Flavor Production in the Fermented Dairy Beverage Kefir, **ASM Journals mSystems**, v. 1 , 2016.

WESCHENFELDER, S. et al. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473-480. 2011.