

ESTUDO DA FERMENTAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS UTILIZANDO KEFIR DE ÁGUA

MARIA, Tamiris Cristine¹

Faculdades Integradas Maria Imaculada - FIMI
tami_cris24@hotmail.com

RODRIGUES, Lucas Oliveira²

Faculdades Integradas Maria Imaculada - FIMI
lucasedurodrigues@outlook

DEZIDERIO, Marcela Aparecida³

Universidade de São Paulo, USP- FZEA
marceladeziderio@gmail.com

MALDONADO, Rafael Resende⁴

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP
ratafa@yahoo.com.br

RESUMO

Os alimentos funcionais são uma forte tendência na indústria alimentícia devido à comprovada relação entre o consumo desses alimentos e os benefícios para saúde do consumidor. Os probióticos são uma opção bastante acessível de alimento funcional e dentre eles, os fermentados a base de Kefir vem ganhando grande destaque em anos recentes devido às inúmeras propriedades benéficas associadas a esse tipo de bebida. O objetivo deste estudo foi avaliar a fermentação de extratos vegetais (amêndoas, arroz, aveia, castanha do Brasil, coco e soja) fermentados por Kefir de água para produção de bebida probiótica não láctea. Os extratos vegetais foram produzidos pela extração dos compostos hidrossolúveis em água na proporção de 10 % m/m das fontes vegetais e a fermentação foi realizada em temperatura ambiente, por 24 horas, sem agitação, com 5 % m/m de grãos de Kefir, com e sem adição de sacarose ao meio de fermentação. As bebidas foram caracterizadas quanto às propriedades físico-químicas (concentração de sólidos solúveis, pH, acidez titulável e concentração de extrato seco), fermentativas (crescimento celular, rendimento da bebida e produção de CO₂) e microbiológica (contagem de

¹Graduanda em Química Industrial pelas Faculdades Integradas Maria Imaculada.

²Graduando em Química Industrial pelas Faculdades Integradas Maria Imaculada.

³Mestre em Engenharia de Alimentos (2019) pela Universidade de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA/USP), Bacharel em Química Industrial (2013) pelas Faculdades Integradas Maria Imaculada (FIMI).

⁴Doutor em Engenharia de Alimentos (2012), Mestre em Engenharia de Alimentos (2006), Licenciado em Química (2012) e Engenheiro de Alimentos (2005) pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Docente do Colégio Técnico de Campinas (COTUCA) do Instituto Federal de São Paulo (IFSP), das Faculdades Integradas Maria Imaculada (FIMI) e do Instituto Educacional São Francisco (IESF) nos cursos de Alimentos, Nutrição e Química.

bactérias lácticas). Os resultados obtidos indicaram que a cultura de Kefir de água utilizada foi capaz de fermentar todos os extratos avaliados e que a suplementação com sacarose aumentou a atividade fermentativa. A concentração final de sólidos solúveis variou entre 0,1 e 5,1 °Brix, o pH entre 4,53 e 6,10, a acidez titulável entre 0,07 e 0,57% m/v de ácido láctico e os sólidos totais entre 0,60 e 12,0% m/m. O maior crescimento celular foi de 99,7% m/m (bebida de castanha do Brasil com sacarose), maior rendimento de bebida de 96,3% (bebida de extrato de coco) e maior produção de CO₂ (bebida de castanha do Brasil). Todos os fermentados apresentaram contagem de bactérias lácticas superiores a 10⁶ UFC/mL, o que permite classificá-los como probióticos, sendo a maior concentração verificada na bebida de castanha do Brasil com sacarose (5,6.10¹⁰ UFC/mL). Desse modo, o estudo demonstrou ser viável obter bebidas probióticas de diferentes extratos vegetais fermentadas por Kefir de água com e sem adição de sacarose.

Palavras chave: Fermentação. Kefir. Extratos Vegetais.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais foram inicialmente estudados a partir da década de 1980 pelos japoneses como sendo aqueles alimentos que apresentam algum ingrediente bioativo. (PALANCA et al., 2006). Nos dias atuais um alimento considerado funcional deve afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além da função básica de nutrir o corpo. Eles devem ser relevantes para o bem-estar e a saúde do consumidor bem como ajudar a reduzir o risco de doenças (ROBERFROID, 2002). No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamentou os alimentos funcionais pela resolução RDC nº 02 de 07 de janeiro de 2002, que aprova o regulamento técnico de probióticos e de substâncias bioativas isoladas, alegando propriedade funcional para saúde. Em outra resolução, de 23 de outubro de 2007, o MAPA (Ministério da agricultura pecuária e abastecimento) estabelece que para utilização de microrganismos na produção de alimentos, estes devem ser viáveis, em grande maioria e estarem ativos, no produto final, de acordo com seu prazo de validade, com no mínimo 10⁶ UFC/g de bactérias lácticas os totais e 10⁴ UFC /g de leveduras.

Dentre os alimentos funcionais destacam-se aqueles produzidos por fermentação à base de Kefir. Devido à sua composição variada eles são conhecidos na medicina popular pelos seus efeitos probióticos, ou seja, possuem microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde quando consumidos em proporções adequadas (SANTOS et al., 2003).

Na Europa, as bebidas a base de Kefir são consumidas há vários séculos e são bastante populares em diversas regiões. Já no Brasil, a utilização começou a se difundir no século

passado e ainda encontra-se principalmente ligada à produção artesanal, ao consumo familiar e às pesquisas científicas, que vem crescendo nos últimos anos, principalmente no desenvolvimento de novos produtos (FERREIRA, 1999; PALANCA et al., 2006; WESCHENFELDER et al., 2011).

O Kefir é uma cultura microbiana constituída principalmente por bactérias do gênero *Lactobacillus* e leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyverromyces*, *Candida* e *Pichia*. Os grãos apresentam formato parecido ao de uma couve flor, são brancos ou amarelados e de consistência elástica. Na camada periférica ficam as formas bacilares (lactobacilos) e ao centro ficam localizadas as leveduras (AQUARONE; BORZANI; SCHIMIDELL, 2001; ATHANASIADSES et al. 2002).

Segundo Garrote et al., 2006, os grãos de Kefir possuem de 890 a 900 g/kg de água, 2 g/kg de lipídios, 30 g/kg proteínas, 60 g/kg açúcares e 7 g/kg de cinzas. Além da composição dos macronutrientes, os grãos de Kefir também podem ter em sua composição vitaminas do complexo B devido ao metabolismo das leveduras; aminoácidos diversos como a treonina, a lisina e valina; minerais como o potássio, cálcio, magnésio, cobre, zinco e ferro, dentre outros. De acordo com o MAPA, 2007 os parâmetros do fermentado à base de Kefir devem ser: pH entre 4,2 a 4,6; ácido láctico entre 0,5 a 1,5 % (m/m); álcool entre 1,5 a 3,0 % (m/m); gordura entre 0,5 a 6,0 % (m/m) e teor de proteínas mínimo de 2,9 % (m/m), dependendo do meio a ser utilizado para fermentação.

Os grãos de Kefir são bastante versáteis, podendo ser cultivados em diferentes meios, como água açucarada, suco de frutas e leites. Diariamente os grãos de Kefir podem aumentar 5% (m/m) cultivados em leite e 45% (m/m) cultivadas em água açucarada (SANTOS; BASSO, 2013). Os grãos podem ser reutilizados para novas fermentações, o crescimento é rápido e de boa qualidade devido a vários fatores, como a não lavagem dos grãos, a não pressão deles em peneiras e uma boa agitação periódica durante o processo de extração.

O produto fermentado à base de Kefir deve apresentar as características de homogeneidade e consistência cremosa, sabor levemente acidulado, picante e ligeiramente alcoólico (AQUARONE; BORZANI; SCHIMIDELL, 2001). Além disso, as bebidas de Kefir possuem atividade de β -galactosidase, principal enzima responsável pela digestão da lactose. A presença dessa enzima auxilia na digestão da lactose reduzindo os efeitos sobre os consumidores que possuem algum grau de intolerância à lactose. Estudo realizado em seres humanos adultos com intolerância à lactose demonstrou que a adição de Kefir aumentou a digestão da lactose tão bem quanto o consumo de um iogurte e reduziu em 65% as flatulências geradas em comparação ao consumo do leite comum. Análises físico-químicas

também demonstraram que após 36 horas de fermentação com Kefir os níveis de lactose na bebida caem a níveis aceitáveis para consumidores intolerantes a esse açúcar (HERTZLER; CLANCY, 2003; BERNE, 2004; TERRA, 2007).

A maioria das bebidas fermentadas probióticas, incluindo as fermentadas por Kefir, possuem como principal matéria-prima leite ou seus derivados, o que dificulta o consumo por pessoas com intolerância à lactose ou aos que possuem alergia a proteínas do leite. Estudos recentes têm investigado a possibilidade da utilização de outras fontes para produção de fermentados lácticos de origem não láctea, como por exemplo, os produtos de origem vegetal. Cereais, frutas, nozes, grãos e legumes pode ser uma boa alternativa para o desenvolvimento de novos produtos probióticos não lácteos, pois são isentos de lactose, de proteínas alergênicas do leite, de colesterol e também atingem público consumidor de dieta vegetariana ou vegana (RAHTORES; SALMÉRON; PANDIELLA, 2012; MÄKINEN et al., 2015; KANDYLIS et al., 2016; SHORI, 2016).

A soja é a principal matéria-prima vegetal explorada na produção de produtos não lácteos, porém outras opções como aveia, coco e castanhas também vêm aparecendo como alternativas nesse mercado. Fontes vegetais podem ser excelentes substratos para o desenvolvimento microbiano devido a quantidades elevadas de nutrientes, minerais, vitaminas e açúcares. O extrato de soja é rico em proteínas, o extrato de coco é rico em lipídeos e o extrato de castanha do Brasil possuem teores relativamente elevados de carboidratos, proteínas e lipídeos. Apesar disso, as condições de cultivo de microrganismos probióticos em extratos vegetais devem ser bem estudadas, pois pode haver dificuldade de desenvolvimento desses microrganismos em função do baixo teor de açúcares simples, de fatores antinutricionais e antimicrobianos presentes nesses substratos. (SANTOS, 2012; MÄKINEN et al., 2015; KANDYSLIS et al., 2016; SHORI, 2016).

Desse modo, o objetivo principal deste estudo foi produzir bebidas não lácteas fermentadas por Kefir utilizando extratos vegetais (arroz, amêndoas, aveia, coco, castanha do Brasil e soja) com e sem adição de sacarose. As bebidas foram caracterizadas do ponto de vista físico-química, fermentativo e microbiológico através das análises de concentração de sólidos solúveis (SS), pH, acidez titulável, concentração de sólidos totais (Extrato seco), crescimento celular (Δm), rendimento da bebida (R), produção de CO_2 e contagem de bactérias lácticas nos diferentes extratos avaliados.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultura de Kefir e matérias primas

A cultura de Kefir de água foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Bioprocessos da Faculdade de Zootecnia da Universidade de São Paulo – *campus* de Pirassununga, São Paulo. Os diferentes tipos de extratos vegetais utilizados foram: extrato de arroz, de amêndoas, de aveia, de coco, de castanha do Brasil e de soja, com e sem a suplementação com sacarose. As matérias-primas utilizadas para produção dos extratos vegetais foram adquiridas em supermercados na cidade de Mogi Guaçu, São Paulo.

2.2 Preparo dos extratos vegetais

Os extratos vegetais foram preparados em recipientes individuais de maneira similar. Para cada extrato foi pesado 100 g de matéria-prima para produção de 1000 g de extrato, utilizando água mineral q.s.p (quantidade suficiente para), de forma que todos os extratos obtidos apresentaram proporção de 10 % (m/m) de matéria-prima.

Após a pesagem, os materiais foram transferidos para liquidificador e triturados por 10 minutos, após esse tempo fez-se a filtração com filtros de pano para separação dos resíduos sólidos. Em seguida foi feita a pasteurização, por 5 minutos em 80°C, para eliminação de micro-organismos patogênicos não esporulados. (NOGUEIRA, et al., 2016).

Para alguns extratos houve a necessidade de etapas prévias à trituração. Para o extrato de arroz houve pré-cozimento de 30 minutos em proporção previamente definida com água mineral 10 % (m/m) para que os grãos hidratassem e facilitasse a extração. Para o extrato de amêndoas, essas ficaram imersas em água mineral durante 24 horas para posterior retirada das cascas. Para o preparo do extrato de soja, os grãos foram imersos em água mineral a 95 °C e homogeneizados por 5 minutos para liberação da proteína, desodorização e inativação do fator anti-tripsina, em seguida essa água foi descartada, houve resfriamento até 35 °C e seguiu-se o procedimento como para os demais extratos (JAEKEL; RODRIGUES; SILVA, 2010).

Após toda a extração foi adicionado quantidade suficiente de sacarose para padronização dos extratos vegetais com concentração de sólidos solúveis de 5 °Brix. Os extratos foram comparados com e sem suplementação com sacarose.

2.3 Fermentação

Os extratos vegetais obtidos foram inoculados com grãos de Kefir de água na proporção de 5 % (m/m) (grãos/extrato vegetal). Foram utilizados 50 g de extrato vegetal em cada fermentação. Após a inoculação, as formulações foram armazenadas em copos plásticos e recobertas com papel toalha, para reduzir os riscos de contaminação do ambiente e permitir a vazão de gases decorrentes da fermentação. Todas as formulações foram feitas em triplicatas e mantidas sem agitação por 24 horas em temperatura ambiente (± 25 °C). Para a caracterização das bebidas obtidas, após a incubação, foi feita a separação dos grãos de Kefir da bebida fermentada com o auxílio de uma peneira (NOGUEIRA, et al., 2016).

2.4 Caracterização físico-química

Todos os métodos analíticos para caracterização físico-química foram baseados no Manual de Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

A análise de sólidos solúveis (SS, °Brix) foi realizada antes (SS₀) e após a fermentação (SS_f) através de leitura direta em refratômetro portátil (Instrutemp, modelo ITREF 25). A medida do pH foi realizada por leitura direta das amostras antes e após a fermentação em pHmetro digital (Digmed, modelo DM 20).

Para análise de acidez titulável foram pipetados 5,0 mL da bebida fermentada, que foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL, adicionou-se água destilada para aumentar o volume útil e 3 gotas de fenolftaleína como indicador do ponto de viragem. As amostras foram tituladas com solução NaOH 0,1 mol.L⁻¹ até o aparecimento da coloração rosa. A concentração de ácidos foi calculada a partir do volume gasto da base e os resultados expressos em g de ácido láctico/100 mL da amostra. Essa análise foi realizada no início e no fim do período de fermentação.

A determinação do extrato seco foi realizada em placas de Petri previamente pesadas (m₁) vazias em balança analítica, em seguida pesou-se a massa de extrato vegetal ou bebida fermentada (m₂). As placas foram levadas para estufa por 3 horas a 105 °C e após a secagem foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente. Realizou-se a pesagem do conjunto final seco (m₃). A partir das massas medidas foi calculada a porcentagem de extrato seco pela equação 1.

$$ES (\%) = \frac{m_2 - (m_3 - m_1)}{m_2} \times 100 = (\%m/m) \quad (1)$$

2.5 Parâmetros fermentativos

A determinação do crescimento celular (Δm , %), foi realizada com as massas de grãos de Kefir (g), que foram pesadas antes (m_{ko}) e após a fermentação (m_{kf}) em balança semi-analítica (OHAUS). O cálculo do crescimento celular foi realizado de acordo com a equação 2 (NOGUEIRA, et al., 2016).

$$\Delta m (\%) = \frac{[(mkf - mko) * 100]}{mko} \quad (1)$$

$$\Delta m (\%) = \frac{[(mkf - mko) * 100]}{mko} \quad (2)$$

O cálculo do rendimento das bebidas fermentadas (R, %), foi realizado com as massas das bebidas fermentadas iniciais (m_{E0}) e finais (m_{Ef}), medidas em balança semi-analítica, conforme equação 3 (NOGUEIRA, et al., 2016).

$$R (\%) = \frac{mEf}{mE0} \times 100 \quad (3)$$

A análise de produção de CO_2 também utilizou os dados obtidos na pesagem das massas iniciais e finais dos extratos vegetais e dos grãos de kefir realizadas em balança semi-analítica e o cálculo foi realizado de acordo com a equação 4 (AOKI et al., 2017).

$$\%CO_2 = [(m_{ko} + m_{E0}) - (m_{kf} + m_{Ef})] \times 2 \quad (4)$$

2.6 Análise Microbiológica

A análise microbiológica foi realizada através da contagem de células em meio de cultura MRS Agar (Man, Rogosa and Sharp) da marca Acumedia. O meio foi preparado conforme recomendação do fabricante na proporção de 7 % (m/v). O meio foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos em autoclave (marca Catel) e depois resfriado e mantido a 45 °C em banho-maria (marca Marconi) com agitação ocasional para manter-se em estado líquido. Em seguida preparou-se água peptonada 0,1% (m/v), que foi utilizada para as diluições seriadas. As amostras foram diluídas de forma sucessiva de 10^{-1} até 10^{-8} em relação ao valor inicial. Na sequência pipetou-se 1 mL das diluições 10^{-4} até 10^{-8} que foram inoculadas nas placas de Petri contendo o meio MRS e fez-se a adição de uma sobrecamada de meio para manter o inóculo em profundidade e em condição de microaerofilia. As placas foram incubadas a 37 °C por 48

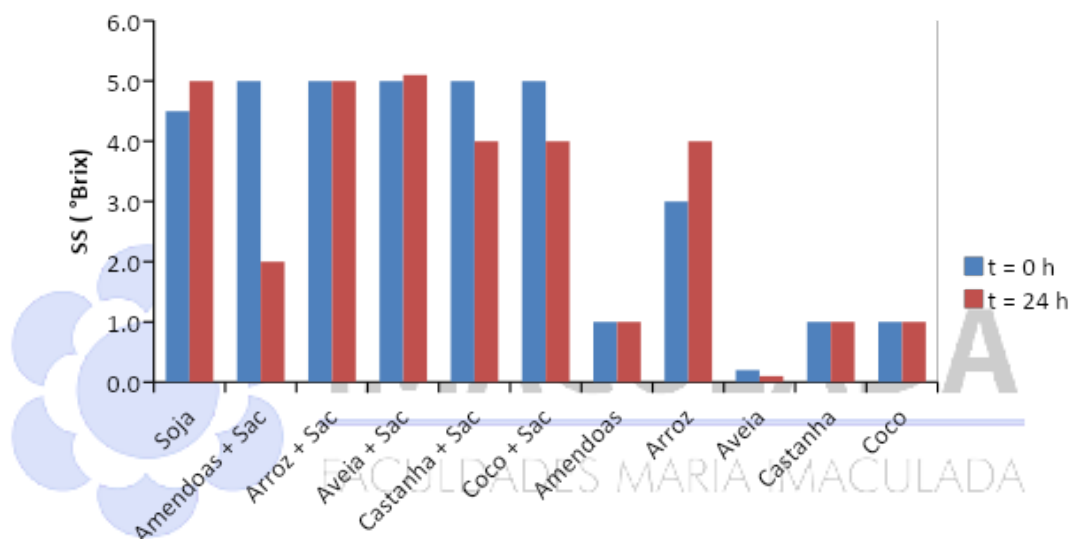
horas em estufa bacteriológica. Após esse período realizou-se a contagem das colônias de bactérias em contador de colônias (marca Marconi) (SIQUEIRA, 1995).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico-química

Os resultados de sólidos solúveis (SS, °Brix) no início e no final de cada fermentação estão apresentados na figura 1.

Figura 1 – Valores médios (n = 3 replicatas), de sólidos solúveis (SS, °Brix), para bebidas de extratos vegetais fermentadas por kefir de água.



Fonte: Autores, 2017.

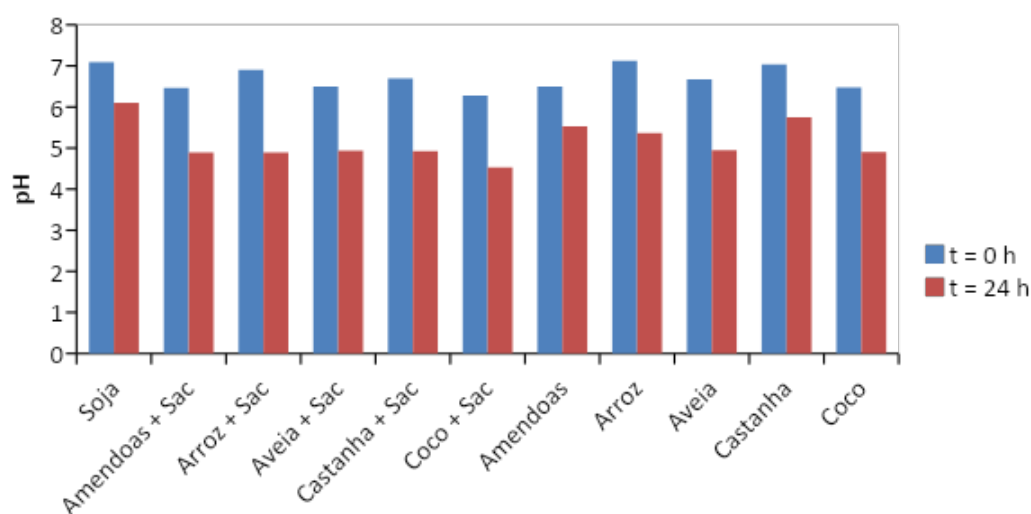
Os resultados mostrados na figura 1 indicam que os SS nos extratos produzidos variaram entre 0,2 (aveia) até 4,5 °Brix (soja), sendo que com exceção do extrato de soja e de arroz, os demais não ultrapassaram 1,0 °Brix. Tais resultados podem ser a quantidade de matéria-prima utilizada para fabricação dos extratos 10 % (m/m) e as concentrações e composições características das espécies utilizadas. Segundo a tabela TACO 2011, extrato hidrossolúvel de soja apresenta SS igual 4,3 °Brix, compatível com o encontrado nesse estudo. Arroz e aveia crus apresentam respectivamente 25,8% e 66,6% de carboidratos, mas há de se considerar que nem todos os carboidratos são solúveis em água, uma vez que esses vegetais possuem quantidade apreciável de amido. Amêndoas (29,5%), castanha do Brasil (15,1%) e coco (10,4%) diluídos em dez vezes deveriam apresentar extratos entre 1,0 e 3,0 °Brix dependendo do grau de extração, o que é compatível com os resultados obtidos.

Outros estudos presentes na literatura apontam para resultados semelhantes. Carvalho et al., 2011 obtiveram extrato de soja com SS igual 13 °Brix com uma proporção de 25 % (m/m) de soja na preparação da bebida, o que na proporção de 10% (m/m) corresponderia a 5,2 °Brix. Felberg et al., 2008 ao produzir bebidas de extrato de soja e castanha do Brasil verificaram teores de carboidratos de 32 e 11% (m/m) nas matérias-primas, que diluídos em dez vezes corresponderiam a extratos com 1 a 3 °Brix, compatível com o encontrado em nosso estudo. Jaekel et al., 2010 também obtiveram extratos de soja com SS entre 3,0 e 4,5 °Brix e relataram que o arroz apresentaram concentrações bem menores de nutrientes.

Após a fermentação verificou-se que a maioria dos extratos não apresentou variações significativas na concentração de sólidos solúveis, com à exceção do extrato de amêndoas suplementado com sacarose. A pequena variação de sólidos solúveis em fermentações com bactérias lácticas e com culturas de kefir está relacionado ao fato de que grande parte dos açúcares consumidos na fermentação são convertidos em ácidos e/ou álcoois, que também são sólidos solúveis, conforme verificado anteriormente por Nogueira et al., 2016 na produção de bebidas mistas de leite e açaí fermentadas por kefir e por Maldonado et al., 2017 (A) na produção de fermentados lácticos de soro de leite e frutas tropicais.

Os resultados do pH no início e no final de cada fermentação estão mostrados na figura 2.

Figura 2 – Valores médios (n = 3 replicatas) de pH para bebidas de extratos vegetais fermentadas por kefir de água.



Fonte: Autores, 2017.

Os resultados de pH demonstram que houve fermentação em todas as condições analisadas, uma vez que houve queda de pH ao longo do tempo de fermentação, característica principal da fermentação láctica, em que parte dos açúcares fermentescíveis são convertidos em ácido láctico. É possível observar também que os extratos que foram suplementados com sacarose apresentaram maior redução de pH do que os extratos originais. Tal fato indica que o baixo teor de SS nos extratos originais não inviabiliza o processo fermentativo, mas tem como consequência uma menor acidificação das bebidas.

As amostras foram comparadas quanto ao pH inicial e final através do teste de média de Tukey ($p = 0,05$). A análise indicou haver diferença significativa tanto entre os extratos quanto entre as bebidas finais. Em relação ao pH inicial a menor diferença significativa (MDS) foi de 0,01 o que indica que todos os extratos iniciais eram estatisticamente diferentes quanto ao pH. Após a fermentação, o valor de MDS foi de 0,13, o que permitiu separar as bebidas em seis grupos estatisticamente diferentes, que foram em ordem decrescente: grupo a (bebida de soja), grupo b (bebida de castanha do Brasil), grupo c (bebida de amêndoas), grupo d (bebida de arroz), grupo e (bebidas de amêndoas + sacarose, arroz + sacarose, aveia, aveia + sacarose, castanha do Brasil + sacarose e coco), grupo f (bebida de coco + sacarose). A adição de sacarose, portanto causou como efeito significativo a maior acidificação das bebidas suplementadas do que as bebidas com os extratos originais (com exceção das bebidas de aveia). Além disso, houve uma maior homogeneidade no pH final das bebidas suplementadas com sacarose, sendo que todas as que receberam adição de sacarose apresentaram pH estatisticamente igual (com exceção da bebida de coco).

Os resultados de pH obtidos nesse estudo com os extratos vegetais suplementados com sacarose são comparáveis a outros citados na literatura, observadas as diferenças de cultura de kefir, forma de preparo de matéria-prima e condições de fermentação. Silva Fernandes et al., 2017 partindo de um extrato de soja (proporção 1:8, SS inicial 4,90 °Brix e pH inicial 6,62) obtiveram uma bebida fermentada por kefir com pH final 4,53 (após 15 h de fermentação a 25 °C e armazenamento de 4 dias a 4 °C), valor inferior ao desse estudo (6,10), porém similar aos valores de pH obtidos com os extratos suplementados com sacarose (4,53 a 4,93). Sirirat & Jelena, 2010 obtiveram fermentados de extrato de arroz com duas culturas de kefir com pH final de 4,27 e 4,41 (a partir de extrato de arroz integral, proporção 1:3, 24 horas de fermentação, ~25 °C, com 10% v/v de grãos de kefir), bastante similar ao pH final (4,89) da bebida fermentada de extrato de arroz adicionado de sacarose. Em outro estudo, Cui et al., 2013 obtiveram pH final de 4,16 para bebida fermentada de extrato de noz nas condições ótimas (pH inicial 6,68, 30 °C, 12 h de fermentação, 3 % m/m de grãos de kefir e 8 % m/v de

sacarose), bastante similar aos valores obtidos com os extratos de amêndoas (pH inicial 6,46 e final 4,89) e de castanha do Brasil (pH inicial 6,69 e final 4,93) suplementados com sacarose. Os resultados de acidez titulável estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1– Valores médios (n =3 replicatas) para acidez titulável das bebidas de extratos vegetais fermentados por kefir de água. Amostras marcadas com letras diferentes apresentam diferença estatisticamente significativa (p = 0,05).

Bebida	A (g/100 mL)	
	t = 0 h	t = 24 h
Soja	(0,10 ± 0,00) ^b	(0,18 ± 0,00) ^f
Amêndoas +sacarose	(0,11 ± 0,00) ^a	(0,57 ± 0,00) ^a
Arroz + sacarose	(0,07 ± 0,00) ^c	(0,11 ± 0,00) ^h
Aveia + sacarose	(0,02 ± 0,00) ^f	(0,11 ± 0,00) ^h
Castanha do Brasil + sacarose	(0,05 ± 0,00) ^d	(0,23 ± 0,00) ^d
Coco + sacarose	(0,08 ± 0,00) ^c	(0,33 ± 0,00) ^c
Amêndoas	(0,05 ± 0,00) ^d	(0,38 ± 0,00) ^b
Arroz	(0,03 ± 0,00) ^e	(0,08 ± 0,00) ⁱ
Aveia	(0,02 ± 0,00) ^f	(0,07 ± 0,00) ^j
Castanha do Brasil	(0,05 ± 0,00) ^d	(0,16 ± 0,00) ^g
Coco	(0,03 ± 0,00) ^e	(0,21 ± 0,00) ^e

Fonte: Autores, 2017.

A acidez titulável é outro indicador de atividade fermentativa que, em geral, aumenta com a diminuição de pH, mas nem sempre o perfil de acidez titulável acompanha o perfil de pH, uma vez que de acordo com a composição do meio de fermentação pode haver uma estabilização do pH devido a efeito tamponante do meio mesmo com o aumento da acidez titulável proveniente da atividade metabólica dos microrganismos, efeito esse descrito, por Maldonado et al. 2017 (A) na fermentação láctica de frutas tropicais. De fato ao se observar os resultados de acidez nota-se que ela não seguiu a ordem inversa de pH, por exemplo a amostra de maior acidez total (bebida de amêndoas + sacarose) é diferente de menor pH (bebida de coco + sacarose). Também nota-se uma diferenciação maior entre a acidez (dez grupos estatisticamente diferentes) *versus* o pH (seis grupos estatisticamente diferentes). Destaca-se ainda que todos os extratos apresentaram baixo nível de acidez inicial (máximo 0,11%) e também níveis de acidez final também baixos (máximo 0,57%), bem inferiores aos que se verificam para fermentados lácticos.

Em comparação com a literatura observa-se que a acidez das bebidas de arroz 0,08 e 0,11% (m/v) foram bem inferiores aos valores obtidos por Sirarit e Jelena, 2010 que obtiveram valores entre 0,49 e 0,55 % (m/v) em ácido láctico para bebidas de extrato de arroz

fermentadas por dois tipos de kefir. Cui et al., 2013 obtiveram 0,65 % (m/v) de ácido láctico na bebida fermentada de extrato de noz, valor similar ao obtido na bebida fermentada de extrato de amêndoas suplementada com sacarose 0,57 % (m/v). Em outro estudo, Dinkçi et al., 2015 obtiveram acidez total entre 0,47 e 0,88 % (m/v) para bebidas mistas de leite de vaca e extrato de aveia 20 a 60% (v/v) de extrato de aveia 13% (m/v); 20 horas de fermentação a 25 °C, com 3% (m/m) de grãos de kefir, valor bastante superior ao verificado para as bebidas de extrato de aveia 0,07 a 0,11% (m/v).

3.2 Sólidos totais (extrato seco)

Os resultados para sólidos totais (extrato seco) encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Valores médios (n = 3 replicatas) para sólidos totais (extrato seco) de bebidas de extratos vegetais fermentadas por kefir de água.

Bebida	Sólidos totais (% m/m)	
	t = 0 h	t = 24 h
Soja	4,88	5,00
Amêndoas +sacarose	6,07	6,50
Arroz + sacarose	6,69	7,21
Aveia + sacarose	4,41	4,40
Castanha do Brasil + sacarose	11,7	12,0
Coco + sacarose	7,74	8,11
Amêndoas	5,42	5,99
Arroz	1,30	1,44
Aveia	0,57	0,60
Castanha do Brasil	3,15	3,66
Coco	3,34	4,00

Fonte: Autores, 2017.

Os valores de sólidos totais são um bom indicativo da quantidade de material que foi extraído das matérias-primas vegetais durante a preparação dos extratos. Verifica-se pela tabela 2 que os valores são bastante variáveis, de 0,57 % (extrato de aveia) até 6,07 % (extrato de amêndoas). Verifica-se também a adição da sacarose pelo incremento na quantidade de sólidos totais nos extratos suplementados em relação aos extratos originais. É possível notar ainda que há um pequeno aumento da quantidade de extrato total após 24 horas de fermentação, o que pode estar relacionado com a síntese de compostos como os exopolissacarídeos que são produzidos pelas culturas de kefir ao longo do processo fermentativo.

3.3 Parâmetros fermentativos

Os resultados de rendimento da bebida fermentada R% (m/m) e crescimento celular Δ m% (m/m) e produção de gás carbônico (% CO₂) são importantes formas de se avaliar o desenvolvimento das culturas de kefir. Os dados obtidos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3– Valores médios (n = 3 replicatas) de crescimento celular (X, %m/m), de rendimento de bebidas fermentada (R, % m/m) e produção de CO₂ (CO₂, % m/m) para bebidas de extratos vegetais fermentadas por kefir de água. Amostras marcadas com letras diferentes apresentam diferença significativa com p = 0,05.

Bebida	X (% m/m)	R (% m/m)	CO ₂ (% m/m)
MDS (p = 0,05)	2,7	2,4	2,4
Soja	(29,0 ± 0,5) ^d	(89,1 ± 0,8) ^{d,e}	(9,5 ± 0,7) ^{c,d}
Amêndoas +sacarose	(24,8 ± 0,1) ^f	(83,9 ± 0,2) ^{g,h}	(14,9 ± 0,3) ^{a,b}
Arroz + sacarose	(35,5 ± 0,2) ^c	(84,3 ± 0,2) ^g	(13,9 ± 0,2) ^b
Aveia + sacarose	(25,8 ± 0,6) ^{e,f}	(87,6 ± 0,1) ^{e,f}	(11,2 ± 0,2) ^c
Castanha do Brasil + sacarose	(99,7 ± 0,3) ^a	(86,5 ± 0,4) ^{f,g}	(8,5 ± 0,4) ^{d,e}
Coco + sacarose	(61,2 ± 1,3) ^b	(93,2 ± 0,6) ^{b,c}	(3,7 ± 0,6) ^f
Amêndoas	(19,5 ± 2,6) ^g	(90,9 ± 0,2) ^{c,d}	(8,2 ± 2,3) ^{d,e}
Arroz	(3,2 ± 0,3) ⁱ	(93,5 ± 0,2) ^b	(6,3 ± 0,2) ^e
Aveia	(13,9 ± 0,7) ^h	(89,7 ± 1,2) ^{d,e}	(9,7 ± 1,3) ^{c,d}
Castanha do Brasil	(27,8 ± 0,1) ^{d,e}	(81,8 ± 0,2) ^h	(16,9 ± 0,3) ^a
Coco	(18,8 ± 0,33) ^g	(96,3 ± 0,4) ^a	(2,7 ± 0,4) ^f

Fonte: Autores, 2017.

A tabela 3 indica que houve uma grande variação no crescimento celular de 3,2 % (bebida de arroz) até 99,7% (bebida de castanha do Brasil + sacarose). A adição de açúcar ao meio de fermentação foi um fator que estimulou o crescimento da cultura de kefir para todos os extratos, o que era algo esperado, uma vez que a cultura utilizada é própria para crescimento em solução açucarada. A composição de cada extrato vegetal certamente influencia o crescimento da cultura avaliada, o extrato de arroz mostrou ser o mais pobre em nutrientes para crescimento do kefir, entretanto a suplementação com sacarose foi muito eficiente passando de um crescimento de 3,2 % para 35,5% (aumento de mais de 10 vezes). Para outros extratos, a suplementação não foi tão significativa, como no caso do extrato de amêndoas para o qual o crescimento passou de 19,5 para 24,8%.

Dados encontrados na literatura apontam um crescimento celular de 0,19%/ horas (equivalente a 4,56% em 24 horas) para fermentado de extrato de soja com grãos de kefir (Lee, Na & Lee, 2006), valor bastante inferior ao verificado nesse estudo (29,0%). Maldonado et al., 2017 (B) por sua vez obtiveram crescimento mais próximo de (18,9%) de uma cultura de kefir de água em extrato de soja comercial (SS inicial = 9,0 °Brix).

Com relação ao crescimento celular, em geral, observa-se um menor rendimento de bebida fermentada quando há um maior crescimento celular, uma vez que um maior número de células leva a um maior consumo de substrato. Na comparação dos resultados obtidos é possível notar que a maioria dos extratos suplementados com sacarose, cujo crescimento celular foi maior, apresentou menor rendimento de bebida fermentada (a exceção se deu com a bebida de extrato de castanha do Brasil). Rendimentos superiores a 90% foram obtidos por Nogueira et al., 2016 ao utilizar cultura de kefir de água para produzir bebidas mistas fermentadas de leite com açaí em diferentes proporções. Maldonado et al., 2017 (B) por sua vez, obtiveram rendimentos entre 85 e 95% (m/m) para produção de bebidas mistas de leite e extrato de soja em diferentes proporções fermentadas por kefir de água, resultados que são similares aos obtidos nesse estudo com os diferentes extratos vegetais utilizados.

A produção de CO₂ está relacionada à atividade das leveduras presentes na cultura de kefir. Os resultados obtidos nesse estudo (3,7 a 16,9 %) estão na mesma ordem de grandeza dos resultados obtidos para mesma cultura de kefir quando aplicada para fermentação de misturas de leite de vaca e extrato de soja (variando de 4,3 a 13,3%), AOKI et al., 2017. A adição de sacarose também aumentou a produção de CO₂ (exceto para bebida de castanha do Brasil), indicando que o aumento de SS favoreceu o metabolismo das leveduras presentes na cultura utilizada.

De modo geral, pode-se dizer que todos os extratos avaliados apresentaram condições para o desenvolvimento da cultura avaliada e que a suplementação com sacarose melhorou o desempenho dos substratos, proporcionando altas taxas de crescimento celular para todos os extratos.

3.4 Análise microbiológica

A contagem de bactérias lácticas em meio MRS permite avaliar se as bebidas produzidas apresentam caráter probiótico. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4– Contagem de bactérias lácticas em bebidas de extratos vegetais fermentadas por kefir de água.

Bebida	Bactérias lácticas (UFC/mL) x 10⁻⁸
Soja	24
Amêndoas +sacarose	122
Arroz + sacarose	3
Aveia + sacarose	377
Castanha do Brasil + sacarose	558
Coco + sacarose	25
Amêndoas	17
Arroz	3
Aveia	56
Castanha do Brasil	65
Coco	118

Fonte: Autores, 2017.

Os dados da tabela 4 indicam as bebidas obtidas contém uma alta concentração de bactérias lácticas, que variam da ordem de 10^{-8} a 10^{-11} UFC/mL dependendo do extrato avaliado, o que permite classificar as bebidas produzidas como probióticas com relação à concentração de bactérias lácticas. Os extratos que receberam suplementação com sacarose apresentaram, em geral, maior concentração de bactérias lácticas (com exceção da bebida de arroz que manteve o mesmo nível e a bebida de coco com sacarose que apresentou maior concentração na forma original). Os resultados da contagem de bactérias lácticas, de modo geral, estão correlacionados com o crescimento celular medido pelo crescimento dos grãos da cultura de kefir.

De acordo com a literatura, Cui et al., 2013 obtiveram contagens de bactérias lácticas da ordem de 10^{-8} UFC/mL para bebida fermentada de extrato de noz, semelhante aos resultados das bebidas de amêndoas e castanhas que variaram entre 10^{-9} e 10^{-10} UFC/mL. Silva

Fernandes et al., 2017 chegaram a contagem da ordem de 10^9 UFC/mL em bebida fermentada de extrato de soja, mesma ordem de grandeza encontrada nesse estudo para a bebida de extrato de soja. Já no estudo de Dinikçi et al., 2015 os resultados foram menores, da ordem de 10^6 UFC/mL para bebidas fermentadas mistas de leite de vaca e extrato de aveia.

4 CONCLUSÃO

A partir dos dados do presente estudo foi possível verificar que todos os extratos vegetais avaliados (amêndoas, arroz, aveia, castanha do Brasil, coco e soja) foram substratos adequados para a produção de bebidas fermentadas probióticas utilizando Kefir de água. Todas as bebidas obtidas são isentas de lactose, proteínas do leite e colesterol por serem de origem vegetal. Os extratos originais de soja e de castanha do Brasil apresentaram os maiores crescimentos celulares próximos a 30% (m/m) e com a suplementação com sacarose houve aumento do crescimento celular que atingiu cerca de 100% (m/m) (na bebida de castanha do Brasil + sacarose). Os rendimentos das bebidas variaram entre 81 e 96% (m/m) e, em geral, houve redução do rendimento com aumento do crescimento celular. O consumo de SS foi relativamente baixo ao longo da fermentação, devido a conversão dos açúcares fermentescíveis em outros compostos solúveis tais como ácido láctico e etanol. Houve redução do pH e aumento da acidez ao longo da fermentação, sendo que a redução de pH foi mais intensa nas bebidas suplementadas com sacarose. Por fim, em todas as bebidas, a quantidade de bactérias lácticas foi superior a 10^8 UFC/mL, o que permite classificá-las como bebidas probióticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Regulamento de alimentos funcionais. Instrução Normativa n. 02, 07 Jan 2002, Diário oficial da união, Brasília, 2002. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf> Acesso em: 06 Abr. 2017.

AQUARONE, E; et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo. 4.ed. Edgard Blucher, 2001. v.3, p. 520-523.

AOKI, B.N.P, et al. Mixed fermented beverage from orange and milk fermented by kefir. In Caderno de Resumos do XXI Sinaferm/XII Sheb, Aracaju, 2017.

ATHANASIADES, I, et al. Whey liquid waste of dairy industry as raw material for postable alcohol production by kefir granules, **Jornal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, v. 50, n.4, p. 7231-7234, 2002. Disponível em: <www.scholar.com.br/sholar?q=athanasiades+jornal+of+agricultural+food+chemistry+athanasiasdes+jornal+2001&btng/pubs.acs.org/doi/abs/10.102/jf020331> Acesso em: 01 maio 2017.

BERNE, R. M. **Fisiologia**. 5.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. v.1, p.636.

CARVALHO, W. T. D, et al. Características físico-químicas de extratos de arroz integral, quirera de arroz e soja. **Pesquisa Agropecuária**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 422-429, 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/acao/bitstream/doc/899855/resumo_arthur_final_corrigo.pdf> Acesso em: 08 Nov 2017.

CUI, X. H. et al. Fermentation conditions of walnut milk beverage inoculated with kefir grains. **LWT-Food Science and Technology**, v.50, n.1, p.349-352, 2013. Disponível em: <http://www2.ufrb.edu.br/kefirdoreconcavo/images/condi%c3%A7%b5es_de_fermenta%a7%a3o_da_bebida_de leite_no_z_inoculados_com_gr%a3os_de_kefir.pdf> Acesso em: 12 Nov 2017.

DINKÇI, N. et al. An innovative approach, cow/oat milk based kefir. **Mljekarstvo**, 2015, v.3, p. 177-186. Disponível em: <https://researchgate.net/publication/292401032_An_innovatide_approach_cowat_milk_base_d_Kefir.com> Acesso em: 03 Nov 2017.

FELBERG, I, et al. Bebida mista de extrato de soja integral e castanha-do-brasil: caracterização físico-química, nutricional e aceitabilidade do consumidor. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.15, n.2, p.163-174, 2008. Disponível em: <www.researchgate.net/publication/49599673_bebida_mista_de_extrato_de_soja_integral_e_castanha_do_brasil_caracterizacao_fisico_quimica_nutricional_e_aceitabilidade_do_consumidor.com> Acesso em: 11 Nov 2017.

FERRREIRA, C.L.L.F. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de Kefir**, 1999, 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010. Disponível em:<www2.ufmg.edu.br/kefirdoreconcavo/imagens/desenvolvimento_de_uma_cultura_kefir_dissertacao%20a7%20a3o.pdf.com> Acesso em: 06 Abr. 2017.

GARROTE, G.L; et al. O. Rapid discrimination of lactobacili isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. **International Journal of Food Microbiology**, 2016, Amsterdam.V.111,n.1,p.280–287.Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S01681605060031h14> Acesso em: 07 Abr. 2017.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, Leiden. v.103, n. 5, p. 582-7, 2003.

JAEKEL, L.Z; RODRIGUES, R.S; SILVA,A.P. Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e arroz. *Ciencia e tecnologia de alimentos*, Campinas, v.30, n.2, p. 342-348, 2010. Disponível em: <[www.agro.ufg.br/pat - Pesq.Agropec.Trop](http://www.agro.ufg.br/pat-Pesq.Agropec.Trop)>. Acesso em: 09 Nov 2017.

KANDYLIS, P. et al. Dairy and non-dairy probiotic beverages.**Current opinion in Food Science**, v. 7, p 58-63, 2016. Disponível em: <<http://www.agris.fao.org/agris-search/search.com>> Acesso em: 20 Nov 2017.

LEE, S.Y; NA, S. H. The effects of the addition of orange and grape concentrates, and fructose on the quality characteristics of soy Kefir. **Journal of the Korean Society of Food Culture**, v.21, n.3, 330-335, 2006. Disponível em: http://www.researchgate.net/journal/1226-3311_journal_of_the_korean_societh_of_food_Science_and_nutriti_on&ei=RQJf7nu&=pt.com Acesso em: 24 Out 2017.

MÄKINEN, O. E. et al. Foods for special dietary needs: Non-dairy plant based milk substitutes and fermented dairy type products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. In press, 2015. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/25172757/?i=4&from=/related.com> Acesso em: 10 Nov 2017.

MALDONADO, R.R, et. Al. Potential application of four types of tropical fruits in lactic fermentation **LWT-Food Science and Technology**, v. 86, p.254-260, 2017. Disponível em: <<http://bdpi.usp.br/item/002846233&ved=0ahUKewiJjua3wc7xahvchJAKHRByCrsqggiMAE&usg=AOvVaw38zcvmaTxyYd6u9zbcz.com>> Acesso em: 18 Nov 2017.

MALDONADO, R.R. Production of mixed beverage of cattle milk and soy milk fermented by kefir. In Caderno de Resumos do XIX, Euro Food Chem Conference, Budapeste, 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa n.46, Diário oficial da união, Brasília, 2007. Disponível em: <www.researchgate.net/profile/jorge_horii/publication/250045347_qualidade_quimica_de_cachaça_e_de_aguardente_brasileira/links/5429d7500cf29bbc12676ce5.pdf> Acesso em: 15 Abr. 2017.

NOGUEIRA, L. K. et al. Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. **Acta Amazonica**, v.46, n.4, p.417-424, 2016.

PALANCA, V; et al. Bases científicas para El desarrollo de productos cárnicos funcionales com actividad biológica combinada. **Alimentos funcionales, Nutrición Hospitalaria**, Madrid, v.21, n. 2, p.199–202, 2006. Disponível em: <<http://scielo.isciii.es/pdf/nh/v21n2/alimentos2.pdf>> Acesso em: 20 Mar. 2017.

RATHORE, S.; SALMERÓN, I.; PANDIELLA, S. S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. **Food Microbiology**. v.30, p.239-244, 2012. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/2265307&ved=0ahUKEwiBp4b1M7xahvjizakhz5eckgqfggmai&usg=AOvVaw2-q6zpsdstsei_qbk404v.com Acesso em: 13 Out 2017.

SANTOS, A. et al. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from Kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n.3, p. 434- 437, 2003.

SANTOS, M.R; BASSO, C. Physical-chemist and sensorial analysis kefir gelatin. **Análise físico-química e sensorial de gelatina à base de Quefir**. Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v.14, n.1, p.93-100, 2013. Disponível em: <<http://www.unifra.br/portals/36/csaude/2013/ii.pdf> > Acesso em: 01 Abr. 2017.

SANTOS, L. F. et al. Kefir: Uma nova fonte alimentar funcional. **p.5-9, 2012. Disponível em:** http://www2.ufrb.edu.br/Kefirdoreconcavo/images/22_03_12_artigo01.pdf. Aceso em: 07 jun. 2017.

SILVA, M, F, et al. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food Chemistry**, v.229, p. 373-380, 2017. Disponível em: <<http://www.infona.pl/contributor/1@bwmeta1.element.elsevier-380519b7-a506-3515-a407-2f032eaf612/tab/publications.com>> Acesso em: 01 Nov 2017.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1-8, 2016. Disponível em: < https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-a47283d2-f8b9-3541-bo3b-53f4d258ecd2&ved=0ahukewjrn5say87xahuhg5akhv4vdpkqfggimae&usg=aog=aovvaw3aqrqv4beh_006uu8etkb2.com> Acesso em: 11 Out 2017.

SIQUEIRA, R.S. **Manual de Microbiologia de Alimentos**. Empraba- MERCK, 1995.

Disponível

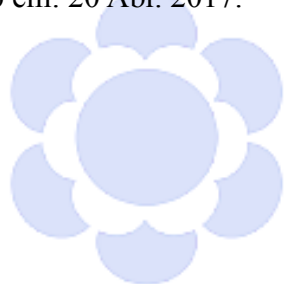
em:<<http://www.ccta.ufcg.edu.br/adimin.files.action.php?action=download&id=388>> Acesso em: 02 Out 2017.

SIRIRAT, D; JELENA, P. **Biotechnology**. Bacterial inhibition and antioxidant activity of kefir produced from Thai jasmine rice milk. v.9, n.3, p.332-337, 2010. Disponível em:<<http://docsdrive.com/pdfs/ansinet/biotech/2010/332-337.pdf&ved=0ahUKewjcinovm7xahxcejakhtcsc4oqfggcmaa&usg=a0vvaw34ueGtg-AtAlmuocsibdyw.com> Acesso em: 10 Nov 2017.

TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos, São Paulo,4 ed., 2011.

TERRA, F. M. **Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir**, P.62, Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

WESCHENFELDEL; et al. **Caracterização de kefir tradicional quanto a composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-Escherichia coli**. 2011, 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em: www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0102-09352011000200027.com Acesso em: 20 Abr. 2017.



IMACULADA
FACULDADES MARIA IMACULADA