

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Biquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Alimentos

Avaliação de compostos biogênicos redutores de fadiga em bebida funcional

Rayane de Souza

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina S. B. Bogsan

São Paulo  
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Biquímico-Farmacêutica  
Área de Tecnologia de Alimentos

Avaliação de compostos biogênicos redutores de fadiga em bebida funcional

Rayane de Souza

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina S. B. Bogsan

São Paulo  
2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

S719a	Souza, Rayane Avaliação de compostos biogênicos redutores de fadiga em bebida funcional / Rayane Souza. - São Paulo, 2023. 70 p.
	Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. Orientador: Bogsan, Cristina
	1. MICROBIOLOGIA. 2. FERMENTAÇÃO. I. T. II. Bogsan, Cristina, orientador.

Rayane de Souza

Avaliação de compostos biogênicos redutores de fadiga em bebida funcional

Comissão Julgadora  
Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr<sup>a</sup>. Presidente Cristina S. B. Bogsan

Prof. Dr<sup>a</sup>. Isabela Rosier Olimpio Pereira  
1º Examinador

Prof. Dr<sup>o</sup>. João Carlos Monteiro de Carvalho  
2º Examinador

Prof. Dr<sup>o</sup> André Ricardo Alcarde  
3º Examinador

São Paulo, 10 de Abril de 2023

À quem acredita que as revoluções começam por uma faísca, às vezes incômoda e certamente necessária.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, que participou ativamente de cada passo desse trabalho: da idealização da hipótese até as considerações finais dessa dissertação. Vocês são inscríveis, Marlene (mãe) e Emanuel (pai) com toda a grandiosidade intelectual e humana, que sempre me incentivaram, acolheram e trouxeram luz na minha vida, sem vocês não seria possível. E claro sem esquecer do exemplo de vida que carrego comigo, Emanuel (irmão), que sempre me faz lembrar da potencia que sou, do quanto posso ser mais, obrigada.

À minha orientadora Cristina Bogsan, que desde o princípio confiou em mim, na minha capacidade e sonhou comigo.

Ao CNPq por ter concedido a bolsa de mestrado, processo 133774/2020-1.

Aos meus queridos Daniel, Ícaro, Láine e Eliônio que me incentivaram, compartilharam momentos célebres, trocaram conhecimentos e muitas risadas, obrigada.

À professora Camila e Ana Clara, que sem saber, sem perceber, trouxeram tanta luz, alegria, incentivo e inspiração para minha jornada.

Ao PCom e todos envolvidos nessa iniciativa incrível, que fez toda essa jornada ganhar novos significados, novos sentidos e novas perspectivas.

Às alunas Ana, Magali, Marcos, Ju e professora Susana Marta Isay Saad, que dos corredores e sala de microbiologia fizeram um lugar de trocas, de conhecimento, de risadas e muito apoio, obrigada.

À professora Isabela Rosier Olimpo Pereira, que confiou e acreditou no potencial desse projeto, permitindo que chegássemos até esse momento, obrigada.

À Simone Sartorio, professora de estatística, que desde a graduação está ao meu lado, nessa árdua jornada de trazer o que há de melhor para os trabalhos acadêmicos. Sempre fomentando minha sede pela análise de qualidade, no mestrado não poderia ser diferente, obrigada.

Ao técnico Alexandre, à Rose, Elza e Crispim que trouxeram alegria para meus dias, suporte e muito conhecimento, vocês fizeram a diferença para que eu chegasse até aqui, muito obrigada.

"

[...]

E aprendi que se depende sempre  
De tanta, muita, diferente gente  
Toda pessoa sempre é as marcas  
Das lições diárias de outras tantas  
pessoas  
E é tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente onde quer que  
a gente vá

É tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho por mais que  
pense estar  
[...]" . Gonzaguina. Caminhos do coração

## RESUMO

SOUZA, R. **Avaliação de compostos biogênicos redutores de fadiga em bebida funcional**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023). 70 páginas.

A fermentação é uma prática ancestral, disseminada por diferentes culturas, cujo método e alimentos selecionados, variam conforme a região geográfica. Esse processo é capaz de aumentar a oferta de vitaminas, ácidos graxos, proteínas entre outros nutrientes. Os alimentos fermentados incluem produtos derivados do leite, frutas, vegetais e cereais. O tibico, conhecido como kefir de água, se apresenta na forma de grãos irregulares, com coloração amarelada a transparente, de textura gelatinosa, podendo apresentar diferentes tamanhos, é responsável pela produção de bebidas levemente gaseificadas e ácidas. O uso do grão de tibico como cultura iniciadora pode gerar dificuldade de padronização na fermentação comercial entre os lotes, além de produção de etanol acima de 0,5% (v/v). Com esse contexto, que o presente trabalho propõe o uso de cultura iniciadora líquida, pré padronizada, obtida através da fermentação do suco de uva com o kefir-de-água. A cinética de fermentação foi monitorada através do equipamento CINAC, o teor de álcool medido por cromatografia gasosa headspace e detector FID, calculado açúcares redutores pelo método DNS, e avaliada a alteração de cor dos produtos de acordo com a cultura iniciadora empregada. A utilização de cultura iniciadora líquida, obtida pela fermentação do suco de uva, demonstrou não ser uma estratégia eficaz em busca da estabilização do produto ao longo do tempo com as condições propostas nesse trabalho, não sendo possível avaliar seu desempenho na fadiga.

Palavra-chave: teor alcoólico; propriedade intelectual, fermentados tradicionais.



## ABSTRACT

SOUZA, R. **Evaluation of fatigue-reducing biogenic compounds in a functional beverage.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023. 70 páginas.

Fermentation is a traditional practice disseminated by different cultures, whose methods and selected foods vary according to the geographic region. This process can increase the supply of vitamins, fatty acids, proteins, and other nutrients. Fermented foods include dairy products, fruits, vegetables, and cereals. Tibico, known as water kefir, comes from irregular grains with a yellowish to transparent color and gelatinous texture and can have different sizes. It is responsible for the production of slightly carbonated and acidic drinks. The use of Tibico grain as a starter culture can generate difficulty in standardizing commercial fermentation between batches, in addition to producing ethanol above 0.5% (v/v). With this context, the present work proposes using a liquid starter culture, pre-standardized, obtained through the fermentation of grape juice with water-kefir. The fermentation kinetics was monitored using CINAC equipment, the alcohol content was measured by headspace gas chromatography and FID detector, reducing sugars were calculated using the DNS method, and the product's color was evaluated according to the starter culture used. The use of liquid starter culture, obtained by fermenting grape juice, proved not to be an effective strategy in the search for stabilization of the product over time with the conditions proposed in this work, and it is not possible to evaluate its performance in fatigue.

Keyword: alcohol; intellectual property, traditional fermented products.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>OBJETIVO</b> .....	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
Alimentos fermentados.....	15
Processo Fermentativo .....	16
Tendências e legislação.....	19
Tibico .....	21
Aplicações .....	22
Substratos e bem-estar .....	22
Características microbiológicas e sensoriais.....	26
Potencial benéfico do suco de uva tinto integral .....	27
Compostos fenólicos.....	28
<b>CAPÍTULO 2 AVANÇOS E DESAFIOS NA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DOS PRODUTOS DE KEFIR E KEFIR-DE-ÁGUA DO PERÍODO DE 2002 A 2022</b> .....	<b>34</b>
2.1 Introdução.....	34
2.2 Metodologia .....	35
Análise de Patentes de Código Aberto.....	35
Sistema bibliométrico .....	36
Resultados.....	36
Contribuição de cada país ao longo dos últimos 20 anos: patentes de kefir.....	36
Contribuição de cada país ao longo dos últimos 20 anos: patentes de kefir de água.....	39
Classificação internacional de patentes (IPC) de kefir .....	42
Produção científica dos últimos 20 anos .....	43
Discussão .....	46
Considerações finais.....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

<b>CAPÍTULO 3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE CULTURA FERMENTADORA NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO SUÇO DE UVA TINTO INTEGRAL FERMENTADO POR KEFIR-DE-ÁGUA .....</b>	<b>52</b>
Introdução .....	52
Materiais e métodos.....	53
Delineamento Experimental.....	53
Análise Estatística .....	54
Aquisição dos insumos para fabricação das bebidas .....	54
Aquisição das bebidas fermentadas por grãos de kefir-de-água.....	54
Produção da cultura iniciadora líquida .....	55
Produção da bebida fermentada com GKA e com SF.....	56
Cinética de fermentação e maturação .....	58
Etanol .....	58
Açúcar redutor.....	58
Análise colorimétrica .....	59
Resultados.....	59
Teor de etanol e açúcares redutores (AR).....	59
Parâmetros de cor .....	64
Monitoramento de pH .....	65
Discussão .....	65
Conclusão.....	67
REFERÊNCIAS .....	69
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>71</b>

## INTRODUÇÃO

Os alimentos fermentados tradicionais compõem a dieta de diferentes povos, sendo os derivados lácteos os alimentos fermentados mais comuns. Alimentos fermentados não-lácteos, alternativo para o público vegetariano, vegano ou que intolerante a algum componente derivado do leite, encontram-se em evidência no mercado de fermentados brasileiro. Desta forma, novos produtos como o kefir-de-água, que são bebidas fermentadas levemente gaseificadas, saborizadas ou não com frutas (PIDOUX, 1989), se tornam uma alternativa interessante. As fermentações dessas bebidas são originalmente realizadas por grãos de kefir-de-água, compostos por um consórcio simbiótico de leveduras e bactérias ácido lácticas e acéticas, dispostos em uma matriz polissacarídica, cujo formato se assemelha a grãos. Essa cultura iniciadora apresenta como atrativo a capacidade de fermentar diferentes substratos, como por exemplo, suco de cenoura, leites vegetais, frutas e chás (RANDAZZO et al., 2016).

O tempo de fermentação do kefir-de-água pode ser inferior ao período de 12h, diferentemente do kefir-de-leite e da kombucha, também pertencentes ao grupo de fermentados tradicionais. Para esses dois últimos a legislação brasileira reconhece e regulariza sua comercialização, com amplo mercado nacional e internacional. Já a comercialização dos produtos derivados do kefir-de-água ocorre majoritariamente de modo artesanal, uma vez que não há regulamentação prevista para esse tipo de produto. O capítulo 1 desse trabalho abordará o referencial teórico necessário para discussão da necessidade em reconhecer esses produtos derivados do kefir-de-água.

Há, ainda, a lacuna acerca do status de produção científica e de propriedade intelectual do kefir-de-água referente ao período de 2002-2022, fornecendo informações necessárias para o mercado e para a academia. Tópico esse discutido no capítulo 2, através de uma análise bibliométrica e busca de patentes. Em função do potencial de inovação, associado ao uso desses grãos, que esses produtos e seus derivados necessitam de caracterizações físico-químicas capazes de descrever o impacto nas alterações de âmbito sensorial e funcional de acordo com o modo de fermentação, tópico abordado no capítulo 3.

## **OBJETIVO**

Mapear o cenário mundial de produção tecnológica e científica dos produtos derivados de kefir e kefir-de-água no período de 2002-2022, além de identificar os impactos da fermentação nos parâmetros físico-químicos do produto obtido através do processo tradicional de fermentação nos grãos de kefir-de-água e no suco de uva fermentado pela cultura iniciadora líquida obtida pela fermentação do suco de uva com kefir-de-água.

## **CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO**

### **Alimentos fermentados**

A fermentação é uma prática ancestral, disseminada por diferentes culturas, cujo método varia conforme a região, assim como os alimentos selecionados para essa prática. A matriz alimentar mais popular dentre os vegetais fermentados é o repolho, recebendo diferentes preparos e designações: Sauerkrautin (Europa e Ásia Ocidental), Kimchi (Ásia Oriental), Dhamuoi (Vietnã), Cortido (América Latina). Pepino, azeitonas, cenouras e cebolas também são comumente fermentadas, chamadas de modo geral como pickles. Frutas e chás são largamente utilizados para obtenção de bebidas fermentadas, geralmente resultantes da ação de bactérias e leveduras (SEPTEMBRE-MALATERRE, 2018).

O processo de fermentação é capaz de aumentar a oferta de vitaminas, ácidos graxos e a biodisponibilidade de polifenóis, entre outras substâncias bioativas, como peptídeos, exopolissacarídeos, fenólicos e neurotransmissores (MARRERO et. al., 2019). A contagem de microrganismos vivos pode variar conforme disposição geográfica, matriz alimentar e tempo de armazenamento, sendo comumente encontradas as bactérias ácido-láticas e acéticas, além de leveduras neste microbioma (REZAC et al., 2018).

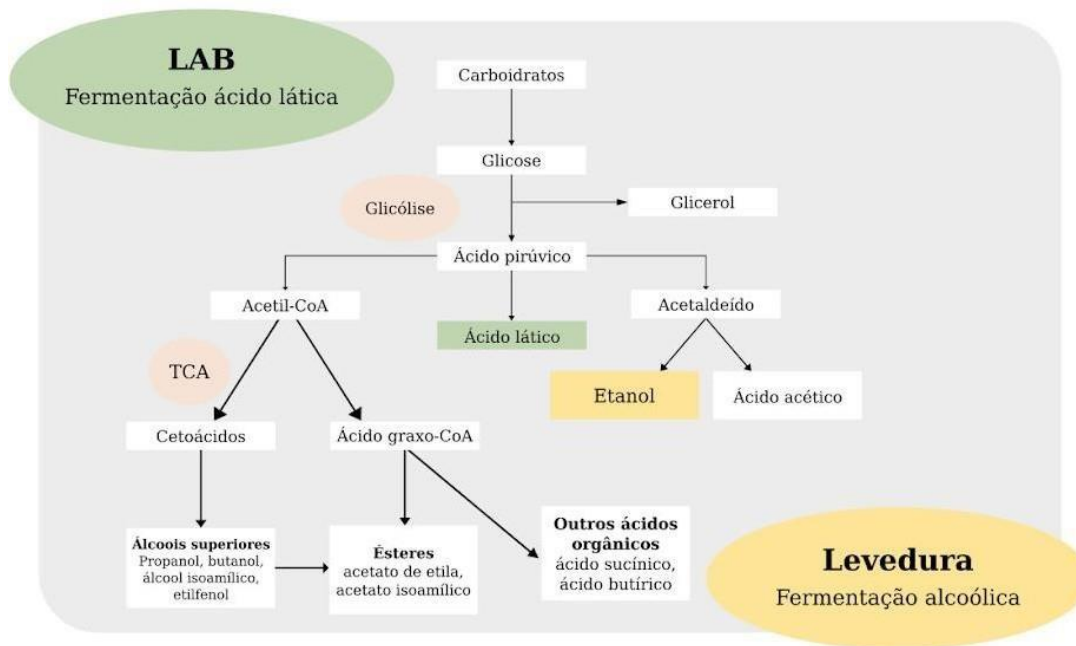
As bactérias ácido-láticas (LAB), frequentemente encontradas em alimentos fermentados por tibico, kefir, iogurtes e queijos, utilizam as fontes de carbono e aminoácidos livres presentes no substrato para produzir metabólitos de interesse (RICCI et al., 2019). As LABs são capazes de diminuir os teores de glicose e dos ácidos málico, tartárico e cítrico da matriz alimentar, e modificar a biodisponibilidade de compostos biogênicos, além de gerar ácidos orgânicos, responsáveis por mudanças sensoriais (GARCIA et al., 2020). O ácido láctico, reduz o pH da bebida, impede a proliferação de microrganismos patogênicos e promove a redução de citocinas pró-inflamatórias no organismo do consumidor (IRAPORDA et al., 2015). A presença dessas bactérias além de promover aumento no tempo de prateleira do alimento, proporciona ao consumidor um produto com valor nutricional e funcional agregado.

As bactérias ácido-acéticas (BAA) são essenciais para a produção de alimentos como vinagres, kombucha e algumas bebidas fermentadas por tibico, de acordo com as condições de fermentação e armazenamento. AS BAAs possuem a capacidade de oxidar o etanol em ácido acético, além de gerar metabólitos como ácido glucônico, l-sorbose e celulose bacteriana (GOMES et al., 2018). No entanto, em outros produtos como vinho, cidra e cerveja, sua presença não é desejada, dado o prejuízo nas propriedades sensoriais. Enquanto o uso de BAAs em alimentos fermentados tradicionais gera uma alternativa ao produzir bebidas suaves, podendo ser utilizada também para iniciar fermentações com frutas, categorizadas como não-alcoólicas, ácidas e refrescantes (DE VUYST et al., 2018). Características estas pertencentes a kombucha, kefir e bebidas fermentadas com tibico.

### **Processo Fermentativo**

A fermentação é um processo que promove a obtenção de energia, através da ação de microrganismos em matrizes orgânicas. A diversidade de metabólitos gerados durante esse processo ocorre em função da interação de 3 fatores: microrganismos, substrato e condições ambientais. Como resultado dessa interação, podem ocorrer alguns tipos de fermentação, como por exemplo a fermentação láctica, alcoólica, maloláctica e butírica, que possuem como característica básica comum o catabolismo anaeróbico de compostos orgânicos (SEPTEMBRE-MALATERRE, 2018). A figura 1 ilustra as principais rotas e metabólitos formados durante o processo fermentativo em LABs e leveduras.

Figura 1. Mecanismos de fermentação e os produtos gerados pelas leveduras e LAB.



Fonte: Adaptado de KANDASAMY (2018).

As LAB são responsáveis por produzir substâncias com propriedades antimicrobianas como ácidos graxos de cadeia curta, etanol, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (KANDASAMY et al., 2018). Possuem açúcares como substrato característico, podendo ser heterofermentativas ou homofermentativas. As fermentações homofermentativas transformam as hexoses como através das reações de glicólise e lactato desidrogenase em ácido láctico. No entanto, quando em condições limitantes, é promovida a fermentação ácido-mista com produção de acetato, etanol, e outros ácidos. As LAB heterofermentativas são as maiores contribuintes na fermentação de alimentos, dada sua capacidade em fermentar hexoses, pentoses e ácidos orgânicos (SHARMA et al., 2020; ZAUNMÜLLER et al., 2006).

Para a fermentação alcoólica, tem-se as leveduras como principais atuantes, a fermentação dos açúcares, como principal substrato, resulta em etanol e gás carbônico através da via glicolítica. O metabolismo energético das leveduras é composto pela via oxidativa e oxiredutora, denominada como processo respiratório e fermentativo, respectivamente. Os autores Fiechter e Käppeli (1987) e Gancedo e Serrano (1989)



sugerem que a ocorrência dessas duas vias se faz de modo simultâneo, com maior ou menor intensidade em função dos tipos de açúcares disponíveis, assim como das concentrações presentes no meio e da espécie envolvida (GANCEDO & SERRANO, 1989; FRAENKELL, 1982). Outro fator primordial é a oferta de oxigênio durante o catabolismo dos açúcares. Quando em condições anaeróbicas tem-se a via fermentativa como majoritária, cujos produtos finais são etanol e gás carbônico. Álcoois superiores, ésteres, glicerol e outros compostos também são gerados ao longo do processo (ZAMORA et al., 2009). Na presença de oxigênio, a via respiratória é iniciada, sendo responsável por oxidar os açúcares gerando água e gás carbônico (BRIGGS et al., 2004).

Açúcares são classificados como carboidratos que podem ser divididos em mono-, di- ou polissacarídeo. São nomeados como redutores (AR) quando há uma porção carbonílica livre em sua estrutura, de modo que quando dispostos em solução alcalina atuam como agentes redutores, como por exemplo a frutose e glicose - monossacarídeos conhecidos pela sua importância nos processos fermentativos e indústria dos alimentos. (SANTOS, 2013; BRUICE, 2014). As frutas, assim como os sucos, são ricos em ARs, podendo ser encontrado em elevadas proporções em relação a sacarose, comumente detectados através do teste de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) (HARBI et al., 2013; GHNIMI et al, 2018).

O teste colorimétrico DNS foi inicialmente empregado na detecção de ARs presentes na urina e sangue (SUMNER & GRAHAM, 1921; SUMNER & SISLER, 1944). Posteriormente, com o aperfeiçoamento proposto por Miller (1959), foi possível aumentar a diversidade de tipos de amostras a serem analisadas e a empregabilidade do método. O princípio deste ensaio se baseia na redução do DNS ao reagir com o carbono carbonílico de ARs, gerando o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, composto corado de absorção máxima de luz a 540nm, representado na figura 2.

Figura 2. Reação de redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico em meio básico.

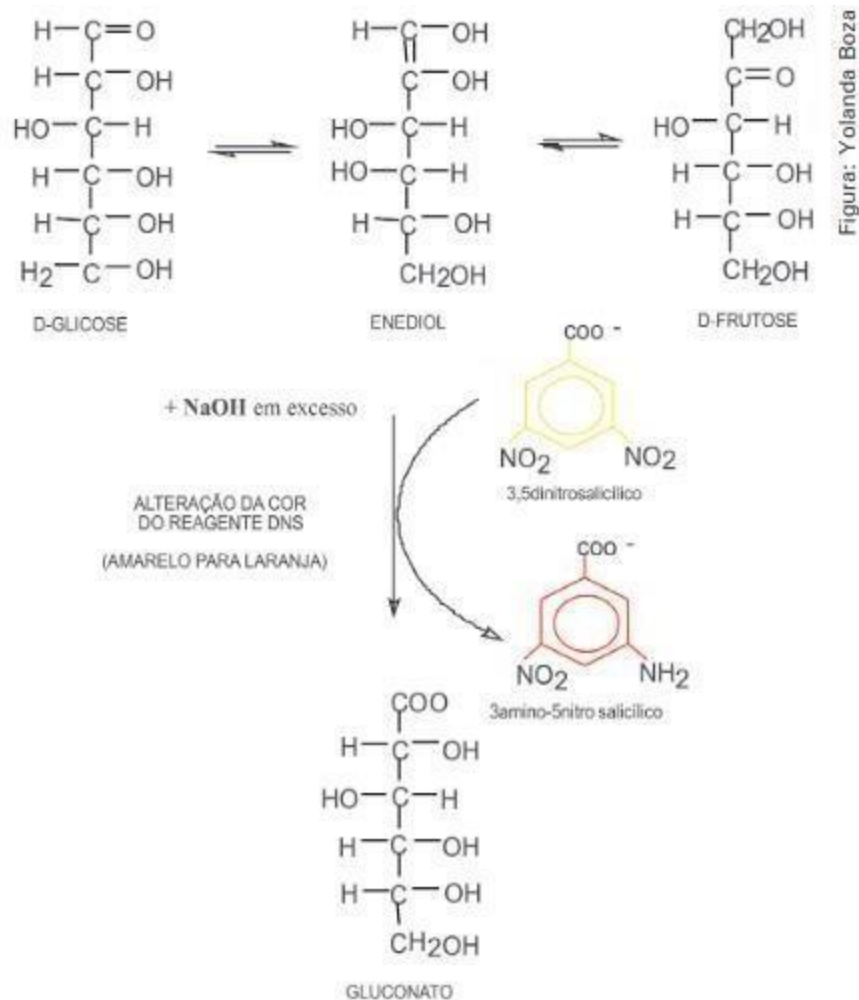


Figura: Yolanda Boza

Fonte: Adaptado de MALDONADE et al., 2013

A detecção dos ARs é utilizada na indústria alimentícia para estimar o potencial de fermentação da bebida após engarrafada, assim como para medir a eficiência do processo fermentativo e prover as devidas características do produto.

### Tendências e legislação

Os alimentos fermentados são definidos como “alimentos feitos através do crescimento microbiano desejado e conversões enzimáticas de componentes alimentares, com presença facultativa de microrganismos vivos no produto final” (MARCO et al.,

2021). As modificações na matriz alimentar após essa ação dos microrganismos promovem uma série de melhorias, essas associadas ao teor nutricional e propriedades sensoriais, fatores também atrativos para os consumidores que buscam saúde e bem-estar. Os benefícios geralmente estão relacionados a modificações no sistema imune ou influenciando a atividade e composição da microbiota intestinal (MARCO et al., 2021).

Apesar de equivocada, há a promoção desses alimentos como um produto probiótico, dada a presença de microrganismos vivos, principalmente pertencentes ao grupo das LAB. De acordo com Hill et al/ (2014), “probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios a saúde do hospedeiro”. Para que a reivindicação seja dada de modo adequado em alimentos é necessário seguir os seguintes critérios: 1) o microrganismo deve ser membro do grupo de espécies seguras ou microrganismo seguro, que tenham evidências suficientes apoiando efeitos benéficos em humanos, 2) além de uma prova de viabilidade a nível de espécie, usado em estudos humanos, ou a nível de cepa quando associados a afirmações de saúde específicas (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014).

Para os alimentos fermentados probióticos o critério a ser seguido é o mesmo descrito acima, com adição do reconhecimento em nível de cepa e sequenciamento genômico disponível do microrganismo alvo. De modo que, aqueles alimentos fermentados cuja microbiota pertencente não é identificada e afirmação de saúde com comprovação em estudos clínicos é inexistente, sugere-se que utilize a reivindicação de “alimento feito por fermentação” e quando houver a presença de microrganismos vivos usar “Contém culturas vivas e ativas” (MARCO et al., 2021).

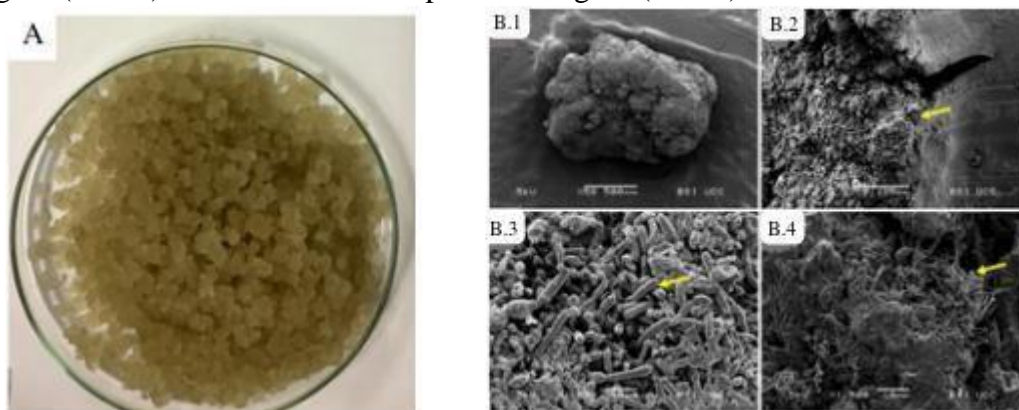
A legislação brasileira reconhece e regulariza os produtos fermentados tradicionais kefir e kombucha, de acordo com a instrução normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 e instrução normativa nº 41, de 17 de setembro de 2019 respectivamente. Enquanto as bebidas fermentadas por túbico (kefir de água) permanecem sem uma categoria adequada, uma vez que a legislação brasileira possui como único componente da categoria “Alimentos fermentados não alcoólicos” a kombucha. Apesar da aparente similaridade dos constituintes

dessas culturas iniciadoras, consórcio simbiótico de leveduras e bactérias, há severas diferenças na abundância e composição microbiana, gerando a necessidade de parâmetros de qualidade e segurança para o tibico.

### Tibico

O tibico, comumente conhecido como grão de kefir-de-água, se apresenta na forma de grãos irregulares, com coloração amarelada a transparente, de textura gelatinosa, podendo apresentar diferentes tamanhos, conforme ilustrado na figura 3. É composto pela matriz polissacarídica de extrato de alfa 1-6 glicose, produzido majoritariamente pelo *Lactobacillus hilgardii* (PIDOUX, 1989; LAUREYS & DE VUYST, 2014, 2017; FELS et al., 2018). Análises metagenômicas dos grãos de kefir de água indicaram *Lactobacillus*, *Oenococcus* e *Bifidobacterium* como os principais gêneros de bactérias e para as leveduras a maioria representada pelo gênero *Saccharomyces* e *Dekkera* (VERCE et al., 2019).

Figura 3. Representação dos grãos de tibico. A) Grãos de tibico vista macroscópica; B) Grão de tibico vista microscópica. B.1: Tibico (50x). B.2: Grão cortado com face interna exposta (área lisa) e microorganismos na superfície externa (x250). B.3: Leveduras na superfície do grão (x1500) e B.4: Bacilos na superfície do grão (x1500).



Fonte: o autor (2022) à esquerda; adaptado de LYNCH (2021) à direita.

Quando dispostos em solução aquosa, contendo sacarose e frutas secas (figo), após período de fermentação de aproximadamente 2 dias, é obtida uma bebida fermentada, levemente gaseificada e alcoólica. A sacarose adicionada, assim como os frutos, são a fonte de carbono e energia necessária para o crescimento microbiano do tibico, sendo os figos responsáveis por prover macro e micronutrientes importantes para o desenvolvimento (VERCE et al., 2019). Como produto do metabolismo da sacarose por estes

microrganismos, tem-se os ácido lático, etanol, ácido acético, dióxido de carbono e exopolissacarídeos (LAUREYS e DE VUYST, 2017; MARTÍNEZ- TORRESet. al., 2017).

A origem do tibico permanece desconhecida, no entanto, há teorias que sugerem a ocorrência espontânea desse grão em artigos de plantas da espécie *Opuntia* no México (LUTZ M.L., 1899; RUIZ ORONoz, M., 1932). Enquanto Ward, H. M. (1892) propõe que os soldados voltando da guerra da Criméia trouxeram esses grãos para a Europa ocidental. Desde então, sua propagação ocorre através do cultivo doméstico e doações, assim como é feita com os grãos de kefir de leite.

Diferentemente do tibico, o grão de kefir-de-leite, apesar de ser representado também como uma matriz polissacarídica contendo bactérias e leveduras, diferem em abundância e composição microbiana, além de apresentar perfil fermentativo distinto (MARTÍNEZ-TORRES et. al., 2017; DE ROOS & DE VUYST, 2018). A composição do grão de kefir-de-leite possui espécies raramente encontradas em grãos de kefir-de-água, a exemplo do *Lactobacillus kefirifaciens*, essa responsável por biossintetizar o heteropolissacarídeo kefiran, principal componente da matriz polissacarídica (PRADO et al., 2015).

### **Aplicações**

A maneira mais comum de utilização do tibico ocorre de modo doméstico, fermentando uma solução aquosa de açúcar mascavo por 24h a 48h, podendo acrescentar frutas secas ou *in natura* ao processo. Há, também, a inclusão desse fermentado em formulações convencionais, como o pão, para potencializar a qualidade em termos de sabor, textura, valor nutricional e tempo de prateleira (LIMBAD et al., 2020). Além do consumo como produto alimentício, o potencial de redução da poluição com o tibico tem sido investigado, dado que metais pesados como cromo e chumbo foram absorvidos com 70% de eficácia pelo grão (VOLPI et al., 2019).

### **Substratos e bem-estar**

Apesar do açúcar mascavo ser tradicionalmente empregado como única fonte de substrato para o metabolismo das leveduras e bactérias, Verce (2019) demonstra a

importância do uso de figos secos (ou outras frutas) na fermentação com tibico. Dado que as espécies microbianas têm diferentes capacidades de biossíntese de aminoácidos, vitaminas e cofatores, há possivelmente interações de alimentação cruzada e, portanto, a necessidade de usar fornecedores de macro e micronutrientes (VERCE et al., 2019).

Formulações com diferentes tipos de substratos têm sido analisadas quanto a atividade antioxidante, pH, sólidos solúveis e produção dos principais metabólitos, a fim de avaliar a capacidade de fermentação do tibico em diferentes condições e gerar novas opções de produtos fermentados (quadro 1).

Quadro 1. Frutas e vegetais como substratos para fermentação com tibico: principais metabólitos e atividade antioxidante. BN: Bebida não fermentada. BF: Bebida fermentada.

Amostra		pH	Etanol (%v/v)	Ácidoacético (g/L)	Ácidolático (g/L)	CO <sub>2</sub> (g/100ml)	SSC (°Brix)	DPPH (%)	Fermentação	Referência
Maçã	BN	3.70 ± 0.06	n.d	n.d	n.d	n.d	12.03 ± 0.11	41.19 ± 0.34	Tibico comercial (4%, v / v): 25°C por 48h	Randazzo, W. et al.(2016)
	BF	4.04 ± 0.08	2.67 ± 0.14	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.00	1.51 ± 0.25	8.70 ± 0.13	37.56 ± 0.27		
Uva	BN	3.61 ± 0.11	n.d	n.d	n.d	n.d	14.93 ± 0.09	34.21 ± 0.41		
	BF	3.81 ± 0.04	4.44 ± 0.24	0.16 ± 0.03	0.02 ± 0.01	1.83 ± 0.49	8.47 ± 0.08	15.13 ± 0.23		
Pitaya	BF	3.87 ± 0.03	0.55 ± 0.03	3.40 ± 0.27	2.56 ± 0.07	-	8.07 ± 0.04	2.54 ± 0.04 *	Tibico caseiro (5%, v / v): 25°C por 24h	Bueno, R. S. et al. (2020)
Pitaya com maçã	BF	3.97 ± 0.03	0.48 ± 0.01	3.15 ± 0.26	0.83 ± 0.01	-	8.66 ± 0.03	2.79 ± 0.03 *		
Jabuticaba	BF	3,97	-	0,021	1,08	-	4,82	-	Tibico caseiro (6%, v / v): 25°C	Destro, T. M. et al.(2019)

									por 24h**	
Coco verde	BF	4,6	1,16	-	-	-	3,8	-	Tibico comercial (5%, v / v): 25°C por 12h	Dwiloka, B. et al. (2020)
Soro de soja	BF	3,47	-	2.66 ± 0.11	1.37 ± 0.06	-	4,43	72,34	Tibico comercial (5%, v / v): 25°C por 48h	Tu, C. et al. (2019)
Cenoura	BN	5.3± 0.0	n.d	n.d	n.d	n.d	8.15 ± 0.21	15.49 ± 0.03	Tibico comercial (4%, v / v): 25°C por 48h	Corona, O. et al. (2016)
	BF	4.1 ± 0.0	3.00 ± 0.14	1.90 ± 0.71	4.81 ± 0.65	1.51 ± 0.18	3.38 ± 0.10	14.53 ± 1.67		
Tomate	BN	4.1 ± 0.0	n.d	n.d	n.d	n.d	4.45 ± 0.07	74.30 ± 1.80		
	BF	4.2 ± 0.1	1.48 ± 0.10	1.25 ± 0.09	2.41 ± 0.32	1.29 ± 0.11	1.97 ± 0.06	78.31 ± 0.14		

\* Método usado: FRAP

\*\* 24h de fermentação e 20h para gaseificação

Fonte: o autor (2023)

Os autores Corona, O. (2016) e Randazzo, W. (2016) relataram em seus trabalhos a caracterização de bebidas fermentadas com suco de vegetais, quanto a composição físico-química e microbiológica. Ambos trazem a caracterização de compostos orgânicos voláteis, além dos metabólitos principais da fermentação e análise sensorial. Foi detectado, após a fermentação, uma diminuição no teor de sólidos solúveis e aumento do número de compostos orgânicos voláteis, de terpenos e melhor aceitação dos julgadores nas amostras desenvolvidas com cenoura (CORONA et al., 2016). No desenvolvimento de bebidas com sucos de frutas mediterrâneas foram destacadas as amostras contendo maçã e uva, também devido à boa aceitação dos julgadores na análise sensorial, e pelas características físico-

químicas e microbiológicas superiores às demais amostras do estudo (RANDAZZO et al., 2016).

Análises para avaliar o impacto do uso de açúcar mascavo convencional e orgânico na cinética de fermentação do tábico, além do uso de polpa de jaboticaba, foram descritas por Destro et al (2019). O estudo acompanhou a cinética por 56h, de modo que não foram observadas diferenças entre os tipos de açúcar mascavo e nenhuma alteração metabólica após 40h. A polpa de jaboticaba, quando adicionada ao açúcar mascavo, alterou as propriedades da bebida de maneira benéfica, apoiando o uso da mesma como substrato (DESTRO et al., 2019). O uso do soro de soja demonstrou excelente atividade antioxidante e promissor efeito benéfico, uma vez que o fator anti-nutricional da soja é reduzido após tratamento e fermentação (TU et al., 2019). No entanto, as bebidas feitas com soro de soja, quanto jaboticaba, não apresentaram análises para o teor alcoólico, o que torna um fator limitante para a recomendação de seu uso para todos os públicos.

Outros vegetais como inhame, abóbora e *Russian olive* também foram identificados como potenciais substratos para bebidas fermentadas, porém a análise para detecção dos principais metabólitos gerados na fermentação não estava incluída nos respectivos trabalhos (DA COSTA et al., 2018; KOH et al., 2018; DARVISHZADEH et al., 2021).

Assim como demonstrado na tabela 1, não há consenso acerca das condições de fermentação nos quesitos temperatura e tempo, uma vez que a origem de cada tábico é diferente, além da fonte de carbono. Estas alterações de substrato e condições fermentativas gera proporções de metabólitos e potencial antioxidante distintos. Laureys (2018) verificou que há influência da fonte e concentração de nutrientes na solução fermentada, de modo que diferentes compostos são identificados conforme o substrato utilizado. Fator que potencializa a necessidade de caracterizações (físico-químicas e microbiológicas) e prospecções de substratos capazes de resultar em bebidas funcionais seguras.

Como a microbiota do tábico é rica em bactérias do ácido láctico, assim como a maioria dos probióticos pertencem a esse grupo, acredita-se que estas bactérias possam



ser potencialmente probióticas. Estudos *in vitro* demonstram que cepas isoladas do tibico, como por exemplo *L. kefiranofaciens* 8U, *L. diolivorans* 1Z, *Lactobacillus casei* 17U e *L. paracasei* CT12 apresentaram antagonismo contra patógenos, resistência antimicrobiana, autoagregação e excelente capacidade de tolerância ao ácido, após contato com suco gástrico e sais biliares (ZANIRATI et al., 2015; ROMERO-LUNA et al., 2020). Outra cepa, *L. mali*K8, apresentou tolerância a baixos pH, aos efeitos danosos dos sais biliares, pepsina e pancreatina, além de não possuir atividade hemolítica e ser suscetível a pelo menos cinco antibióticos, fator que a torna segura e viável como potencial candidata a probiótico (KOH et al., 2018).

Estudos *in vivo* foram desenvolvidos, em modelos murinos, a fim de avaliar o efeito do consumo da bebida fermentada por tibico em ratos diabéticos, demonstrando o efeito anti-hiperglicêmico e melhorando o perfil lipídico dos animais, podendo auxiliar diabéticos no controle de glicose e níveis lipídicos (ALSAYADI et al., 2014). Estudos *in vitro* demonstram ainda uma alta inibição da ECA I (enzima conversora de angiotensina I) pela bebida fermentada de soja, sendo a ECA I importante para regulação da pressão arterial, além de apresentar alta atividade antioxidante (AZI et al., 2020).

#### **Características microbiológicas e sensoriais**

A microbiota do tibico e da bebida fermentada gerada varia conforme a localização desse grão, manipulação e procedimento de preparação da própria bebida, assim como nível de oxigenação, tipo de substrato e tempo de fermentação (MIGUEL et al., 2011; MARTÍNEZ- TORRES et. al., 2017; LAUREYS & DE VUYST, 2017). A diversidade de espécies presentes no grão e na bebida são semelhantes e se mantêm estáveis, diferindo apenas em densidade (LAUREYS & DE VUYST, 2014; MARTÍNEZ- TORRES et. al., 2017). Durante o processo fermentativo há predominância de determinadas espécies, repetidamente observadas em diferentes estudos, que são as leveduras *S. cerevisiae*, as bactérias *L. paracasei*, *L. hilgardii*, *L. nagelii* e as bifidobactérias *B. aquikefiri*, *B. tibiigranuli* (PIDOUX, 1989; LAUREYS & DE VUYST, 2017; VERCE et al., 2019).

Assim como descrito por Laurys e De Vuyst (2017) os principais metabólitos gerados na fermentação com túbico são os exopolissacarídeos utilizados para manter a estrutura do grão, ácido láctico, etanol, ácido acético, dióxido de carbono e compostos aromáticos, responsáveis pela textura e sabor da bebida. O ácido láctico, gerado majoritariamente por espécies bacterianas ácido lácticas, é o responsável pelo sabor refrescante azedo da bebida. Alguns produtos podem apresentar sabor adocicado devido a presença do manitol, produzido a partir da redução da frutose, e sintetizado pelas espécies ácido lácticas, *L. hilgardii*, *Candidatus O. aquikefiri*, e *B. aquikefiri*.

O etanol e dióxido de carbono, produtos do metabolismo das leveduras, também interferem no sabor da bebida. Há ainda a produção de glicerol, que apesar de pequena, pode alterar a viscosidade do fermentado. A presença de ésteres e álcoois superiores também ocorrem em decorrência do metabolismo das leveduras, os ésteres acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila e decanoato de etila exercem maior influência no aroma, contribuindo para sua composição frutada e floral (LAUREYS e DE VUYST, 2014).

### **Potencial benéfico do suco de uva tinto integral**

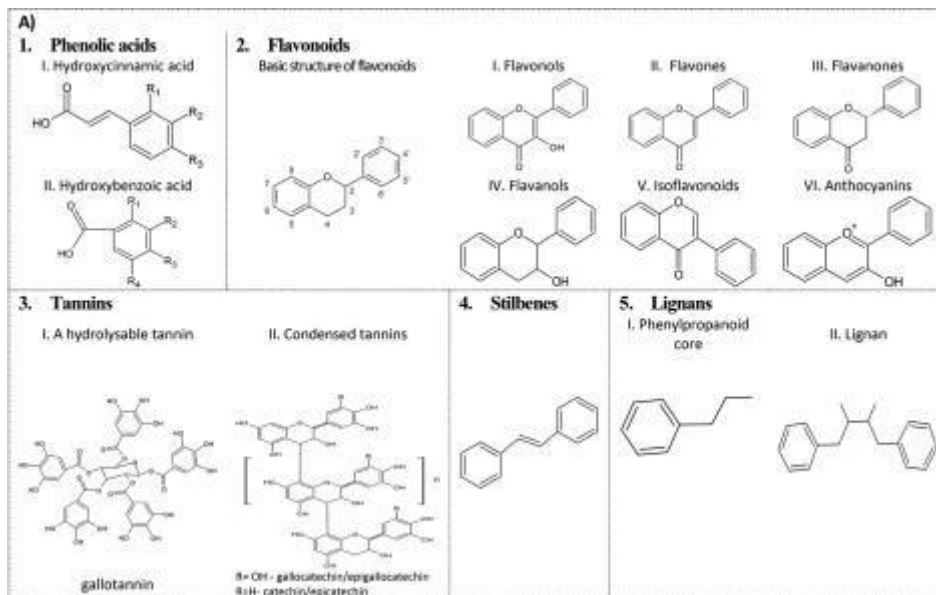
O suco de uva é caracterizado por conter 81 a 86% de água, altas concentrações de glicose e frutose, além de baixo pH, dada a presença dos ácidos cítrico, málico e tartárico. Esta combinação garante o equilíbrio entre o sabor doce e ácido (COSME, 2018). Outro componente responsável pela qualidade do suco e que confere cor e adstringência são os compostos fenólicos, além de proporcionar o aspecto funcional à bebida, devido à alta atividade antioxidante.

O suco de uva e o vinho promovem melhorias na saúde do consumidor, atuando como agente preventivo de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, cardiovasculares e na melhora da performance de atletas (COPETTI et al., 2018; OAK et al., 2018; BOWTELL & KELLY, 2019). No entanto, esses efeitos estão diretamente relacionados ao tipo de processamento dado à uva, como por exemplo, produção de suco, vinho ou néctar, e às quantidades diárias ingeridas ao longo do período de tratamento.

## Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são definidos pela presença de um anel aromático, com pelo menos um grupo hidroxila, podendo se apresentar em formas estruturais simples ou mesmo em polímeros complexos de alto peso molecular (DURAZZO et al., 2019). Podem ser, de acordo com o número de anéis fenólicos, classificados em diferentes grupos. A distinção entre e os grupos de ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas é feita a partir dos elementos estruturais que se ligam a estes anéis, descrito na figura 4 (EL GHARRAS, 2009).

Figura 4 Representação dos principais grupos de compostos fenólicos



Fonte: Adaptado de ALBUQUERQUE ( 2021)

A identificação e dosagem destes compostos se faz importante devido à caracterização dos aspectos sensorial, funcional e preservação destes alimentos em distintas matrizes alimentícias. A dosagem do teor total de fenólicos é determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Esse ensaio se baseia na reação de oxidação/redução, ao medir a capacidade de compostos fenólicos e não fenólicos, de reduzir em meio alcalino o reagente ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico a complexos azuis passíveis de detecção espectrofotométrica (SINGLETON et al., 1999; MAGALHÃES, 2010).

## REFERÊNCIAS

1. ALBUQUERQUE, B. R., HELENO, S. A., OLIVEIRA, M. B. P., BARROS, L., & FERREIRA, I. C. **Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges.** *Food & Function*, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.
2. ALSAYADI, M., AL JAWFI, Y., BELARBI, M., SOUALEM-MAMI, Z., MERZOUK, H., SARI, D. C., ... & GHALIM, M. **Evaluation of anti-Hyperglycemic and anti-hyperlipidemic activities of water kefir as probiotic on Streptozotocin-induced diabetic Wistar rats.** *Journal of Diabetes Mellitus*, 2014.
3. AZI, F., TU, C., MENG, L., ZHIYU, L., CHERINET, M. T., AHMADULLAH, Z., & DONG, M. **Metabolite dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage bio-transformed by water kefir consortium.** *Food Chemistry*, p. 128225, 2020
4. AZI, F., TU, C., RASHEED, H. A., & DONG, M. **Comparative study of the phenolics, antioxidant and metagenomic composition of novel soy whey- based beverages produced using three different water kefir microbiota.** *International Journal of Food Science & Technology*, v. 55, n. 4, p. 1689-1697, 2020
5. *biochemistry*. Springer, New York, NY, 2009. p. 3-26.
6. BOWTELL, J., & KELLY, V. **Fruit-derived polyphenol supplementation for athlete recovery and performance.** *Sports Medicine*, v. 49, n. 1, p. 3-23, 2019.
7. BRUICE, P. Y. *Fundamentos de química orgânica*. 2. Ed. São Paulo: Pearson Education
8. BUENO, R. S., RESSUTTE, J. B., HATA, N. N., HENRIQUE-BANA, F. C., GUERGOLETTI, K. B., DE OLIVEIRA, A. G., & SPINOSA, W. A. **Quality and shelf life assessment of a new beverage produced from water kefir grains and red pitaya.** *LWT*, v. 140, p. 110770, 2020.
9. COPETTI, C., FRANCO, F. W., MACHADO, E. D. R., SOQUETTA, M. B., QUATRIN, A., RAMOS, V. D. M., ... & PENNA, N. G. **Acute consumption of bordo grape juice and wine improves serum antioxidant status in healthy individuals and inhibits reactive oxygen species production in human neuron-like cells.** *Journal of nutrition and metabolism*, 2018.
10. CORONA, O., RANDAZZO, W., MICELI, A., GUARCELLO, R., FRANCESCA, N., ERTEN, H., ... & SETTANNI, L. **Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices.** *LWT-Food Science and Technology*, v. 66, p. 572-581, 2016.
11. COSME, F., PINTO, T., & VILELA, A. **Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view.** *Beverages*, v. 4, n. 1, p. 22, 2018.
12. DA COSTA, M. R., DE ALENCAR, E. R., DOS SANTOS LEANDRO, E., MENDONÇA, M.A., & DE SOUZA FERREIRA, W. F. **Characterization of the kefir beverage produced from yam (*Colocasia esculenta* L.), sesame seed (*Sesamum indicum* L.) and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) extracts.** *Journal of food science and technology*, v. 55, n. 12, p.4851-4858, 2018.
13. DARVISHZADEH, P., ORSAT, V., & MARTINEZ, J. L. **Process optimization for development of a novel water kefir drink with high antioxidant activity and**

- potential probiotic properties from russian olive fruit (*Elaeagnus angustifolia*).** Food and Bioprocess Technology, p. 1-13, 2021.
14. DE ROOS, J., & DE VUYST, L. **Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages.** Current opinion in biotechnology, v. 49, p. 115-119, 2018
  15. do Brasil, 2014
  16. DURAZZO, A., LUCARINI, M., SOUTO, E. B., CICALA, C., CAIAZZO, E., IZZO, A. A.,...& SANTINI, A. **Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and**
  17. DWILOKA, B., RIZQIATI, H., & SETIANI, B. E. **Physicochemical and sensory characteristics of green coconut (*Cocos nucifera* L.) water kefir.** International Journal of Food Studies, v. 9, n. 2, 2020.
  18. EL GHARRAS, H. **Polyphenols: food sources, properties and applications—a review.** International journal of food science & technology, v. 44, n. 12, p. 2512-2518, 2009.
  19. FELS, L., JAKOB, F., VOGEL, R. F., & WEFERS, D. **Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir.** Carbohydrate polymers, v. 189, p. 296-303, 2018.
  20. Food and Agricultural Organization/World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada; 2002
  21. **future challenges.** Food & Function, v. 12, n. 1, p. 14-29, 2021.
  22. GARCIA, C., GUERIN, M., SOUIDI, K., & REMIZE, F. **Lactic fermented fruit or vegetable juices: Past, present and future.** Beverages, v. 6, n. 1, p. 8, 2020.
  23. GARCIA, S., BIZ, G., & SPINOSA, W. A. **Organic brown sugar and jaboticaba pulp influence on water kefir fermentation.** Ciência e Agrotecnologia, v. 43, 2019.
  24. GHNIMI, S., AL-SHIBLI, M., AL-YAMMAHI, H. R., AL-DHAHERI, A., AL-JABERI, F., JOBE, B., & KAMAL-ELDIN, A. **Reducing sugars, organic acids, size, color, and texture of 21 Emirati date fruit varieties (*Phoenix dactylifera*, L.).** NFS journal, v. 12, p. 1-10, 2018.
  25. GOMES, R. J., DE FATIMA BORGES, M., DE FREITAS ROSA, M., CASTRO-GÓMEZ, R.J. H., & SPINOSA, W. A. **Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications.** Food technology and biotechnology, v. 56, n. 2, p. 139, 2018.
  26. GONÇALVES, C., RODRIGUEZ-JASSO, R. M., GOMES, N., TEIXEIRA, J. A., & BELO, I. **Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates.** Analytical Methods, v. 2, n. 12, p. 2046-2048, 2010.
  27. HARBI, M., TLILI, I., BOUHLAL, R., & FATTOUCH, S. **Sugars and total phenolic contents in different fractions of autochthonous grape varieties grown in Tunisia.** Food, v. 7, n. Special Issue 1, p. 13-16, 2013.
  28. HILL, C., GUARNER, F., REID, G., GIBSON, G. R., MERENSTEIN, D. J., POT, B., ... & SANDERS, M. E. **Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic.** Nature reviews Gastroenterology & hepatology, 2014.
  29. **human health.** Phytotherapy Research, v. 33, n. 9, p. 2221-2243, 2019

30. IRAPORDA, C., ERREA, A., ROMANIN, D. E., CAYET, D., PEREYRA, E., PIGNATARO, O., ... & RUMBO, M. **Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells.** *Immunobiology*, v. 220, n. 10, p. 1161-1169, 2015.
31. KANDASAMY S., KAVITAKE D., SHETTY P.H. (2018) *Lactic Acid Bacteria and Yeasts as*
32. **kefir starter.** *Foods*, v. 9, n. 9, p. 1165, 2020.
33. KOH, W. Y., UTRA, U., AHMAD, R., RATHER, I. A., & PARK, Y. H. **Evaluation of probiotic potential and anti-hyperglycemic properties of a novel Lactobacillus strain isolated from water kefir grains.** *Food science and biotechnology*, v. 27, n. 5, p. 1369-1376, 2018.
34. KOH, W. Y., UTRA, U., ROSMA, A., EFFARIZAH, M. E., ROSLI, W. I. W., & PARK, Y.H. **Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach.** *Food science and biotechnology*, v. 27, n. 2, p. 525-535, 2018
35. LAUREYS, D., & DE VUYST, L. **Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.
36. LAUREYS, D., AERTS, M., VANDAMME, P., & DE VUYST, L. **Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process.** *Food microbiology*, v. 73, p. 351- 361, 2018.
37. LAUREYS, D., AND DE VUYST, L. **The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process.** *Journal of applied microbiology*, v. 122, n. 3, p. 719-732, 2017.
38. LAUREYS, D., LEROY, F., HAUFFMAN, T., RAES, M., AERTS, M., VANDAMME, P., & DE VUYST, L. **The type and concentration of inoculum and substrate as well as the presence of oxygen impact the water kefir fermentation process.** *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 161, 2021.
39. LIMBAD, M., GUTIERREZ MADDOX, N., HAMID, N., & KANTONO, K. **Sensory and**
40. ŁOPUSIEWICZ, Ł., DROZŁOWSKA, E., SIEDLECKA, P., MEŻYŃSKA, M., BARTKOWIAK, A., SIENKIEWICZ, M., ... & KWIATKOWSKI, P. **Development, characterization, and bioactivity of non-dairy kefir-like fermented beverage based on flaxseed oil cake.** *Foods*, v. 8, n. 11, p. 544, 2019.
41. LUTZ ML. **Recherchesbiologiques sur la constitution du Tibi.** *Bulletin de laSociete*
42. MAGALHÃES, L. M., SANTOS, F., SEGUNDO, M. A., REIS, S., & LIMA, J. L. **Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity.** *Talanta*, v. 83, n. 2, p. 441-447, 2010.
43. MARCO, M. L., SANDERS, M. E., GÄNZLE, M., ARRIETA, M. C., COTTER, P. D., DE VUYST, L., ... & HUTKINS, R. **The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 18, n. 3, p. 196-208, 2021.
44. MARRERO, S. C., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A., PÉREZ, S. E. M., & MOYA, S. P. **New trends and applications in fermented beverages.** In **Fermented Beverages** (pp. 31-66). Woodhead Publishing, 2019.

45. MARTÍNEZ- TORRES, A., GUTIÉRREZ- AMBROCIO, S., HEREDIA- DEL-ORBE, P., VILLA- TANACA, L., & HERNÁNDEZ- RODRÍGUEZ, C. **Inferring the role of microorganisms in water kefir fermentations.** International Journal of Food Science & Technology, v.52, n.2, p.559-571, 2017.
46. Mycologique de France. n. 15, p. 68-72. 1899
47. OAK, M. H., AUGER, C., BELCASTRO, E., PARK, S. H., LEE, H. H., & SCHINKERTH, V. B. **Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium.** Free Radical Biology and Medicine, v. 122, p. 161-170, 2018.
48. **physicochemical characterization of sourdough bread prepared with a coconut water**
49. PIDOUX, M. (1989). **The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grains from Lactobacillus hilgardii producing a polysaccharide gel.** MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology, v. 5, n. 2, p. 223-238, 1989.
50. PRADO, M. R., BLANDÓN, L. M., VANDENBERGHE, L. P. S., RODRIGUES, C., CASTRO, G. R., THOMAZ-SOCCOL, V., ET AL. **Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products.** Frontiers in microbiology, v. 6, p. 1177, 2015.
51. RANDAZZO, W., CORONA, O., GUARCELLO, R., FRANCESCA, N., GERMANA, M. A., ERTEN, H., ... & 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.
52. REZAC, S., KOK, C. R., HEERMANN, M., & HUTKINS, R. **Fermented foods as a dietary source of live organisms.** Frontiers in microbiology, v. 9, p. 1785, 2018
53. RICCI, A., CIRLINI, M., CALANI, L., BERNINI, V., NEVIANI, E., DEL RIO, D., ... & LAZZI, C. **In vitro metabolism of elderberry juice polyphenols by lactic acid bacteria.** Food chemistry, v. 276, p. 692-699, 2019.
54. ROMERO-LUNA, H. E., PEREDO-LOVILLO, A., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A., HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H., CAUICH-SÁNCHEZ, P. I., RIBAS-APARICIO, R. M., & DÁVILA-ORTIZ, G. **Probiotic potential of lactobacillus paracasei CT12 isolated from water kefir grains (tibicos).** Current microbiology, v. 77, n. 10, p. 2584-2592, 2020.
55. RUIZ ORONoz, M. **Estudio micológico de las zoogloas conocidas vulgarmente como tibeos.** An. Inst. Biol., Univ. Nal. Autón. México, v. 3, p. 183-190, 1932.
56. SANTOS, W. L. P.; MÓL, G. S.. Química cidadã. v. 3; n. 2, ed. São Paulo: Editora AJS, 2013.
57. SEPTEMBRE-MALATERRE, A., REMIZE, F., & POUCHERET, P. **Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation.** Food Research International, v. 104, p. 86-99, 2018.
58. SHARMA, R., GARG, P., KUMAR, P., BHATIA, S. K., & KULSHRESTHA, S. **Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods.** Fermentation, v. 6, n. 4, p. 106, 2020.
59. SINGLETON, V. L., ORTHOFER, R., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by**

- means of folin-ciocalteu reagent.** Methods in enzymology. Academic press, 1999. p. 152-178.
60. Society of London.(B.), n. 183, p. 125-197, 1892.
  61. Starter Cultures for Fermented Foods and Their Role in Commercialization of Fermented Foods. In: Panda S., Shetty P. (eds) Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries. Food Microbiology and Food Safety. Springer, Cham.
  62. SUMNER, J. B. & SISLER, E. B. **A simple method for blood sugar.** Archives of Biochemistry, New York, v. 4, p. 333-336, 1944.
  63. SUMNER, J. B., & GRAHAM, V. A. **Dinitrosalicylic acid: a reagent for the estimation of sugar in normal and diabetic urine.** Journal of Biological Chemistry, v. 47, n. 1, p. 5-9, 1921.
  64. **to the study of fermentation-yeasts and bacteria.** Philosophical Transactions of the Royal
  65. TU, C., AZI, F., HUANG, J., XU, X., XING, G., & DONG, M. **Quality and metagenomic evaluation of a novel functional beverage produced from soy whey using water kefir grains.** LWT, v. 113, p. 108258, 2019
  66. VERCE, M., DE VUYST, L., & WECKX, S. **Schottgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel Oenococcus species.** Frontiers in microbiology, v. 10, p. 479, 2019.
  67. VOLPI, G., GINEPRO, M., TAFUR-MARINOS, J., & ZELANO, V. **Pollution abatement of heavy metals in different conditions by water kefir grains as a protective tool against toxicity.** Journal of Chemistry, v. 2019, 2019
  68. WARD, H. M. V. **The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution**
  69. ZAMORA, F. (2009). Biochemistry of alcoholic fermentation. In: Wine chemistry and
  70. ZANIRATI, D. F., ABATEMARCO JR, M., DE CICCIO SANDES, S. H., NICOLI, J. R., NUNES, Á. C., & NEUMANN, E. **Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures.** Anaerobe, v. 32, p. 70-76, 2015.
  71. ZAUNMÜLLER, T., EICHERT, M., RICHTER, H., & UNDEN, G. **Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids.** Applied microbiology and biotechnology, v. 72, n. 3, p. 421-429, 2006



## **CAPÍTULO 2 AVANÇOS E DESAFIOS NA PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DOS PRODUTOS DE KEFIR E KEFIR-DE-ÁGUA DO PERÍODO DE 2002 A 2022**

### **2.1 Introdução**

O cenário pandêmico, declarado em 2020 em decorrência do vírus SARS-CoV-2, reforçou as discussões acerca da importância dos hábitos alimentares e as possíveis contribuições associadas aos alimentos fermentados, colocando-os novamente em destaque (BOUSQUET et al., 2021). O mercado de alimentos fermentados, estimado em cerca de 30 bilhões de dólares e em tendência crescente, caracteriza um cenário favorável ao desenvolvimento de produtos de kefir e kefir-de-água com novas formulações (VOIDAROU et al., 2021).

Acompanhado por esse movimento, surgiram questões relevantes sobre quais *starters*, grãos de kefir-de-água ou kefir-de-leite, são utilizados nos produtos - uma vez que há diferenças estruturais e de população microbiana gerando diferentes metabólitos e, portanto, bebidas distintas (LAUREYS & DE VUYST, 2014; WANG et al., 2021; GUZEL-SEYDIM et al., 2021). No que concerne ao uso dos grãos de kefir-de-água, pode ser gerado uma bebida com atributos sensoriais ácidos, florais e doces, caracterizada também pela presença de gás carbônico e teor alcoólico. Essas características estão diretamente associadas com o tempo de fermentação utilizado, microbiota, substrato e oferta de oxigênio do sistema (PATEL et al., 2022). Para os grãos de kefir-de-leite geralmente é utilizado como substrato da fermentação o leite animal (ovelha, vaca, cabra, búfala), que gera uma bebida ácida, levemente alcoólica, podendo conferir textura mais pastosa ou líquida (GUZEL-SEYDIM et al., 2021)

Com o consumo do kefir-de-água foi observado o efeito anti-hiperglicêmico e melhora do perfil lipídico em modelo murino, além de expressiva atividade antioxidante em consequência da presença dos derivados de flavonoides e ácidos fenólicos produzidos pela microbiota originada do grão (ALSAYADI et al., 2014; ROCHA-GOMES et al., 2018; KUMAR et al., 2021). A atividade antimicrobiana e antitumoral também foram observadas em modelos *in vivo*, além do efeito protetivo no epitélio gástrico de animais (GONDA et al., 2019; ZAMBERI et al., 2016; BRASIL et al., 2019). Esses efeitos benéficos foram

também encontrados para o kefir, que promove ainda uma redução na fadiga em modelo murino, assim como o aumento da densidade óssea e promove a melhora na digestão da lactose em modelo humano (HSU et al., 2018; TU et al., 2015). Apesar dos evidentes avanços na produção científica, a investigação dos efeitos benéficos em humanos ainda é escassa, principalmente para os produtos derivados do kefir-de-água.

Frente a esse cenário, faz-se necessário entender em qual posição os produtos do kefir e seus derivados estão alocados na produção científica mundial, bem como nas publicações de propriedade intelectual, uma vez que a prática da fermentação ocorre do âmbito doméstico ao industrial. Para mensurar esse impacto no meio científico foi sugerida a análise bibliométrica. Várias vantagens são apontadas com sua utilização: 1) Grande número de documentos rapidamente processados; 2) Variedade de bases de dados confiáveis, como *Web of Science* e *Scopus*, e 3) Fornece resultados de alta qualidade mostrando tendências e avanços de tópicos para diferentes áreas (DONTU et al., 2021). O uso dessa técnica está bem estabelecido, auxiliando na identificação de lacunas e fornecendo novas ideias.

Outra técnica importante para fornecer um panorama das possíveis tendências associadas ao produto e/ou processo é a análise de patentes, demonstrando quais países possuem o maior número de publicações de patentes, bem como avanços na propriedade intelectual ao longo dos anos. Com o auxílio da análise bibliométrica é possível construir uma visão robusta do estágio de desenvolvimento tecnológico e científico do kefir e do kefir-de-água. Desta forma, este capítulo tem como objetivo avaliar o cenário mundial do produto kefir e kefir-de-água nas bases tecnológicas e científicas de relevância.

## **2.2 Metodologia**

### **Análise de Patentes de Código Aberto**

A coleta de dados foi feita em 3 plataformas diferentes na busca de patentes publicadas, duas internacionais (Patentscope, Espacenet) e uma nacional (INPI). Para a plataforma PatentScope, a busca utilizando os termos descritores *EN\_ALL*:(*"kefir"*) *AND EN\_AB*:(*"kefir"*) *AND DP*:([01.01.2002 TO 01.07.2022]) geraram 449 resultados. Enquanto na plataforma Espacenet utilizando os termos *taall "kefir" ANDpdwithin*

"2002:2022" foram encontrados 549 resultados. Para a busca de produtos e tecnologias envolvendo especificamente o kefir de água foram utilizados os termos *taall* "kefir" *AND pdwithin* "2002:2022" *AND taall* "water-kefir" gerando 128 resultados na base Espacenet. Quando utilizado o escritório nacional INPI, utilizou-se o termo "kefir", para o período 2002-2022, foram encontrados 30 resultados. Para a construção gráfica desses resultados foi utilizado o software R versão 4.0.3 (Oldham, 2019).

#### **Sistema bibliométrico**

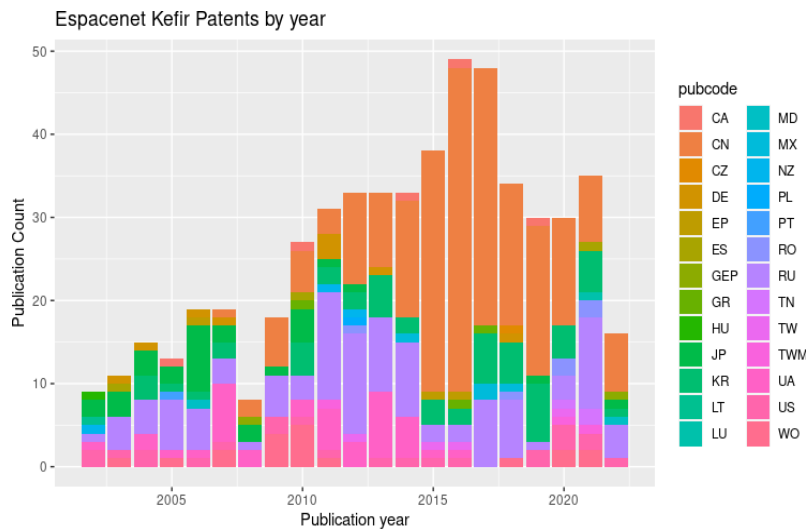
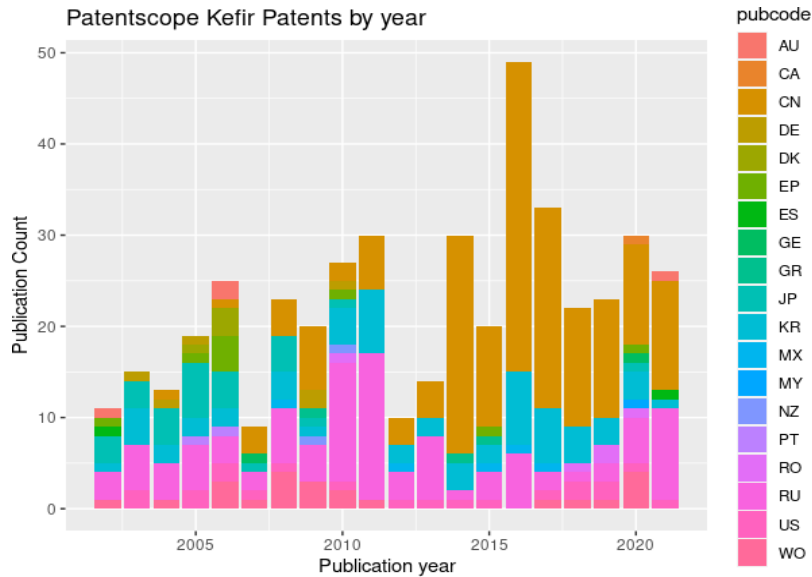
A base de dados *Web of Science* foi utilizada para a busca dos termos ["kefir" *OR* "water-kefir" *OR* "tibico" *OR* "sugarykefir"] em artigos originais, revisões e anais de conferências. E, quando foi aplicado o filtro de localização de termos para ocorrência em título/resumo foi encontrado um total de 915 documentos, para o intervalo de anos 2001-2021. A visualização gráfica foi construída sob o software livre VOSviewer, para países de coautoria, como método de contagem total, com o número mínimo de documentos de um país igual a 5 e o mínimo de citações de um país igual a 1. Embora dos 67 países que foram listados, apenas 33 atingiram o limite.

## **Resultados**

#### **Contribuição de cada país ao longo dos últimos 20 anos: patentes de kefir**

A Rússia e o Japão no início dos anos 2000 eram os maiores detentores de publicação de patentes de kefir, seguido por um crescimento consistente da China a partir de 2007, conforme ilustrado na figura 1. Esse crescimento chinês atingiu o topo em 2016, demonstrado nas duas bases de dados (figura 1a e 1b) ultrapassando países como Coreia, Japão e Rússia principalmente. Ao contrário desse movimento intenso, o Japão teve contribuições menores nos últimos 20 anos, assim como o WO e os Estados Unidos da América (EUA) que tiveram flutuação na contagem de publicações de patentes durante todo o intervalo de 2001-2021, principalmente na base de dados Patentscope.

**Figura 1.** Publicação de patentes por ano (2002-2022) para cada país, representados por uma cores diferentes. A) Resultado da busca na plataforma Patentscope; B) Resultado encontrado na busca feita pela plataforma Spacenet. AU: Austrália. CA: Canadá. CN: China. DE: Alemanha. DK: Dinamarca. ES: Espanha. GE: Geórgia. GR: Grécia. JP: Japão. KR: Coreia. MX: México. MY: Malásia. NZ: Nova Zelândia. PT: Portugal. RO: Romênia. RU: Rússia. US: Estados Unidos. WO: Escritório internacional. HU: Hungria. LT: Lituânia. LU: Luxemburgo. PL: Polónia. TN: Tunísia. TW: Taiwan.

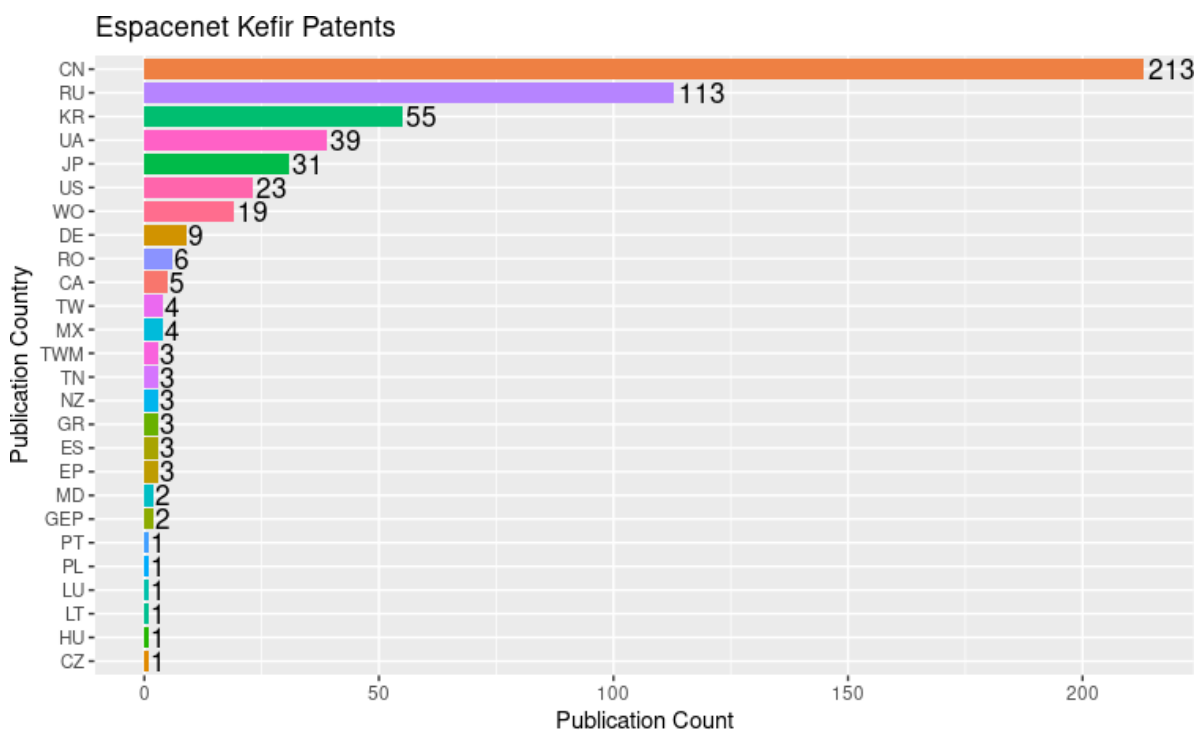


Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

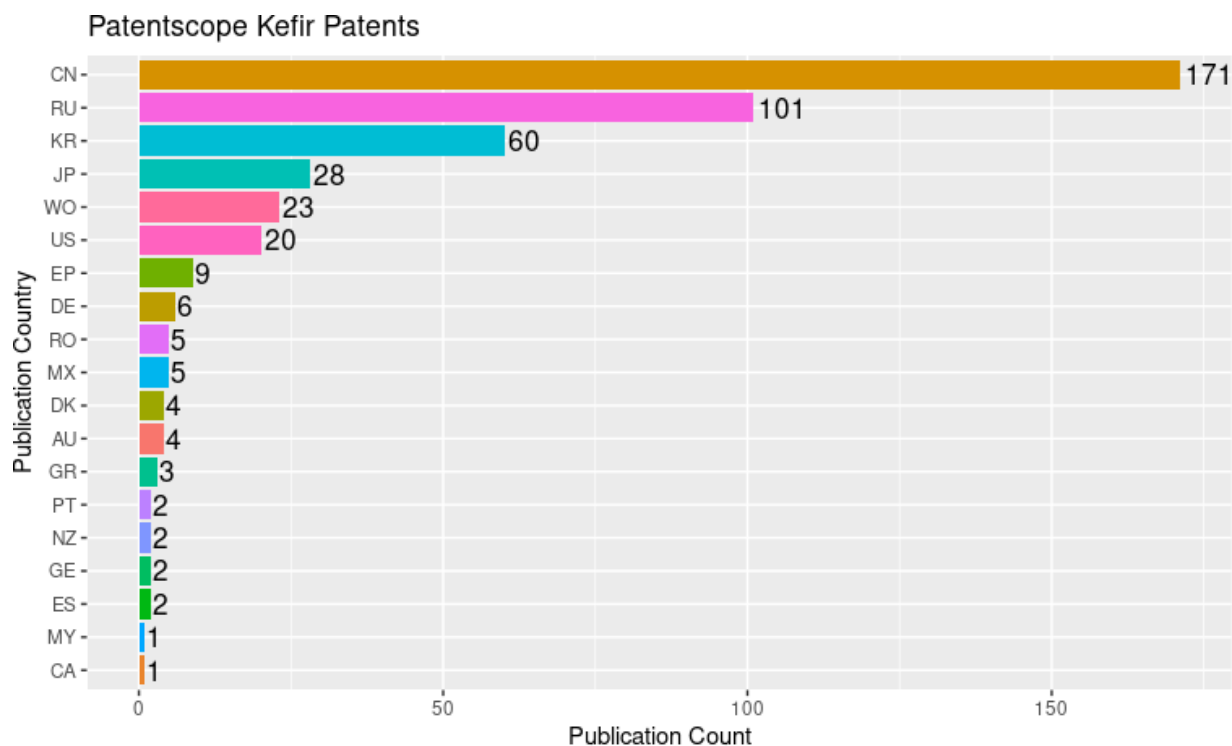
A partir de 2021 é notada a retomada da Rússia na publicação de patentes de kefir, permanecendo entre os 3 países com maior detenção tecnológica, nas duas bases de dados analisadas (Espacet e Patentscope). E, apesar da oscilação observada ao longo dos anos na contagem de publicação total por ano na base Patentscope (figura 1a, período de 2016 - 2021), o mesmo período encontra-se em crescimento na base Espacetnet (figura 1b). As imagens 2a e 2b corroboram com o perfil de crescimento acima explanado, com a China, Rússia, Coreia e Estados Unidos como principais países detentores das publicações de patente de kefir no mundo.

Figura 2. Contagem de publicação de patentes por país. Cada país é representado por uma cor diferente. A) Resultado da busca na plataforma Patentscope; B) Resultado encontrado na busca feita pela plataforma Spacetnet. AU: Austrália. CA: Canadá. CN: China. DE: Alemanha. DK: Dinamarca. ES: Espanha. GE: Geórgia. GR: Grécia. JP: Japão. KR: Coreia. MX: México. MY: Malásia. NZ: Nova Zelândia. PT: Portugal. RO: Romênia. RU: Rússia. US: Estados Unidos. WO: Escritório internacional. HU: Hungria. LT: Lituânia. LU: Luxemburgo. PL: Polónia. TN: Tunísia. TW: Taiwan.

A)



B)



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

#### **Contribuição de cada país ao longo dos últimos 20 anos: patentes de kefir de água**

A busca de patentes publicadas de kefir de água na base de dados Espacenet gerou 128 resultados, utilizando os termos descritores conforme metodologia descrita. No entanto, ao avaliar o resultado, apenas 23 documentos correspondiam ao objeto pesquisado. A base de dados Patentscope apresentou total de 16 documentos, tabela 1. Também foi feita a busca no INPI, escritório brasileiro de depósito de patentes, com o termo “kefir-de-água” e nenhum resultado foi encontrado, já para o termo “kefir” foram encontrados 30 pedidos de patentes e nenhuma patente publicada.

**Tabela 1.** Análise de patentes publicadas para “water-kefir” na base de dados Espacenet e Patentscope

Banco de dados	ID de publicação	Data de publicação	País	IPC
Espacenet	US2020352190A1	2020	US	A23C11/02; A23L33/10;C12J1/08
	CN105062929A	2015	CN	A23L2/02; A23L2/38; A23L2/52; A23L2/60; A23L2/84; C12N1/18; C12N1/20; C12R1/225; C12R1/245; C12R1/25; C12R1/46; C12R1/865
	DE102009031244A1	2011	DE	B43K29/00; B43K29/20;B43K7/00; C12P19/04;
	DE102004051717A1	2006	DE	A23L2/52; A23L2/68
	KR102254913B1	2021	KR	A23L2/38; A23L33/00; A23L33/105; A23L33/135
	DE102009040624B3	2011	DE	A01N25/10; A23L1/30; A23L29/269; A23L29/275; A61K47/36; A61K47/46; A61K9/14; A61L9/012
	KR101786096B1 KR20130003854A	2013 2017	KR	A23C9/127; C12G3/02; C12G3/04; C12H1/07; C12R1/69
	UA30416U	2008	UA	A23L21/10
	CN101720967A	2010	CN	A23L2/06; A23L2/84; A23L33/00; C12G3/02
	CN107593932A	2018	CN	A23C20/02
	CN111357928A	2020	CN	A23L29/00; A23L3/3571; A23L33/135;A23L7/104; C12N1/14; C12N1/20;C12R1/01; C12R1/02; C12R1/645
	RU2011113303A RU2485780C2	2012 2013	RU	A21D2/00; A21D8/02
	CN113925132A	2022	CN	A23L11/50; A23L29/00; A23L33/00

	RU2010104593A RU2450021C2	2011 2012	RU	C08B37/00
	CN104886472A	2015	CN	A23L1/168; A23L1/30
	CN106616799A	2017	CN	A23K10/12; A23K10/14; A23K50/30; A23L27/00; A23L27/24; A23L33/18
	US2002055164A1	2002	US	A23C1/06; C12N1/00; A01K1/015; B01D15/08; B65D65/46; C12N1/04
	RO134017A1	2020	RO	A23L2/84
	MX2016005543A	2017	MX	A23L33/10; A23L33/135
	CN109430596A	2019	CN	A23L2/02; A23L2/52; A23L33/10; A23L33/105
	MX2015014432A	2017	MX	A01N63/02; C12N1/14
	CN106819453A	2017	CN	A23K10/12; A23K10/14; A23K10/26; A23K10/30; A23K10/37; A23K40/10; A23K50/30
	CN106721296A	2017	CN	A23K10/14; A23K10/18; A23K10/30; A23K10/37; A23K50/30
WIPO	KR325792301	2021	KR	A23L 2/38; A23L 33/00; A23L 33/105; A23L 33/135
	WO2020226942	2020	WO	A23C 11/10; A23L 2/68; A23L 33/135
	DE106096649	2009	DE	C12P 19/04; B43K 29/; B43K 29/2; B43K 7/
	US310903702	2019	US	A23C 11/02; A23L 33/10; C12J 1/08
	CN348110480	2020	CN	A23C 11/10; A23L 2/68; A23L 33/135
	EP354537129	2020	EP	A23C 11/10; A23L 2/68; A23L 33/135
	CA339782412	2020	CA	A23C 11/10; A23L 33/135; A23L 2/68
	CN210698527	2017	CN	A23C 20/02



	DE104650655	2004	DE	A23L 2/68; A23L 2/52
	DE106101819	2009	DE	A61K 9/14; A61L 9/012; A01N 25/1; A61K 47/36; A23L 1/056; A23L 1/054; A23L 1/3; A61K 47/46
	CN299131413	2020	CN	A23L 7/104; A23L 3/3571; A23L 33/135; A23L 29/00; C12N 1/20; C12N 1/14; C12R 1/02; C12R 1/01; C12R 1/645
	WO2019009692	2018	WO	A61K 36/09; A61K 31/729; A61K 47/46; A61K 35/64; A61P 19/02; A61P 3/10
	MX208127481	2016	MX	A23L 33/135
	RO294401152	2018	RO	A23L 2/84
	MX199222741	2015	MX	A01N 63/02
	MX219334470	2017	MX	A61K 35/64

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

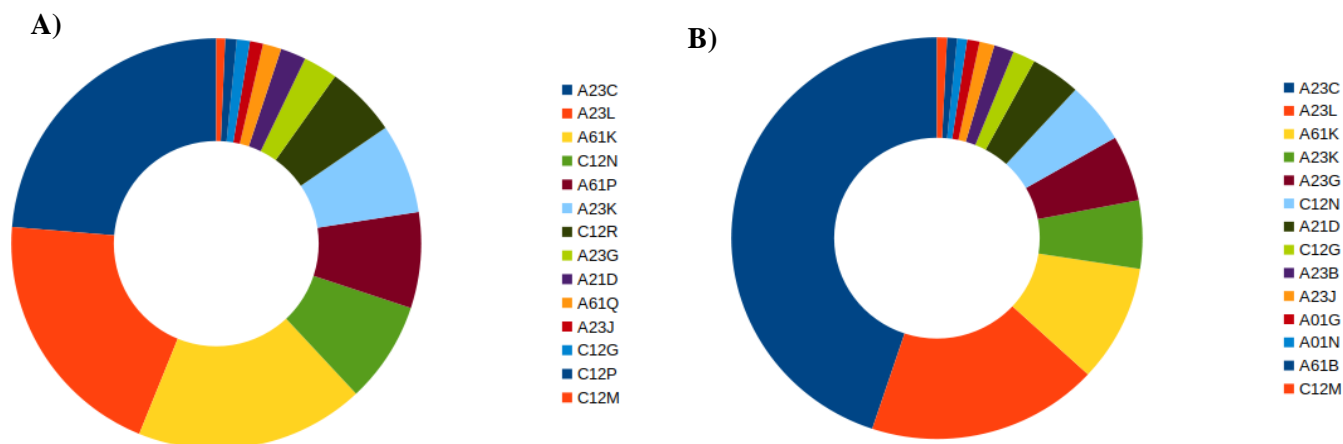
#### **Classificação internacional de patentes (IPC) de kefir**

Os dados coletados nas duas bases de dados trazem como predominância as seguintes IPC:

- A23C: Necessidades humanas; alimentos ou gêneros alimentares; tratamento do mesmo, não coberto por outras classes; laticínios;
- A23L: Necessidades humanas; alimentos ou gêneros alimentares; tratamento do mesmo, não coberto por outras classes; bebidas não alcoólicas;
- A61K: Necessidades humanas; preparações para fins médicos, dentários ou banheiros;
- A23G: Necessidades humanas; alimentos ou gêneros alimentares; tratamento do mesmo, não coberto por outras classes; produtos de cacau;

- C12N: Química; microrganismos ou enzimas; suas composições; propagar, preservar ou manter microrganismos; mutação ou engenharia genética; mídia cultural.

**Figura 3.** Classe das patentes encontradas na base Patentscope (A) e Espacenet (B) utilizando o termo “kefir” na busca, para o período 2002-2022



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

### Produção científica dos últimos 20 anos

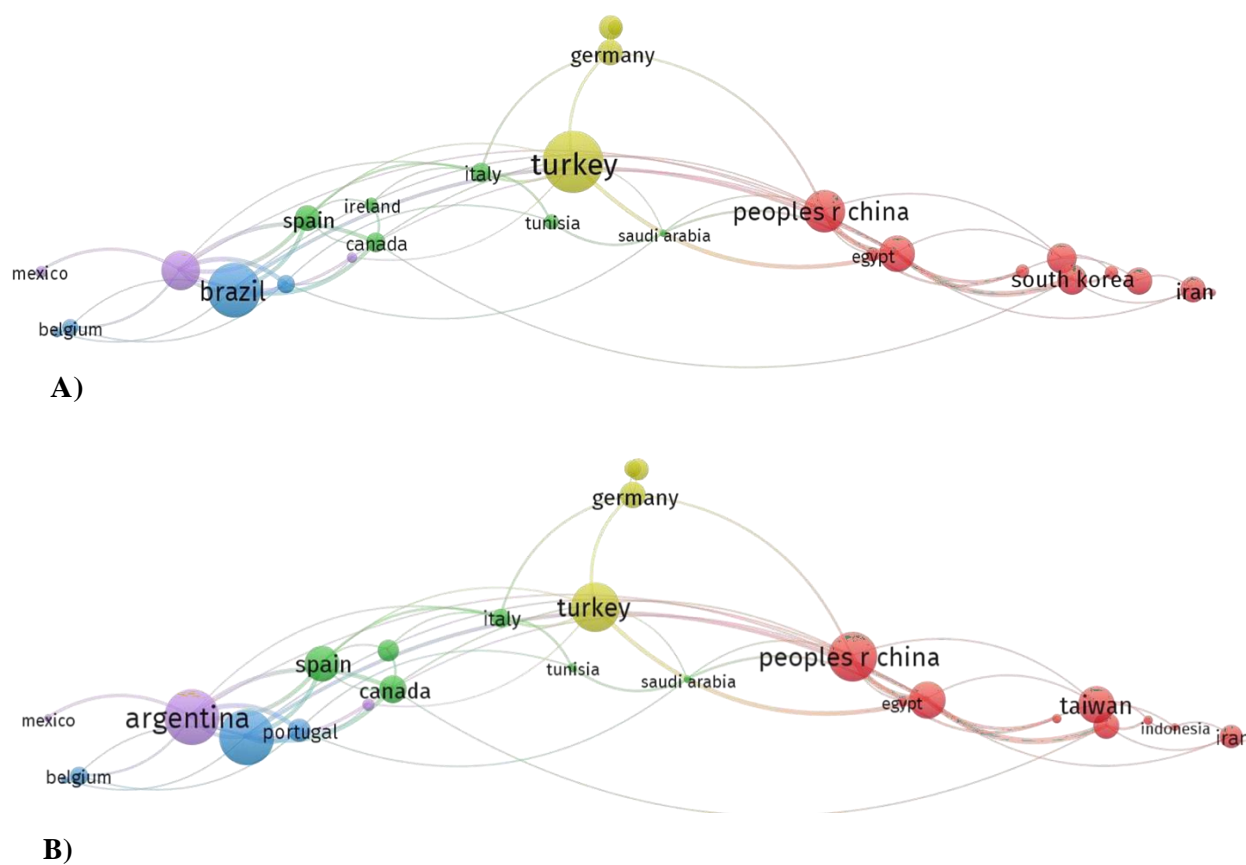
Ototal de 915 resultados foi encontrado quando os termos ["kefir" OR "water-kefir" OR "tibico" OR "sugarykefir"] foram usados para pesquisar artigos originais, anais de conferências e revisões na base de dados *Web ofScienceno* período de2002 a 2022. Conforme mostrado na figura 4a, tabela 2, os países Turquia, Brasil e China alcançaram o posto de maiores produtores científicos de documentos publicados com 147, 117 e 79 respectivamente.

Notavelmente, eles são agrupados separadamente conforme representado por cores. As linhas, também coloridas, representam as conexões entre os países, que demonstram as ligações intelectuais entre os países asiáticos e africanos, representados em vermelho. Além

disso, os países europeus e asiáticos, representados em verde, também demonstram uma correlação.

Para o número de citação por país, há um novo membro, não destacado na produção por país, a Argentina, que aparece neste contexto conforme mostra a figura 4b. Outro país aparece, para a mesma categoria, Portugal. Além desses resultados, a formação dos clusters é predominantemente a mesma, quando comparada à outra figura 4a. Isso indica um fenômeno consistente na produção intelectual mundial de kefir e termos relacionados.

**Figura 4.** Relação entre os países, por número de documentos citados entre si, demonstrado em clusters de diferentes cores.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

**Tabela 2.** Resultado da análise bibliométrica, relacionando o número de documentos, citações e ligações para cada país. Dados coletados no Web of Science

<b>País</b>	<b>Documentos</b>	<b>Citações</b>	<b>Ligações totais</b>
Turquia	147	2267	13
Brasil	117	2796	27
China	79	2285	14
Argentina	67	2832	30
Grécia	61	1089	8
EUA	58	1475	33
Coréia do Sul	44	764	12
Taiwan	44	1447	3
Indonésia	36	70	3
Espanha	34	1290	15
Irã	34	616	4
Alemanha	33	821	9
Polônia	29	362	1
Itália	21	457	10
Canadá	20	854	15
Portugal	18	672	16
Eslovênia	17	228	0
Bélgica	16	433	5
África do Sul	14	556	1
Tunísia	13	157	5
Egito	12	158	7
Japão	12	129	6
Irlanda	11	606	4
Malásia	11	144	4
México	10	125	3
Irlandado Norte	8	316	8

França	7	211	6
Romênia	7	45	2
Bulgária	7	471	0
Rússia	7	50	0
Arabia Saudita	5	125	7
Tailândia	5	69	1
Índia	5	44	0

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

### **Discussão**

A tecnologia resultante do processo de pesquisa e desenvolvimento, protegida pelo pedido de patente, permite que a indústria explore novas fontes e metodologias ainda antes do final do processo de publicação da patente (HENDRIX, 2020). Uma vez feito o mapeamento tecnológico envolvido neste processo, é possível identificar os polos de desenvolvimento científicos e tecnológicos em expansão.

Para um melhor entendimento do impacto do segmento de produtos de kefir, aplicamos uma análise de patentes publicadas no período de 2002 a 2022. Conforme descrito na seção anterior, Rússia, Japão e Coreia foram os maiores detentores de publicações de patentes de kefir no início dos anos 2000, com a presença de publicações chinesas atuando com expressividade a partir de 2009, originando assim o grupo de países que mais publicaram patentes, composto em ordem decrescente por China, Rússia, Coreia, Ucrânia e Japão para todos os anos seguintes analisados. O código IPC associado as patentes encontradas, tem como destaque, produtos classificados em derivados lácteos, bebidas não-alcoólicas, produtos médicos, produtos de cacau entre outras classes como uso de enzimas.

É compreensível que a maioria dos países pertencentes a este grupo sejam de origem asiática, uma vez que há na culinária e nos hábitos da população nativa a inserção de produtos fermentados tradicionais (AIDOO et al., 2006; ASHAOLU et al., 2020). É

necessário considerar, ainda, a origem dos grãos de kefir-de-leite, documentado como proveniente de áreas montanhosas do norte do Cáucaso, onde hoje é parte do território russo (KURMANN et al., 1992). Dado o histórico do uso de leite animal, também datado a partir dos primórdios do período Neolítico no sudoeste da Ásia, com posterior disseminação da agricultura na Europa, é provável que o consumo do leite ocorresse em sua maioria como variantes nessas regiões, a exemplo de queijos e leites fermentados (ROSENSTOCK et al., 2021).

Para a busca de patentes publicadas com o termo “*water-kefir*” os países que se destacam no ranque de publicações é novamente a China, Rússia, Coreia e, dessa vez, Alemanha e México. A origem dos grãos de kefir-de-água ainda é incerta, no entanto, há teorias que sugerem a ocorrência espontânea desse grão em artúculos de plantas da espécie *Opuntia* no México (LUTZ, 1899; RUIZ ORONoz, 1932), enquanto Ward, H. M. (1892) propõe que os soldados voltando da guerra da Criméia trouxeram esses grãos para a Europa ocidental. Há, ainda, a dificuldade em diferenciar o kefir-de-água do kefir-de-leite, o que dificulta o monitoramento da propriedade intelectual associada a esse *starter*. Apesar dos avanços científicos demonstrarem com clareza que há diferenças estruturais, microbiológicas e nos produtos, esses avanços ainda não foram absorvidos pelas demais áreas tecnológicas.

A influência europeia, assim como asiática, nos costumes e hábitos alimentares nos continentes norte e sul-americanos também foram evidenciados através da constante contribuição na publicação de patentes no período de 2002 a 2022 (EUA, WO, CA), tanto para o kefir-de-água, quanto para o kefir-de-leite, nas duas bases de dados internacionais. Essa influência repercutiu não apenas na detenção de tecnologia, como também no segmento de derivados lácteos e bebidas fermentadas, de modo que o valor estimado em 2019 para o mercado de kefir global foi de 1,23 bilhões de dólares, com projeção de crescimento para 1,87 bilhões até 2027 (MORETTI et al., 2022). Esse aumento no interesse de alimentos fermentados repercute também nos derivados do kefir-de-água, uma vez que

se tornaram importantes aliados para o público vegetariano e intolerantes a lactose que consomem alimentos fermentados (FIORDA et al., 2017).

O cenário brasileiro referente à propriedade intelectual desses dois produtos foi acessado apenas quando as buscas no banco INPI foram feitas em função do número de pedidos de patente, dado que não foram encontrados resultados para o período de 2002 a 2022 no número de publicações. Foram encontrados 30 pedidos de patente utilizando o termo descritor “kefir” dentro do período pesquisado. Essa discrepância entre pedidos *versus* publicações de patentes no INPI ocorre devido a burocracia inerente ao próprio processo interno, que vai desde a solicitação de pedido até a publicação. Outro fator limitante, dessa vez independente da base de dados que foi usada para extrair os dados, foi o nível de descrição pouco aprofundado acerca do *starter* (caracterização microbiológica do grão e origem).

Apesar das dificuldades enfrentadas pelos depositantes brasileiros, os consumidores de alimentos fermentados contam com uma legislação robusta quando se refere ao kefir. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 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” (BRASIL, 2007). Além de regulamentar a necessidade da presença de microrganismos específicos viáveis durante todo o período de prateleira, com a contagem mínima de  $10^7$  (UFC/g) de bactérias lácticas totais e de  $10^4$  (UFC/g) de leveduras específicas e de 0,5 a 1,5 de etanol (% v/m) (BRASIL, 2007). Descrição essa exclusiva para o Brasil e apenas válida para o kefir, uma vez que o kefir-de-água ainda não é descrito e regulamentado pelos órgãos competentes.

Em seguida, aplicamos a análise bibliométrica utilizando os termos ["kefir" OR "water-kefir" OR "tibico" OR "sugarykefir"] o período de 2002 a 2022. Foram encontrados quatro núcleos representando qual país com sua respectiva contribuição. Uma variação entre a razão de número de publicação e citação alterou esses núcleos, mostrando Argentina e Portugal com uma relevância significativa, com documentos com grande número de citações apesar do baixo número de documentos publicados ao longo dos anos em relação aos demais. Turquia, Brasil e China foram identificados como os países que mais publicaram documentos na área, com destaque para Brasil e China também pela quantidade de patentes. Isso indica um interesse não só dos pesquisadores, mas também do próprio mercado de alimentos fermentados.

### **Considerações finais**

As análises bibliométricas e de patentes estão em concordância, mostrando o produto kefir com potencial crescimento no mercado. Além disso, China, Rússia, Coreia, Ucrânia e Japão estão presentes no *ranking* de patentes, com EUA e Brasil trazendo incentivo ao mercado interno, demonstrando novas possibilidades de tendências de alimentos fermentados para além da propriedade intelectual. No entanto, o kefir e o kefir-de-água não possuem descrição suficiente (nível de origem) nos documentos de patente analisados. Paralelamente, no cenário científico, essa lacuna já é sanada, uma vez que o conceito de kefir e água-kefir estão bem estabelecidos.



## REFERÊNCIAS

1. BOUSQUET, J., ANTO, J. M., CZARLEWSKI, W., HAAHTELA, T., FONSECA, S. C., IACCARINO, G., ... & CONSTANTINIDIS, J. **Cabbage and fermented vegetables: From death rate heterogeneity in countries to candidates for mitigation strategies of severe COVID- 19.** *Allergy*, v. 76, n. 3, p. 735-750, 2021.
2. BRASIL, G. A., ANDRADE MORAES, F. S., PRUCOLI FALSONI, R. M., RESENDE, M. S., ANDRADE, T. U., & LIMA, E. M. **Pretreatment With Water Kefir Promotes A Decrease In Ulcer Development In An Ethanol-Acidified Ulcer Model.** *The FASEB Journal*, v. 33, n. S1, p. 760.2-760.2, 2019.
3. BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Resolução n° 46** de 23 out. 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis>>
4. DONTU, N., KUMAR, S., MUKHERJEE, D., PANDEY, N., & LIM, W. M. **How to conduct a bibliometric analysis: An overview and guidelines.** *Journal of Business Research*, v. 133, p. 285-296, 2021.
5. FIORDA, F. A., DE MELO PEREIRA, G. V., THOMAZ-SOCCOL, V., RAKSHIT, S. K., PAGNONCELLI, M. G. B., DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P., & SOCCOL, C. R. **Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review.** *Food Microbiology*, v. 66, p. 86-95, 2017.
6. GONDA, M., GARMENDIA, G., RUFO, C., LEÓN PELÁEZ, Á., WISNIEWSKI, M., DROBY, S., & VERO, S. **Biocontrol of Aspergillus flavus in ensiled sorghum by water kefir microorganisms.** *Microorganisms*, v. 7, n. 8, p. 253, 2019
7. GUZEL-SEYDIM, Z. B., GÖKIRMAKLI, Ç., & GREENE, A. K. **A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties.** *Trends in Food Science & Technology*, v. 113, p. 42-53, 2021.
8. HSU, Y. J., HUANG, W. C., LIN, J. S., CHEN, Y. M., HO, S. T., HUANG, C. C., & TUNG, Y. T. **Kefir supplementation modifies gut microbiota composition, reduces physical fatigue, and improves exercise performance in mice.** *Nutrients*, v. 10, n. 7, p. 862, 2018.
9. KUMAR, M. R., YEAP, S. K., LEE, H. C., MOHAMAD, N. E., NAZIRUL MUBIN AZIZ, M., KHALID, M., ... & ALITHEEN, N. B. **Selected kefir water from malaysia attenuates hydrogen peroxide-induced oxidative stress by upregulating endogenous antioxidant levels in SH-SY5Y neuroblastoma cells.** *Antioxidants*, v. 10, n. 6, p. 940, 2021.
10. KUMAR, M. R., YEAP, S. K., MOHAMAD, N. E., ABDULLAH, J. O., MASARUDIN, M. J., KHALID, M., ... & ALITHEEN, N. B. **Metagenomic and phytochemical analyses of kefir water and its subchronic toxicity study in BALB/c mice.** *BMC complementary medicine and therapies*, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021.
11. KURMANN, Joseph A.; RASIC, Jeremija L.; KROGER, Manfred. **Encyclopedia of fermented fresh milk products: an international inventory of fermented milk, cream, buttermilk, whey, and related products.** Springer Science & Business Media, 1992.

12. LAUREYS, D., & DE VUYST, L. **Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 80, n. 8, p. 2564-2572, 2014.
13. LUTZ ML. **Recherchesbiologiques sur la constitution du Tibi.** *Bulletin de laSocieteMycologique de France.* n. 15, p. 68-72. 1899
14. MORETTI, A. F., MOURE, M. C., QUIÑOY, F., ESPOSITO, F., SIMONELLI, N., MEDRANO, M., & LEÓN-PELÁEZ, Á. **Water kefir, a fermented beverage containing probiotic microorganisms: From ancient and artisanal manufacture to industrialized and regulated commercialization.** *Future Foods*, v. 5, p. 100123, 2022.
15. PATEL, S. H., TAN, J. P., BÖRNER, R. A., ZHANG, S. J., PRIOUR, S., LIMA, A., ... & DUBOUX, S. **A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes.** *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 80, p. 103084, 2022.
16. ROCHA-GOMES, A., ESCOBAR, A., SOARES, J. S., SILVA, A. A. D., DESSIMONI-PINTO, N. A. V., & RIUL, T. R. **Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats.** *Revista de Nutrição*, v. 31, p. 137-145, 2018.
17. ROSENSTOCK, E., EBERT, J., & SCHEIBNER, A. **Cultured milk: fermented dairy foods along the Southwest Asian–European Neolithic trajectory.** *CurrentAnthropology*, v. 62, n. S24, p. S256-S275, 2021.
18. RUIZ ORONoz, M. **Estudio micológico de laszoogleasconocidas vulgarmente como tibieos.** *An. Inst. Biol., Univ. Nal. Autón. México*, v. 3, p. 183-190, 1932.
19. TU, M. Y., CHEN, H. L., TUNG, Y. T., KAO, C. C., HU, F. C., & CHEN, C. M. **Short-term effects of kefir-fermented milk consumption on bone mineral density and bone metabolism in a randomized clinical trial of osteoporotic patients.** *PloSone*, v. 10, n. 12, p. e0144231, 2015.
20. VOIDAROU, C., ANTONIADOU, M., ROZOS, G., TZORA, A., SKOUFOS, I., VARZAKAS, T., & BEZIRTZOGLou, E. **Fermentative Foods: Microbiology, biochemistry, potential human health benefits and public health issues.** *Foods*, v. 10, n. 1, p. 69, 2021.
21. WANG, H., SUN, X., SONG, X., & GUO, M. **Effects of kefir grains from different origins on proteolysis and volatile profile of goat milk kefir.** *Food Chemistry*, v. 339, p. 128099, 2021.
22. WARD, H. M. V. **The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London.(B.)*, n. 183, p. 125-197, 1892.
23. ZAMBERI, N. R., ABU, N., MOHAMED, N. E., NORDIN, N., KEONG, Y. S., BEH, B. K., ... & ALITHEEN, N. B. **The antimetastatic and antiangiogenesis effects of kefir water on murine breast cancer cells.** *Integrative cancer therapies*, v. 15, n. 4, p. NP53-NP66, 2016.

## **CAPÍTULO 3 INFLUÊNCIA DO TIPO DE CULTURA FERMENTADORA NOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO SUCO DE UVA TINTO INTEGRAL FERMENTADO POR KEFIR-DE-ÁGUA**

### **Introdução**

O processo de fermentação, a depender do substrato e dos microrganismos envolvidos, é capaz de aumentar a biodisponibilidade de polifenóis, entre outras substâncias bioativas, como vitaminas, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (MARRERO, S. C. et al., 2019). Bebidas fermentadas por kefir-de-água à base de frutas são excelentes exemplos dessas mudanças benéficas na matriz alimentar, cujo perfil microbiológico e físico-químico diferem entre si em função da fonte de carbono selecionada e das condições da própria fermentação (tempo, temperatura, concentração dos grãos) (LAUREYS et al., 2021). Além de produtos como iogurte, leite fresco e leite fermentado, as bebidas fermentadas de frutas também são consideradas excelentes veículos de prebióticos, minerais, vitaminas e microrganismos vivos, com o adicional de ser livre de lactose e outros componentes alergênicos do leite (DINI, 2019).

O mercado de bebidas não alcoólicas também foi influenciado pelo movimento em busca da saudabilidade, onde, de acordo com o Statista, em 2022, a receita do segmento de suco de uva tinto integral chegou a US\$ 4.877,0 milhões com crescimento anual de 3,90% (CAGR 2022-2026). O suco de uva tinto integral traz aspectos funcionais, em função da presença de compostos fenólicos, com alto poder antioxidante, e pode ser considerada uma matriz alimentar benéfica para a saúde humana. Esta matriz pode prevenir doenças relacionadas ao estresse oxidativo, cardiovasculares e melhorar a performance de atletas (COPETTI et al., 2018; OAK et al., 2018; BOWTELL & KELLY, 2019). Vale ressaltar ainda a necessidade de atenção para o tipo de processamento dado a essa matriz, que quando submetida a processos fermentativos pode gerar teores alcoólicos superiores ao desejável.

As modificações decorrentes da fermentação podem alterar os aspectos sensoriais e funcionais do suco de uva, como por exemplo a cor e o teor total de compostos fenólicos. Mais um fator, igualmente importante a ser considerado quando o suco é submetido à

fermentação, é a estabilidade do produto final, primordial para a comercialização e segurança do alimento. O tipo de cultura iniciadora a ser empregada na fermentação, a saber, líquido, grão, conteúdo liofilizado, deve ser avaliado, principalmente para o kefir-de-água, cuja fermentação ocorre majoritariamente com uso dos grãos.

A fermentação utilizando o líquido, obtido através da fermentação prévia do próprio suco, ainda é pouco explanada na literatura como uma cultura iniciadora de novas fermentações, apesar de ser uma prática bem estabelecida para produtos como a kombucha. Essa estratégia traz pontos importantes a serem avaliados, dado o clamor do produto feito majoritariamente com suco integral. Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi avaliar o impacto nos parâmetros físico-químicos do produto obtido através do processo tradicional de fermentação realizada a partir dos grãos de kefir-de-água, e do suco de uva fermentado pela cultura iniciadora líquida, obtida pela fermentação do suco de uva com kefir-de-água.

## **Materiais e métodos**

### **Aquisição dos insumos para fabricação das bebidas**

O suco de uva tinto integral, sem adição de água, açúcares e conservantes, e os grãos de kefir-de-água foram obtidos através de doações de uma empresa situada na cidade de São Paulo-SP/ Brasil.

### **Aquisição das bebidas fermentadas por grãos de kefir-de-água**

A empresa, localizada na cidade de São Paulo- SP/ Brasil forneceu o suco de uva tinto integral fermentado pelos grãos de kefir-de-água pasteurizados (A) e não- pasteurizados (B).

### **Delineamento Experimental**

Grãos de kefir-de-água (GKA) e suco de uva fermentado por GKA (SF) foram utilizados como cultura iniciadora para fermentação do suco de uva tinto integral. As bebidas obtidas de cada cultura iniciadora foram avaliadas a cada 3 dias, por um período de 13 dias, e mantidas em refrigeração a 4°C até o momento das análises. As bebidas obtidas através do uso de GKA foram analisadas em três replicatas biológicas, identificadas pelo tratamento A (não pasteurizada) e B (pasteurizada). Para as bebidas obtidas com o uso do SF foram analisadas cinco replicatas biológicas, identificadas pelo tratamento C (1x GKA usado na

obtenção do SF), D (2x GKA usado na obtenção do SF) e E (5x GKA usado na obtenção do SF), conforme tabela 1.

**Tabela 1.** Delineamento experimental, com identificação dos tratamentos e seus respectivos *starters*, quantidade de grão e origem.

Tratamento	<i>Starter</i>	Quantidade de grão	Origem
A	GKA	Padrão da empresa	Empresa
B	GKA		
C	SF(GKA)	1 x (Padrão da empresa)	Laboratório
D	SF(2GKA)	2 x (Padrão da empresa)	Laboratório
E	SF(5GKA)	5 x (Padrão da empresa)	Laboratório

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

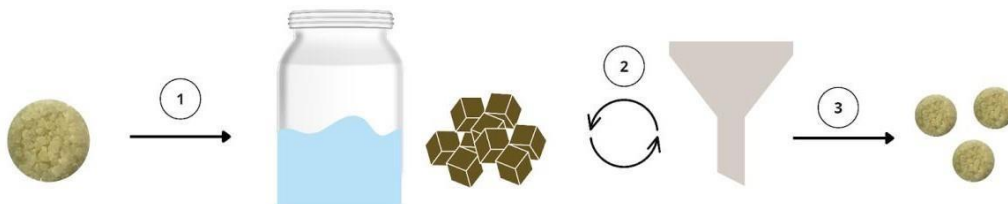
#### **Análise Estatística**

Os dados dos tratamentos A e B foram analisados em triplicata, enquanto os tratamentos C, D e E foram analisados em quintuplicata, por Análise de Variância (ANOVA) e modelo mais adequado escolhido através do AIC.

### Produção da cultura iniciadora líquida

Os grãos foram cultivados e propagados em solução açucarada, conforme descrito pela empresa doadora, figura 1. De modo geral, adicionou-se os grãos em solução açucarada, composta por água filtrada fervida e 20% (v/v) de açúcar mascavo, mantidos em pote hermético estéril fechado com tampa, em temperatura ambiente, pelo período de 24h. Os grãos foram coados com auxílio de malha fina estéril ao fim do tempo estabelecido. Foram desempenhados 2 ciclos, ou seja, duas trocas de solução açucarada, antes do uso dos grãos.

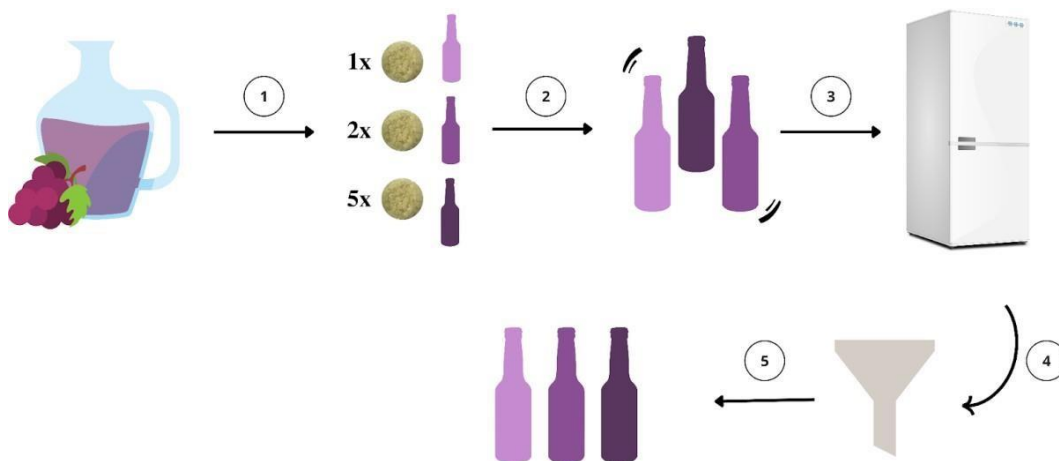
**Figura 1.** Propagação dos grãos de kefir-de-água. 1) Adição do GKA em solução açucarada; 2) Filtração para separação do GKA da solução fermentada após 24h, repetição do passo 1-2; 3) Separação do GKA prontos para uso.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022

Para a obtenção da cultura iniciadora SF, utilizou-se GKA recém propagados após 2 ciclos de fermentação em solução açucarada. Três concentrações diferentes de SF foram produzidas, dispendo GKA em suco de uva tinto integral em *Schotts* fechados, a temperatura e tempo definidos pelo processo convencional da empresa de referência. Após período estabelecido os grãos foram coados e o suco de uva fermentado em diferentes concentrações, figura 2.

**Figura 2.**Obtenção dos starters SF(GKA), SF(2GKA) e SF(5GKA). 1) Adição do suco de uva tinto integral em três concentrações diferentes de GKA em *Schott* fechado; 2) Homogeneização; 3) Incubação por tempo e temperatura definidos pela empresa; 4) Filtração para separação do GKA da fração líquida; 5) SF obtido em 3 concentrações de GKA. Siglas: GKA (grão de kefir-de-água); SF (suco de uva fermentado por GKA).

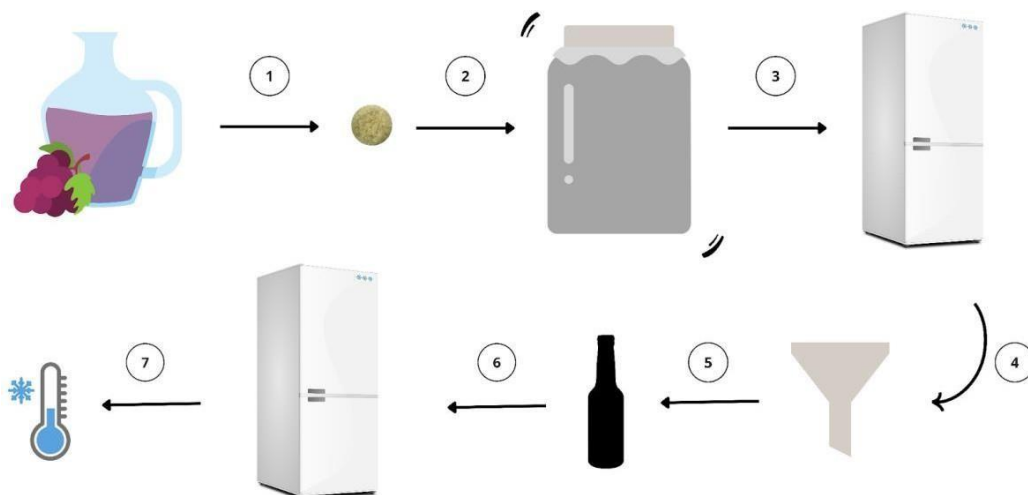


Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

### Produção da bebida fermentada com GKA e com SF

Os tratamentos A e B foram obtidos através da fermentação do suco de uva com GKA, as bebidas foram doadas pela empresa, produzidas conforme figura 3.

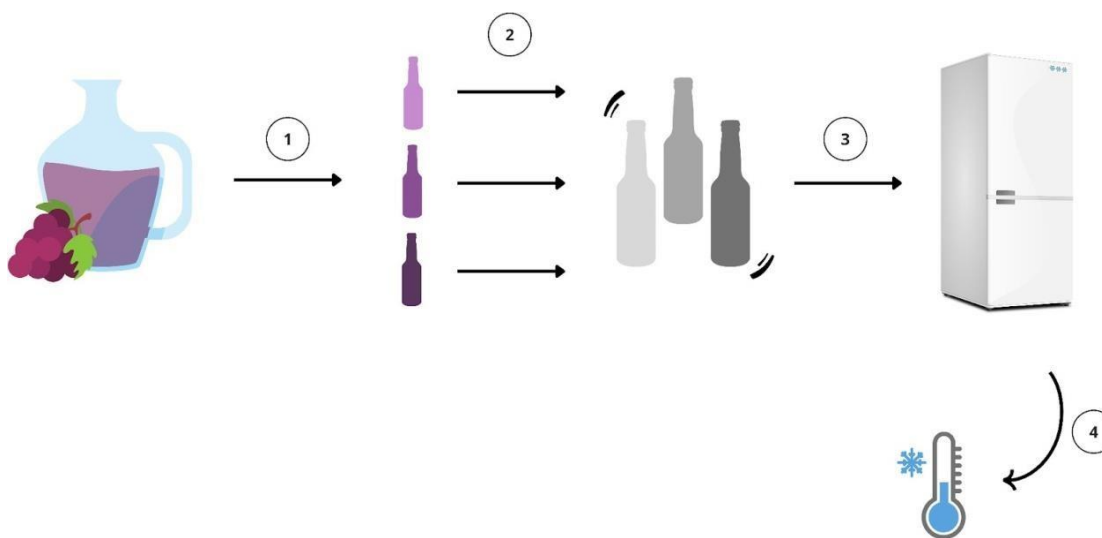
**Figura 3.** Fermentação do suco de uva com acultura iniciadora GKA. 1) Adição do GKA no suco de uva; 2) Homogeneização; 3) Incubação por tempo e temperatura definidos pela empresa; 4) Filtração para separação do GKA da fração líquida; 5) Envasamento da bebida fermentada; 6) Incubação para carbonatação; 7) Refrigeração da bebida pronta. Siglas: GKA: grão de kefir-de-água.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Para os tratamentos C, D e E a produção das bebidas fermentadas ocorreu com o uso do SF(GKA), SF(2GKA) e SF(5GKA), conforme ilustrado na figura 4.

**Figura 4.** Fermentação do suco de uva com acultura iniciadoralíquida. 1) Adição do SF no suco de uva; 2) Homogeneização; 3) Incubação por tempo e temperatura definidos pela empresa; 4) Refrigeração da bebida pronta. Siglas: GKA: grão de kefir-de-água; SF (suco de uva fermentado por GKA).



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.



### **Cinética de fermentação e maturação**

Grãos de kefir-de-água previamente cultivados em solução açucarada foram coados com auxílio de uma malha fina estéril e dispostos em *Schotts* de 250mL, contendo 200mL de suco de uva tinto integral e fechados com rolha, foram mensurados pelode 4 em 4 minutos pelo equipamento CINAC. A fermentação e maturação percorreu pelo período total de 24h, em quintuplicata.

### **Etanol**

A amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e retirado o sobrenadante. Os microtubosde *Headspace* foram preparados com a adição da amostra e padrão interno de 1-Propanol, submetidos a 70 °C por 30 minutos. Com auxílio de seringa, a fração volátil foi injetada no sistema CG com detector de Ionização por Chama (FID) com coluna inox (2 m x 2 mm) empacotada com Carbowax 1500. As temperaturas da coluna, injetor e detector foram de 120 °C, 150 °C e 150 °C, respectivamente. O gás carregador foi o N<sub>2</sub> e o H<sub>2</sub> como gás da chama com fluxo de 15 mL/min. As amostras foram analisadas em triplicata e seu sinal analítico convertido através de uma curva de calibração construída no mesmo dia de análise.

### **Açúcar redutor**

Os açúcares redutores (AR) foram determinados utilizando o método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) descrito por Miller (1959), adaptado para ensaio em microplacas de fundo chato (Santos et al., 2017). Foram coletados 25µL da amostra diluída e dispensados em microtubos âmbar, com adição de 25µL do reativo DNS (1% ácido 3,5-dinitrosalicílico e 30% tartarato duplo de sódio e potássio em 0,4 mol/L de NaOH) na sequência. Após homogeneização em vortex, os microtubos foram mantidos a 100°C por 5 min em banho-maria e em seguida resfriados em gelo. Após resfriamento, foi feita a adição de 330µL de água destilada em cada microtubo, foram homogeneizados e pipetados em placa de 96 poços, seguido para análise em Leitor de Microplacas (Synergy HTX multi-modereader). A leitura foi feita utilizando a faixa de 540nm, em triplicata instrumental para cada amostra. O teor de açúcar redutor de cada amostra foi gerado em g/L, a partir da equação da reta gerada com o padrão de glicose.

### **Análise colorimétrica**

As análises colorimétricas foram realizadas em sextuplicata para todos os tratamentos, com o colorímetro ColorQuest iluminante D65, correspondente a luz natural do dia e observador padrão 10°, de acordo com o sistema CIE (L\*a\*b\*). O parâmetro L\* indica a luminosidade, a medida de a\* indica a variação do vermelho (+a\*) para o verde (-a\*), e b\* a variação do amarelo (+b\*) para o azul (-b\*) (WYSZECKI & STILES, 1982). Para o cálculo das coordenadas esféricas, ângulo de tonalidade (H\*) e saturação (C\*), foram utilizadas as seguintes equações:

$$H^* = \arctg(b^*/a^*)$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

## **Resultados**

### **Teor de etanol e açúcares redutores (AR)**

A cada unidade de tempo, o etanol aumenta em 5,8051g/L para o tratamento A, e 4,4763 g/L para o tratamento B. O modelo mais adequado, explicando 95,35% do fenômeno produção de etanol, foi a função Etanol ~ Tratamento:Tempo, tabela 2.

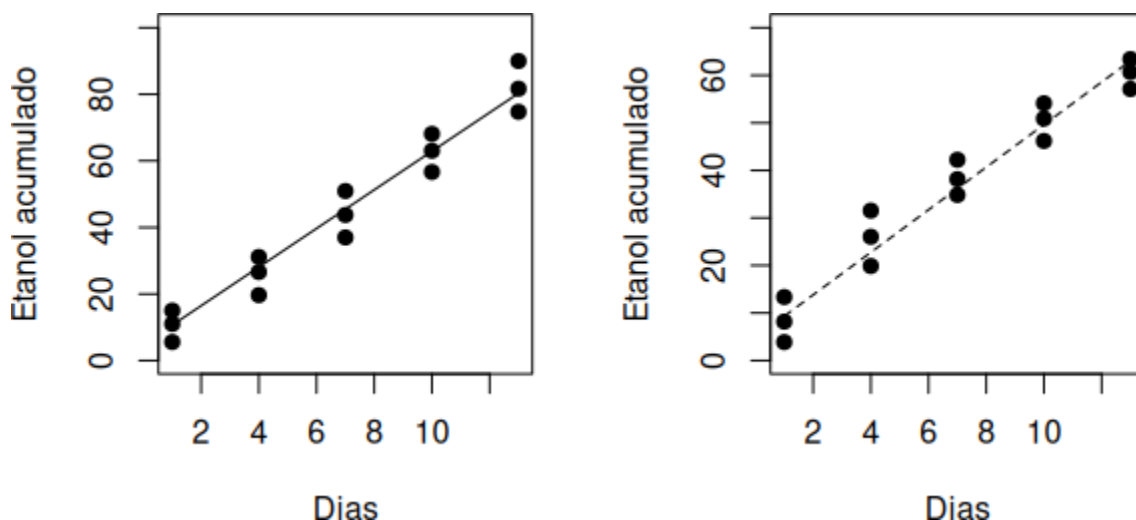
**Tabela 2.** Estimativa dos parâmetros analisados no modelo Etanol ~ Tratamento:Tempo

<b>Coefficiente</b>	<b>Valor Estimado</b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>Pr(&gt; t )</b>
<b>Intercepto</b>	4.8576	1.7747	0.0108 *
<b>A:tempo</b>	5.8051	2	<2e-16 ***
<b>B:tempo</b>	4.4763	2	<2e-16 ***
0 '***' 0,001 '***' 0,01 '*'			
R <sup>2</sup> -ajustado: 0,9535			

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Desse modo, foi observado um aumento constante para ambos os tratamentos (A e B), que alcançaram valores acima de 50g/L após 13 dias em refrigeração, figura 5, tabela 3.

Figura 5. Teor de etanol (g/L) acumulado ao longo do tempo (dias). Linha contínua (\_\_\_\_) representa o tratamento A; Linha tracejada (---) representa o tratamento B.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

**Tabela 3.** Valores médios e desvio padrão (DP) do teor de etanol (g/L) para os tratamentos A e B.

Variável	Dia	A		B	
		Média	DP	Média	DP
Etanol (g/L)	1	10.52	4.74	8.48	4.75
	4	25.79	5.77	25.81	5.83
	7	43.89	6.98	38.4	3.71
	10	62.6	5.74	50.4	3.98
	13	82.14	7.65	60.39	3.16

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

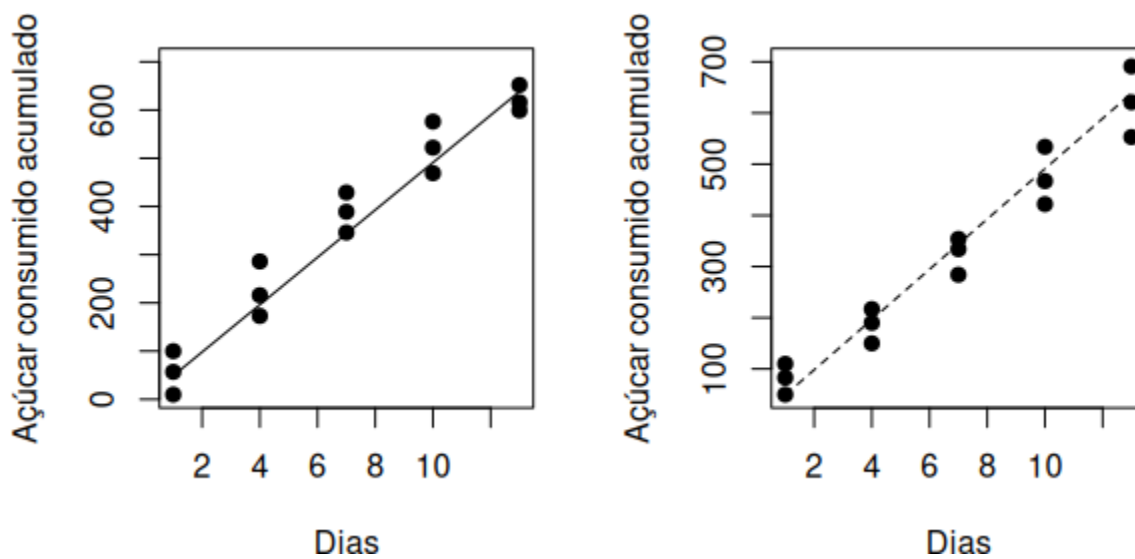
Para o consumo de açúcares redutores (AR) o modelo que melhor explicou o fenômeno foi a função Açúcar ~ tempo – 1, capaz de explicar 98,69% do fenômeno. De modo que a cada unidade de tempo são consumidos 49,107g/L de AR, figura 6, tabela 4 e 5.

**Tabela 4.** Estimativa dos parâmetros analisados no modelo Açúcar ~ tempo – 1.

Coefficiente	Valor Estimado	Erro Padrão	Pr(> t )
<b>Tempo</b>	49.107	1.033	<2e-16***
0	****	0,001	***
0,01	*		
Adjusted R-squared: 0,9869			

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

**Figura 6.** Consumo de AR (g/L) acumulado ao longo do tempo (dias). Linha contínua (\_\_\_) representa o tratamento A; Linha tracejada (---) representa o tratamento B.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

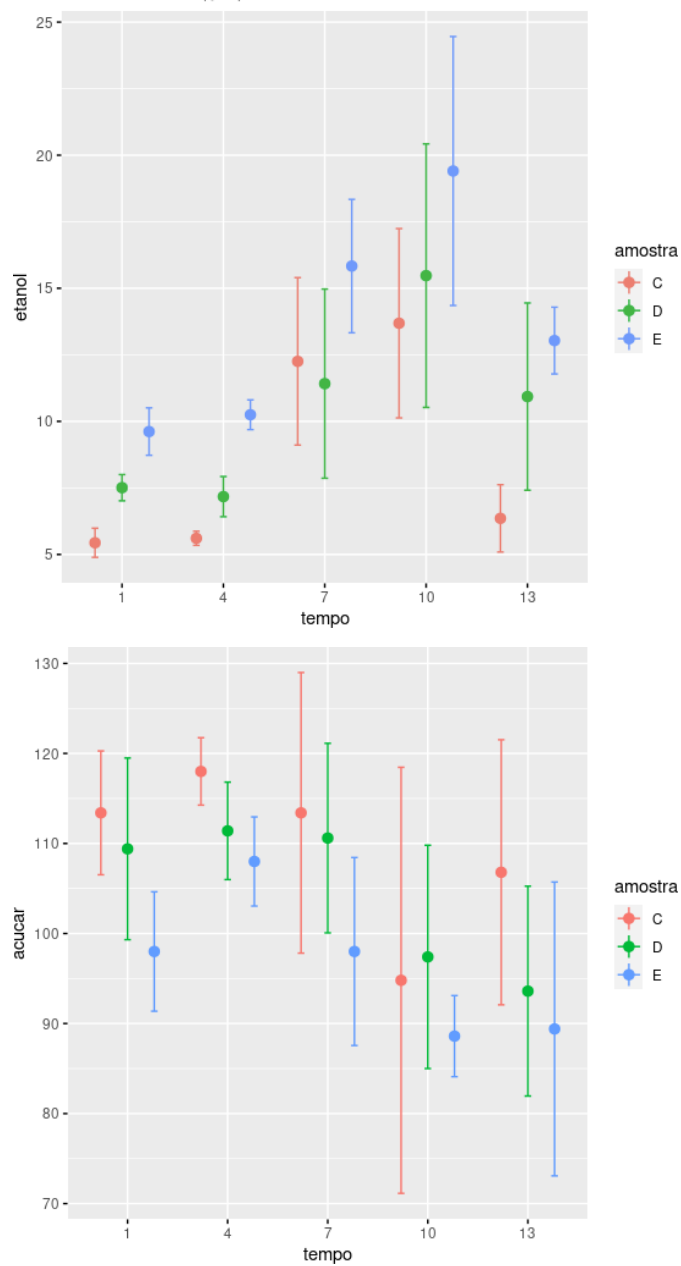
Tabela 5. Valores médios e desvio padrão (DP) do consumo de açúcares redutores (g/L) para os tratamentos A e B (triplicata biológica).

Variável	Dia	A		B	
		Média	DP	Média	DP
AR consumido (g/L)	1	55.67	45.01	81	30.05
	4	225	57.04	185.67	33.71
	7	388	41.51	324	36.06
	10	522.33	53.5	474.33	56.36
	13	622.33	27.06	621.67	69

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

Quando a cultura iniciadora GKA foi substituída pelo SF(GKA), representando o tratamento C, os níveis de etanol se mantiveram em aproximadamente 5g/L até o 4º dia de prateleira, com um aumento acima de 10g/L ao longo dos demais dias, com posterior queda atingindo novamente teores inferiores a 7g/L (figura 7 a). O decréscimo na quantidade de açúcares redutores acompanha a produção de etanol, assim como é de se esperar para todos os demais tratamentos. Os tratamentos D e E, apresentaram valores superiores a 7g/L no 1º dia após produção, mostrando-se estável assim como o tratamento C apenas até o dia 4, nos demais dias houve um aumento e eventual oxidação do etanol a partir do 1º dia.

**Figura 7.** Teor de etanol e açúcares redutores (AR) ao longo de 13 dias. A: Produção de etanol (g/L) ao longo do tempo e B: Teor de açúcares redutores (AR) representado pelos tratamentos C, D e E.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

### Parâmetros de cor

A análise dos parâmetros de cor L\*, a\*, b\*, H\* e C\* foram executadas no 1º dia após produção de todos os tratamentos e no 13º dia. Para todos os parâmetros não foi identificado diferenças significativas ao longo do tempo, o que demonstra estabilidade do produto diante das modificações feitas em seu processo de produção - tabela 6 e 7.

**Tabela 6.** Valores médios e desvio padrão (DP) para os parâmetros de cor L\*, a\* e b\* referente aos tratamentos A e B (triplicata biológica) e C, D e E (quadruplicata biológica).

Tratamento	L*		a*		b*	
	Dia 1	Dia 13	Dia 1	Dia 13	Dia 1	Dia 13
A	24,79±0,15	23,57±0,16	-1,78±0,04	-1,73±0,02	4,98±0,11	4,92±0,15
B	24,79±0,07	23,62±0,12	-1,93±0,03	-1,94±0,07	4,94±0,10	4,87±0,08
C	23,59±0,36	23,21±0,18	-1,18±0,04	-1,28±0,25	5,12±0,14	5,15±0,22
D	23,59±0,21	22,98±0,36	-1,11±0,07	-0,80±0,18	5,16±0,08	5,19±0,07
E	23,71±0,13	22,86±0,24	-0,81±0,05	-0,64±0,21	5,21±0,10	5,15±0,10

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

**Tabela 7.** Valores médios e desvio padrão (DP) para os parâmetros de cor HueAngle e Chroma referente aos tratamentos A e B (triplicata biológica) e C, D e E (quadruplicata biológica).

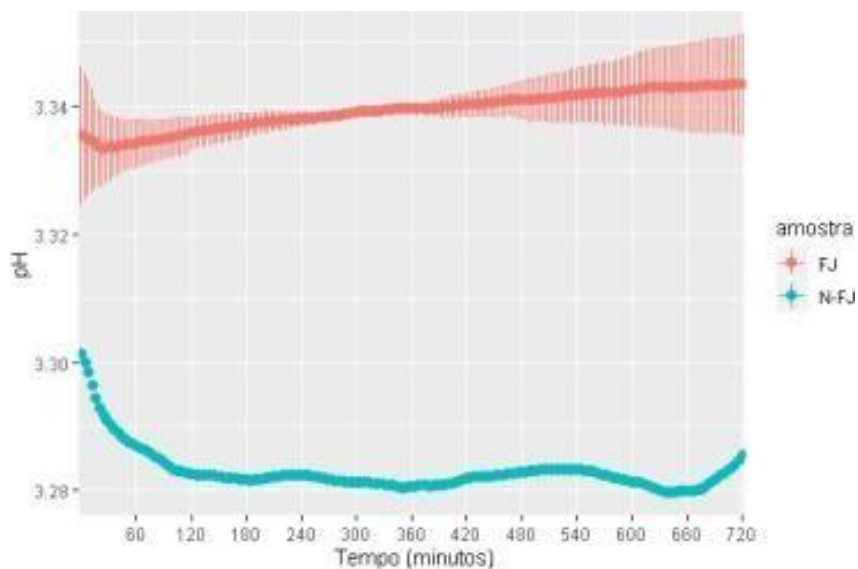
Tratamento	Hue Angle		Chroma	
	Dia 1	Dia 13	Dia 1	Dia 13
A	160,31± 0,70	160,59± 0,78	5,29± 0,09	5,22± 0,13
B	158,60± 0,36	158,28± 0,68	5,31± 0,10	5,25± 0,08
C	167,01± 0,35	166,05± 2,85	5,26± 0,14	5,31± 0,20
D	167,84± 0,65	171,22± 1,98	5,28± 0,09	5,26± 0,06
E	171,25± 0,46	172,95± 2,35	5,28± 0,11	5,20± 0,11

Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

## Monitoramento de pH

O pH foi monitorado por todo o período de fermentação do suco de uva com grãos de kefir-de-água, apresentando pH estável ao longo de todo o período analisado (figura 8).

**Figura 8.** Fermentação do suco de uva. Médias de pH do suco fermentado (FJ) representado em vermelho, acompanhadas do desvio padrão, n=2; pH do suco não fermentado (N-FJ) representado em azul. Medidas coletadas em intervalos de 4 minutos durante 12 horas.



Fonte: elaborado pelo autor, 2022.

## Discussão

Dificuldades na estabilidade do processo fermentativo e na proliferação dos grãos são alguns dos desafios encontrados pela indústria do kefir de água, o que ocasiona por sua vez variações na qualidade das bebidas produzidas por essa cultura iniciadora (LAUREYS et al., 2017). Laureys (2017) demonstrou como a temperatura de armazenamento interfere na microbiota do grão, especialmente na espécie *Lb. Hilgardii*, bactéria responsável por maior parte da produção do exopolissacarídeo formador do grão, que não é capaz de



sobreviver em condições de congelamento e descongelamento constantes, tornando a estrutura frágil e incapaz de gerar novos grãos.

O processo fermentativo em matrizes lácteas é comumente monitorado através da queda de pH ao longo do tempo, formando uma curva de acidificação. O mesmo é verdadeiro para matrizes lácteas inoculadas com grão de kefir de leite. No entanto, pode ocorrer tamponamento a depender da matriz que está sendo fermentada. Na figura 8 foi demonstrado o comportamento do pH durante a fermentação do suco de uva utilizando os grãos, com pH constante ao longo de todo o processo. A presença dos ácidos cítricos e málico, constituintes do suco de uva, além de prevenir a turbidez do produto e conferir sabor frutal, são conhecidos também como agentes tamponantes, o que explica o comportamento do pH ao longo da fermentação (COSME, 2018; RIZZON, 2007).

Os alimentos fermentados tradicionais possuem amplo valor econômico, além do aspecto social, cultural e regional agregado (CHEN et al., 2022). Dado esse cenário e sabendo que o kefir-de-água é consumido por públicos de diferentes faixas etárias, caracterizar esse produto faz-se necessário. A alternativa proposta nesse trabalho para trazer mais estabilidade para o processo, desde a obtenção da cultura iniciadora até a produção da bebida, foi a utilização da fermentação prévia do suco, utilizando o produto fermentado como cultura iniciadora para produção de novas bebidas. A matriz utilizada nesse trabalho é naturalmente rica em açúcares, uma vez que se trata de suco de uva integral, e devido ao seu alto potencial de fermentação foi realizada a análise de teor alcoólico para as diferentes fermentações, com grãos (tratamento A e B) e com líquido previamente fermentado pelos grãos (C, D e E).

A evolução da produção de etanol para o tratamento A mostrou-se constante, com aumento de 5,8051 g/L para o tratamento A e 4,4763 g/L para o tratamento B em unidades de tempo em dias. A observação do aumento constante do teor alcoólico, no lote pasteurizado (tratamento B) ocorreu em função dos diferentes comportamentos das unidades biológicas analisadas, uma vez que não foi possível identificar a contagem de leveduras e bactérias ao longo dos 13 dias de vida de prateleira do lote referido. Para o

tratamento não pasteurizado, também foi encontrado um comportamento heterogêneo entre as unidades amostrais, mas convergindo para aumentos expressivos na produção de álcool.

A padronização do lote fornecido pela indústria (A e B), cuja fermentação ocorreu apenas com os grãos de kefir de água, mostrou-se heterogêneo, corroborando estudos de caso anteriores por Laureys (2017). Quando os grãos foram substituídos pelo líquido previamente fermentado, em diferentes concentrações representadas pelos tratamentos C, D e E. acreditava-se que essa diferença nas unidades amostrais estaria diminuída, e que o lote produzido em escala laboratorial se apresentasse de modo mais homogêneo. No entanto, foi encontrada a mesma dificuldade de padronização além de novos desafios, como por exemplo, a ocorrência de produção de gás carbônico superior ao suportado pelas garrafas que acondicionavam a bebida fermentada (não quantificados no presente trabalho), levando ao estouro das garrafas e perda do produto.

A legislação brasileira prevê que bebidas com teor alcoólico acima de 0,5% sejam categorizadas como alcoólicas. Tratando-se dos alimentos fermentados tradicionais, é um desafio garantir que esses produtos estejam com teores inferiores a esse valor durante toda a vida de prateleira. Nos tratamentos A, B e C, cuja quantidade de grãos utilizada é a mesma, os produtos gerados ficaram dentro da categoria de não-alcoólicos no primeiro dia após produção, os demais tratamentos já estavam fora desse padrão no princípio da produção. É necessário destacar que apesar da troca de cultura iniciadora, do grão para o líquido, não ter apresentado homogeneidade dentro do lote e ter apresentado teores de etanol superiores ao que prevê a legislação brasileira ao longo dos 13 dias analisados, a produção de gás carbônico e estabilidade nos parâmetros de cor do produto foram um destaque para dos grupos C, D e E.

### **Conclusão**

A mudança da cultura iniciadora em grãos para o líquido não conferiu estabilidade ao produto final. Porém, essa mudança trouxe maior teor alcoólico. Com esse resultado, sugere-se novos estudos que visem a estabilidade do novo produto, inserindo-o em outra categoria de bebidas fermentadas, o que sugere a possibilidade de alcançar novo público alvo de maior valor agregado.

## REFERÊNCIAS

BOWTELL, J., & KELLY, V. **Fruit-derived polyphenol supplementation for athlete recovery and performance.** *Sports Medicine*, v. 49, n. 1, p. 3-23, 2019.

CHEN, W., LV, X., TRAN, V. T., MARUYAMA, J. I., HAN, K. H., & YU, J. H. **From Traditional to Modern: Progress of Molds and Yeasts in Fermented-Food Production.** *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 876872-876872, 2022.

COPETTI, C., FRANCO, F. W., MACHADO, E. D. R., SOQUETTA, M. B., QUATRIN, A., RAMOS, V. D. M., ... & PENNA, N. G. **Acute consumption of bordo grape juice and wine improves serum antioxidant status in healthy individuals and inhibits reactive oxygen species production in human neuron-like cells.** *Journal of nutrition and metabolism*, 2018.

DINI, I. An Overview of Functional Beverages. In: **Functional and Medicinal Beverages.** Academic Press, 2019. p. 1-40.

LAUREYS, D., LEROY, F., HAUFFMAN, T., RAES, M., AERTS, M., VANDAMME, P., & DE VUYST, L. **The type and concentration of inoculum and substrate as well as the presence of oxygen impact the water kefir fermentation process.** *Frontiers in microbiology*, v. 12, p. 161, 2021.

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

MARRERO, S. C., MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A., PÉREZ, S. E. M., & MOYA, S. P. New trends and applications in fermented beverages. **In Fermented Beverages** (pp. 31- 66). Woodhead Publishing, 2019.

MILLER, G. L. (1959). **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.

MÜLLER, L., GNOYKE, S., POPKEN, A. M., & BÖHM, V. **Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations.** *LWT-Food Science and Technology*, v. 43, n. 6, p. 992-999, 2010.

OAK, M. H., AUGER, C., BELCASTRO, E., PARK, S. H., LEE, H. H., & SCHINKERTH, V. B. **Potential mechanisms underlying cardiovascular protection by polyphenols: Role of the endothelium.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 122, p. 161-170, 2018.

SANTOS, A. A. D., DEOTI, J. R., MÜLLER, G., DÁRIO, M. G., STAMBUK, B. U., & ALVES JUNIOR, S. L. (2017). **Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagent.** Braz J Food Technol, 20, e2015113.

WYSZECKI, Gunter; STILES, Walter Stanley. **Color science.** New York: Wiley, 1982.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção científica, referente ao período de 2002-2022, estabelece parâmetros microbiológicos e estruturais do grão de kefir de acordo com o tipo de exopolissacarídeo, que diferem os produtos derivados de kefir e kefir-de-água. No entanto, não foi identificado essa diferenciação nas produções tecnológicas avaliadas nesse trabalho, o que dificulta o mapeamento dos produtos derivados do kefir-de-água e conseqüentemente na criação de legislações específicas para seus produtos. Da mesma forma, o impacto causado pela mudança da cultura iniciadora em grãos para o líquido oriundo da fermentação do suco de uva tinto integral por kefir-de-água, demonstrou não ser uma estratégia eficaz em busca da estabilização do produto ao longo do tempo com as condições propostas nesse trabalho. No entanto, trouxe uma possibilidade de desenvolvimento de novo produto derivado de kefir-de-água, com características promissoras para o público adulto em função do teor alcoólico alcançado. Devido às instabilidades deste fermentado tradicional e do alto potencial alcóolico, não foi possível avaliar seu desempenho na fadiga.