



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

**Kefir de água: isolamento de microrganismos, atividade antagonista e
caracterização físico-química da bebida**

CARLA AZEVEDO BILAC

Brasília
2024

CARLA AZEVEDO BILAC

**Kefir de água: isolamento de microrganismos, atividade antagonista e
caracterização físico-química da bebida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologias em Saúde como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
Coorientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Brasília
2024

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB595k Bilac, Carla Azevedo
Kefir de água: isolamento de microrganismos, atividade antagonista e caracterização físico-química da bebida / Carla Azevedo Bilac; orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador Izabel Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2024.
97 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologias em Saúde)
-- Universidade de Brasília, 2024.

1. Kefir. 2. Atividade antioxidante. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Bactérias do ácido acético. 5. Bactérias do ácido lático. I. Orsi, Daniela Castilho, orient. II. Silva, Izabel Cristina Rodrigues da, co-orient. III. Título.

CARLA AZEVEDO BILAC

**Kefir de água: isolamento de microrganismos, atividade antagonista e
caracterização físico-química da bebida**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi (Presidente)
Universidade de Brasília

Prof. Dra. Vania Silva Carvalho
Instituto Federal Goiano

Profa. Dra. Cainara Lins Draeger
Faculdade LS

Profa. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (Suplente)
Universidade Brasília

Brasília
2024

Ao meu esposo Marcelo e aos meus filhos Pedro e Arthur, cujo amor e apoio foram a base do sucesso dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão à Deus, fonte de infinita bondade e misericórdia, que iluminou cada passo da minha jornada acadêmica. A Sua presença constante em minha vida foi a luz que me guiou, permitindo que eu alcançasse mais esse mérito.

Um agradecimento especial ao meu esposo, Marcelo, meu amor e amigo, que compreendeu minhas ausências e esteve ao meu lado em cada momento que precisei. Seus incentivos foram importantes para o meu sucesso. Nos meus dias mais corridos, preparou deliciosos lanchinhos, trazendo conforto e aconchego. Seu amor e dedicação são meus tesouros.

Aos meus filhos, Pedro e Arthur, que são minha razão de viver. Eles assumiram responsabilidades em casa na minha ausência e sempre me ajudaram quando precisei, vejo isso como um gesto de amor. O cuidado que eles tem comigo enche o meu coração de alegria e orgulho. Eles fazem parte desta conquista e eu tenho muito orgulho dos homens que estão se tornando.

À minha família, em especial aos meus pais, por me ensinarem a perseguir meus sonhos com determinação e coragem e por me apoiarem em todos os momentos. À minha irmã, Leiliane, e ao meu cunhado, Wagner, no qual eu agradeço o incentivo constante neste projeto.

À minha orientadora Daniela, sei que não há palavras que possam expressar minha gratidão por sua orientação durante esses quase seis anos de caminhada acadêmica. Sua presença foi mais do que fundamental; foi transformadora. Sua paciência, sua disponibilidade para esclarecer todas as minhas dúvidas e o respeito e cuidado com que trata as pessoas são atitudes raras e preciosas. Com ela aprendi a amar a microbiologia. Sou grata por acreditar em minha capacidade e me incentivar a novas possibilidades. Obrigada por fazer parte da minha história. Ela foi um dos grandes pilares dessa trajetória.

À professora Izabel, minha coorientadora, que sempre me incentivou a novos desafios. Às vezes um pouco brava, ainda que cuidadosamente, mas sempre por um motivo plausível. Tem um coração gigante, cuidando de todos com tanta atenção e carinho. Agradeço por toda a atenção que me deu nos momentos que precisei. A sua orientação foi uma lição de dedicação e paixão pelo que se faz.

Ao nosso grupo de pesquisa, Karol, Marta, Rebeca e Bruno, com quem compartilhei muitos momentos. Sou grata por cada discussão, cada risada e cada solução encontrada juntos. Eles foram parte fundamental da minha jornada e da construção do conhecimento que levarei comigo.

Um agradecimento especial à Letícia, que foi um anjo no meu caminho. Sua ajuda e incentivo foram importantes para mim durante todo o mestrado, sempre me encorajou a participar de alguns projetos (tudo), mesmo quando hesitava. Com seu jeitinho amoroso, tinha o dom de me convencer a sair da minha zona de conforto. Nos dias mais difíceis e nas tarefas complicadas, seu apoio foi fundamental. Ela foi um tesouro que encontrei e virou uma amiga querida que respeito imensamente.

Ao Daniel, um pessoal incrível, que chegou ao laboratório e aos poucos conquistou a todos. Sempre disposto a ajudar, não mede esforços para sanar dúvidas e buscar repostas para as dificuldades do grupo. Sua contribuição foi crucial para a minha pesquisa e eu agradeço imensamente. A chegada dele foi muito enriquecedora para todos nós, especialmente para mim, que ganhei um amigo.

À professora Lívia, que sempre esteve presente, mesmo não participando diretamente da minha pesquisa, mas que sempre ofereceu apoio, contribuindo de maneira significativa para o meu projeto

Às minhas amigas, Gabriela, Tayane e Patrícia, por sempre estarem ao meu lado e pelos momentos divertidos que foram essenciais para meu relaxamento e equilíbrio.

Chegar até aqui não foi fácil, mas certamente foi enriquecedor e não seria possível sem a ajuda de todos que guardo no meu coração. Sou imensamente grata pelo apoio recebido ao longo do caminho. Ampliei meus horizontes e compreendi que não existem barreiras para quem tem determinação e persistência. Enfrentei muitos obstáculos, caí algumas vezes e desviei em outras, mas cada recusa e tropeço só me tornaram mais forte e resiliente. Sou profundamente grata pela receptividade e pela amizade que cultivamos nesses últimos anos. Com um coração repleto de gratidão, celebro o amor e a amizade que todos me deram.

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo”.

Colossenses 3:23-24

RESUMO

O kefir de água é uma bebida resultante do processo de fermentação de uma solução açucarada pelos microrganismos presentes nos grãos de kefir e possui propriedades probióticas. O objetivo deste estudo foi identificar geneticamente os microrganismos isolados do kefir de água e avaliar a sua atividade antagonista, além de analisar os aspectos físico-químicos da bebida. Para a produção da bebida, 10% (p/v) de grãos de kefir foram adicionados em uma solução de água e açúcar mascavo a 5°Brix e a fermentação ocorreu por 24 e 48 h a 30°C. Após o processo de fermentação, foram realizadas as análises de determinação de pH, acidez, açúcares e compostos fenólicos. A atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e ABTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-asulfonic acid). Para o isolamento dos microrganismos do kefir, as amostras foram semeadas em ágar Yeast Malt (YM), ágar All Purpose Tween, ágar M17, ágar Man, Rogosa and Sharpe e ágar Hestrin-Schamm, incubadas a 28°C e após 48 h, colônias com diferentes morfologias foram isoladas. Para o teste de atividade antagonista, discos de ágar de 5 mm contendo os microrganismos isolados do kefir foram colocados sobre placas de ágar YM previamente plaqueadas com *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Após 24 h de incubação a 37°C, os halos de inibição do crescimento das bactérias (em milímetros de diâmetro) foram medidos. A identificação genética dos microrganismos foi realizada pelo sequenciamento de DNA de bactérias e leveduras das regiões V3/V4 do gene 16S rRNA e espaçadora ribossomal ITS1, respectivamente. O kefir de água fermentado com açúcar mascavo em 48 h apresentou pH de 3,69, 0,50% de acidez, 3,43% de açúcares totais, 1,40 g.L⁻¹ de compostos fenólicos e atividade antioxidante de 57,8 mM TEAC.100 mL⁻¹ pelo método DPPH e 227,16 mM TEAC.100 mL⁻¹ pelo método ABTS. Dos 105 microrganismos isolados do kefir, 63,80% exibiram inibição contra *A. baumannii* (11,28 a 32,63 mm), 62,85% contra *P. aeruginosa* (10,81 a 26,87 mm), 72,38% contra *E. faecalis* (7,57 a 29,35 mm) e 53,33% contra *L. monocytogenes* (10,77 a 27,93 mm). O sequenciamento genético de 40 microrganismos do kefir identificou 65,0% de bactérias do ácido acético (BAA), 17,5% de bactérias do ácido láctico (BAL) e 15% de leveduras. As BAA foram compostas pelos gêneros *Gluconabacter*, *Acetobacter* e *Komagataeibacter*. As BAL foram identificadas como *Lactobacillus* e as leveduras foram identificadas como *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Palavras-chave: kefir; atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, bactérias do ácido acético, bactérias do ácido láctico, leveduras.

ABSTRACT

The water kefir is a beverage resulting from the fermentation process of a sugary solution by the microorganisms present in kefir grains and has probiotic properties. The aim of this study was to genetically identify the microorganisms isolated from water kefir and assess their antagonistic activity, as well as analyze the physicochemical aspects of the beverage. For the beverage production, 10 % (w/v) of kefir grains were added to a solution of water and brown sugar at 5°Brix, and fermentation occurred for 24 and 48 hours at 30°C. After the fermentation process, analyses were conducted for pH determination, acidity, sugars, and phenolic compounds. The antioxidant activity was assessed using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzo-thiazoline-6-asulfonic acid) methods. For the isolation of kefir microorganisms, samples were inoculated on Yeast Malt agar (YM), All Purpose Tween agar, M17 agar, Man, Rogosa and Sharpe agar, and Hestrin-Schamm agar, and then incubated at 28°C. After 48 hours, colonies with different morphologies were isolated. For the antagonistic activity test, 5 mm agar discs containing the isolated kefir microorganisms were placed on YM agar plates previously inoculated with *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, and *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. After 24 hours of incubation at 37°C, the inhibition zones of bacterial growth (in millimeters in diameter) were measured. The genetic identification of microorganisms was carried out by DNA sequencing of the V3/V4 region of the 16S rRNA gene for bacteria and the ribosomal ITS1 spacer region for yeast. The water kefir fermented with brown sugar for 48 hours exhibited a pH of 3.69, 0.50 % acidity, 3.43 % total sugars, 1.40 g.L⁻¹ of phenolic compounds, and an antioxidant activity of 57.8 mM TEAC.100 mL⁻¹ by the DPPH method and 227.16 mM TEAC.100 mL⁻¹ by the ABTS method. Out of the 105 microorganisms isolated from kefir, 63.80 % showed inhibition against *A. baumannii* (11.28 to 32.63 mm), 62.85 % against *P. aeruginosa* (10.81 to 26.87 mm), 72.38 % against *E. faecalis* (7.57 to 29.35 mm), and 53.33 % against *L. monocytogenes* (10.77 to 27.93 mm). The genetic sequencing of 40 kefir microorganisms identified 65.0 % acetic acid bacteria (AAB), 17.5 % lactic acid bacteria (LAB), and 15 % yeast. The AAB consisted of the genera *Gluconabacter*, *Acetobacter*, and *Komagataeibacter*. LAB were identified as *Lactobacillus*, and the yeast were identified as *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, and *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: kefir; antioxidant activity, antimicrobial activity, acetic acid bacteria, lactic acid bacteria, yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Bebida fermentada de kefir de água.....	21
Figura 2 - Grãos de kefir de água	23
Figura 3 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de água	24
Figura 4 - Detalhamento dos parâmetros utilizados na preparação das amostras...	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Lista de microrganismos identificados no kefir de água	25
Quadro 2 - Identificação genética dos microrganismos isolados de kefir de água e com base no sequenciamento de DNA de alto desempenho	51

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxa de crescimento dos grãos das amostras de kefir de água.....	41
Gráfico 2 - Valores de acidez total e pH das amostras de kefir de água	43
Gráfico 3 - (3A) Concentração Sólidos Solúveis Totais (SST) das amostras de kefir de água em 5 e 10 °Brix e (3B) Teor de açúcares redutores, sacarose e açúcar total da amostra de kefir de água fermentada com açúcar mascavo em 5 °Brix	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Compostos fenólicos e atividade antioxidante da bebida kefir de água fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo) em 5 °Brix a 30°C	47
Tabela 2 - Avaliação da capacidade inibitória dos microrganismos isolados do kefir de água contra <i>A. baumannii</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. faecalis</i> e <i>L. monocytogenes</i>	54

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - Curva padrão para ADNS	70
Apêndice B - Curva padrão de compostos fenólicos.....	70
Apêndice C - Curva padrão para DPPH	70
Apêndice D - Curva padrão para ABTS.....	70
Apêndice E - Gráficos de curvas padrões de ADNS, Fenólicos, DPPH e ABTS	71
Apêndice F - Valores de média e desvio padrão da taxa de crescimento dos grãos de kefir fermentados em concentração de açúcar a 5 °Brix e temperaturas de 25 e 30 °C por 24 e 48 h.....	72
Apêndice G - Valores de média e desvio padrão da taxa de crescimento dos grãos de kefir fermentados a 30 °C em concentrações de açúcar de 5 e 10 °Brix por 24 e 48 h.....	72
Apêndice H - Valores de média e desvio padrão da acidez total (g.L-1) das amostras de kefir de água	72
Apêndice I - Valores de média e desvio padrão do pH das amostras de kefir de água	Erro! Indicador não definido.
Apêndice J - Valores de média e desvio padrão do teor dos sólidos solúveis totais (°Brix) das amostras de kefir de água.....	73
Apêndice L - Valores de média e desvio padrão de açúcares redutores, sacarose e açúcares totais do kefir de água fermentado com açúcar mascavo por e 24 e 48 h.	73
Apêndice M - Antibiograma das bactérias patogênicas: <i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027, <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 51299 e <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	74
Apêndice N - Imagens dos resultados do teste de inibição dos microrganismos isolados do kefir de água frente a cepas patogênicas.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

aC	Resultado da equação da reta com hidrólise
ACT	Açúcar Total
AR	Açúcar Redutor
aS	Resultado da equação da reta sem hidrólise
BA	Bacilo
C0	kefir com açúcar cristal 0 h
C1	kefir com açúcar cristal 24 h
C2	kefir com açúcar cristal 48 h
CO	Coco
D0	kefir com açúcar demerara 0 h
D1	kefir com açúcar demerara 24 h
D2	kefir com açúcar demerara 48 h
DP	Desvio Padrão
<i>et al.</i>	E outros
G0	Peso inicial dos grãos de kefir em 0 h
G1	Peso final dos grãos de kefir em 24 e 48 h de fermentação
LE	Levedura
M0	kefir com açúcar mascavo 0 h
M1	kefir com açúcar mascavo 24 h
M2	kefir com açúcar mascavo 48 h
n	total de microrganismos isolados
N	total de microrganismos isolados
N/A	Não houve halo de inibição
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p	Quantidade suficiente para
RAM	Resistência Antimicrobiana
SB	Simbiose
spp.	Species
TX	Taxa

LISTA DE SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid
ADNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
APT	All Purpose Tween
ATCC	American Type Culture Collection
BAA	Bactérias do Ácido Acético
BAL	Bactérias do Ácido Lático
DPPH	2,2 difenil-1-picrilhidrazila
EPS	Exopolissacarídeo
FAO	Food and Agriculture Organization
GAE	Ácido gálico equivalente
HS	Hestrin-Schramm
MRS	Man Rogosa Sharpe
NaOH	Hidróxido de Sódio
RNA	Ácido Ribonucleico
rRNA	Ácido Ribonucleico ribossomal
SAC	Sacarose
SST	Sólidos solúveis Totais
TEAC	Trolox equivalente
TGI	Trato gastrointestinal
Trolox	6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico
UFC	Unidade formadora de colônia
YM	Yeast Malt

LISTAS DE SÍMBOLOS

°Brix	Concentração de sólidos solúveis em uma solução
°C	Grau Celsius
±	mais ou menos
g	Gramas
g.L	Gramas por litro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
p/v	Peso / volume
µL	Microlitro
µmol	micromol

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	20
1.1	PROBIÓTICOS	20
1.2	KEFIR DE ÁGUA.....	21
1.3	GRÃOS DE KEFIR DE ÁGUA.....	23
1.4	MICROORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA	25
1.5	COMPOSTOS PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO KEFIR DE ÁGUA	27
1.6	BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE ASSOCIADOS AO CONSUMO DO KEFIR DE ÁGUA	28
1.7	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E ALTERNATIVAS AOS MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS	29
2	OBJETIVOS	30
2.1	OBJETIVO GERAL	30
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR E DAS BEBIDAS FERMENTADAS	31
3.1.1	Esterilização de Vidrarias e Utensílios.....	31
3.1.2	Obtenção dos grãos de kefir.....	31
3.1.3	Obtenção das soluções de açúcares	31
3.1.4	Produção da bebida kefir de água.....	31
3.1.5	Avaliação da taxa de crescimento dos grãos de kefir.....	32
3.1.6	Acidez total	33
3.1.7	pH.....	33
3.1.8	Sólidos solúveis totais (SST).....	33
3.1.9	Concentração de açúcares.....	34
3.2	DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS BEBIDAS	35
3.2.1	Compostos fenólicos.....	35
3.2.2	Atividade antioxidante - DPPH.....	35
3.2.3	Atividade antioxidante – ABTS	36

3.3	ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DOS GRÃOS E DAS BEBIDAS DE KEFIR DE ÁGUA.....	36
3.3.1	Meios de cultura usados no isolamento dos microrganismos.....	36
3.3.2	Isolamento dos microrganismos	37
3.3.3	Purificação e manutenção dos microrganismos	37
3.4	TESTE DE ANTAGONISMO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA.....	37
3.4.1	Preparação dos microrganismos isolados do kefir para o teste de antagonismo	38
3.4.2	Preparação das bactérias patogênicas.....	38
3.4.3	Testes da atividade antagonista dos microrganismos isolados do kefir de água.....	38
3.5	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA.....	39
3.6	ESTATÍSTICA	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO KEFIR DE ÁGUA.....	41
4.1.1	Taxa de crescimento dos grãos de kefir de água	41
4.1.2	Teor de acidez total e valor de pH do kefir de água.....	43
4.1.3	Teor de Sólidos Solúveis Totais (SST) e açúcares do kefir de água ...	45
4.2	COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO KEFIR DE ÁGUA	47
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA.....	49
4.4	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA.....	51
4.5	TESTE DE ANTAGONISMO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA.....	54
5	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	APÊNDICE	70

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PROBIÓTICOS

O conceito de "probiótico" foi inicialmente introduzido por Eli Metchnikoff, um cientista russo laureado com o Prêmio Nobel, que realizou pesquisas no Instituto Pasteur no início do século passado. Ele destacou a relação interdependente entre a microbiota intestinal e a dieta, evidenciando como os alimentos podem modular a composição da microbiota em nossos corpos, substituindo microrganismos prejudiciais por aqueles que oferecem benefícios (Metchnikoff, 1907).

O entendimento do conceito de probióticos tem evoluído ao longo do tempo. Os probióticos são microrganismos vivos suplementares na alimentação que impactam positivamente o organismo hospedeiro, promovendo o equilíbrio microbiano. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) destaca que a administração adequada de probióticos traz benefícios à saúde, influenciando diretamente a microbiota intestinal, com a ressalva de que a quantidade administrada deve ser apropriada para garantir a eficácia e a segurança (FAO/WHO, 2006).

Os benefícios dos probióticos se destacam em tratamentos relacionados a doenças gastrointestinais, com especial eficácia no combate à diarreia. Além disso, há indícios de que esses microrganismos contribuam para a estimulação do sistema imunológico, a redução dos níveis de colesterol e podem ter efeitos potencialmente anticancerígenos. Dessa forma, os probióticos emergem como promissoras alternativas terapêuticas, promovendo a saúde intestinal e aprimorando o bem-estar geral dos indivíduos (Kechagia *et al.*, 2013).

O consumo global de probióticos tem crescido e os alimentos probióticos são comumente referidos como alimentos fermentados. Dentro da categoria de alimentos fermentados, encontramos uma diversidade que é considerada probiótica ou enriquecida com probióticos, incluindo queijo, iogurte, kefir de água, kefir de leite e kombucha (Cufaoglu; Erdinc, 2023).

Existem critérios específicos para a caracterização de um microrganismo como probiótico. É necessário que ele faça parte da microbiota do trato gastrointestinal (TGI) e demonstre estabilidade frente ao pH estomacal e à presença de sais biliares. Além disso, deve ter a capacidade de aderir à mucosa, colonizar o intestino, participar do

metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta e inibir o crescimento de bactérias patogênicas. A síntese de vitaminas e outros metabólitos essenciais para a manutenção do sistema digestório também são critérios relevantes (Marco *et al.*, 2021).

Dentre os alimentos probióticos, o kefir de água se destaca como uma bebida amplamente reconhecida, caracterizada por uma microbiota resistente às condições adversas do trato gastrointestinal e por suas propriedades benéficas para a saúde (Romero-Luna *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2022). No contexto brasileiro, ainda não existe uma regulamentação específica para classificar a bebida fermentada kefir de água.

1.2 KEFIR DE ÁGUA

O kefir de água é uma bebida produzida através do processo de fermentação de uma solução de açúcares por bactérias e leveduras presentes nos grãos de kefir (Lynch *et al.*, 2021) (Figura 1). Para o preparo da bebida podem ser utilizados vários tipos de açúcares, mel, melado, sucos de frutas e água de coco (Bueno *et al.*, 2021). Desse modo, o uso de diferentes substratos proporciona a diversificação de sabores e aromas da bebida, além de conferir maior oferta de nutrientes (Fiorda *et al.*, 2017; Lynch *et al.*, 2021; Pendón *et al.*, 2022).

Figura 1 - Bebida fermentada de kefir de água



Fonte: Autoria própria (2023)

A origem do kefir de água permanece indefinida, embora relatos na literatura descrevam uma bebida consumida por soldados britânicos durante a Guerra da Crimeia em 1855. Essa bebida era fermentada por grãos com características de massa sólida, semitranslúcida, irregular e quebradiça, variando em tamanho. Esses grânulos foram denominados "Plantas de Gengibre" por Ward (1892). Kleber (1921) descreveu outros nomes para os grãos de kefir de água como "Abelhas da Califórnia", "Abelhas africanas", "Nozes Ale", "Bálsamo de Gilead", "Bèbéés" e "Sementes de Cerveja Japonesa". Entre tantas variações os nomes "Tibi" e "Tibico" são os mais populares para os grãos de kefir de água e foram dados para que houvesse uma distinção em relação aos grãos de kefir de leite (Moretti *et al.*, 2022).

Os grãos de kefir são pequenos e translúcidos, com tamanhos que variam de 1 a 10 mm de diâmetros e as cores transitam do amarelo pálido ao marrom (Cufaoglu; Erdinc, 2023). Eles possuem em sua superfície uma variedade de microrganismos, como Bactérias do Ácido Lático (BAL), Bactérias do Ácido Acético (BAA) e leveduras, que estabelecem uma relação simbiótica. As interações entre as bactérias e leveduras nos grãos estabelecem um ambiente favorável para o processo de fermentação (Lynch 2021; Laureys *et al.*, 2021). Durante a fermentação, a microbiota presente nos grãos utiliza os açúcares disponíveis na solução, metabolizando e liberando no meio uma variedade de compostos orgânicos resultando em uma bebida com uma diversidade única de aromas e sabores (Martínez-Torres 2017).

A bebida kefir de água apresenta variações em seu preparo, assim, as proporções dos grãos não possuem um padrão, variando de 5 a 10 % (p/v) (Pendón *et al.*, 2022). A variação na concentração dos grãos exerce uma influência significativa tanto nas características sensoriais quanto nos compostos orgânicos gerados pelos microrganismos durante o processo de fermentação (Calatayud *et al.*, 2021; Koh *et al.*, 2017). O kefir de água passa por um processo de fermentação em que a temperatura varia de 20 a 37°C, enquanto o tempo de fermentação pode variar de 24 a 96 h (Maldonado *et al.*, 2020; Rodríguez *et al.*, 2022; Zanirati *et al.*, 2015).

No início da fermentação, apenas uma fração dos microrganismos presentes nos grãos se desloca para a bebida, enquanto a maior parte permanece fixada na matriz gelatinosa dos grãos (Laureys *et al.*, 2021). Isso sugere que uma parcela importante do metabolismo microbiano ocorre nos grãos durante o processo de fermentação do kefir, e a duração da fermentação da bebida é diretamente afetada

pela concentração do inóculo presente em tais grãos (Darvishzadeh; Orsat; Faucher, 2021; Rodríguez *et al.*, 2022).

É relevante destacar que as condições de fermentação podem ser adaptadas conforme as preferências pessoais e as características específicas dos grãos de kefir de água utilizados (Guzel-Seydim; Gökirmakli; Greene, 2021). O tempo de fermentação, a concentração de açúcar e a temperatura são variáveis ajustáveis para atender aos gostos individuais e alcançar o sabor desejado (Bengoa *et al.*, 2018).

Após a fermentação primária, o kefir de água pode ser consumido ou submetido a uma fermentação secundária. Durante essa etapa subsequente, os grãos de kefir são removidos, a bebida fermentada é transferida para recipientes novos (Moretti *et al.*, 2022) e frequentemente, frutas ou sucos são incorporados para proporcionar aroma e sabor à bebida (Darvishzadeh; Orsat; Faucher, 2021). A segunda fermentação pode ocorrer em temperatura ambiente ou refrigerado, por um período adicional de 12 a 24 h (Romero-Luna, 2020). A fermentação secundária em recipientes fechados mantém o dióxido de carbono, o que proporciona uma bebida carbonatada (Guzel-Seydim; Gökirmakli; Greene, 2021).

1.3 GRÃOS DE KEFIR DE ÁGUA

Os grãos de kefir de água são reconhecidos por sua capacidade de produzir um componente essencial em sua estrutura denominado exopolissacarídeo (EPS). O EPS é uma substância viscosa e gelatinosa que cobre os grãos de kefir, conferindo-lhes a distinta textura e consistência (Fels *et al.*, 2018; Laureys *et al.*, 2018; Luang-In *et al.*, 2018; Pendón *et al.*, 2022) (Figura 2).

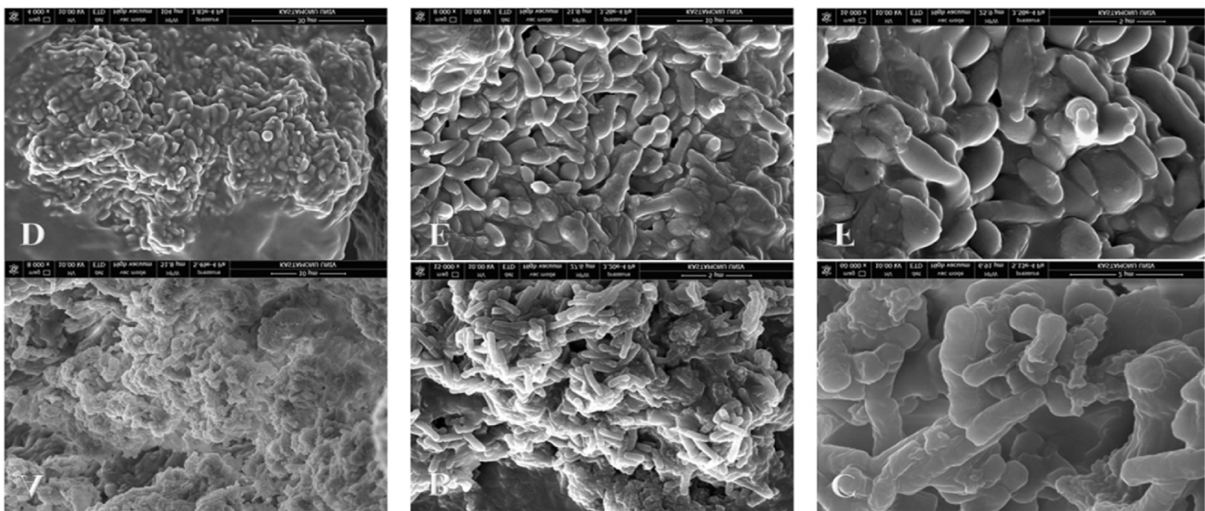
Figura 2 - Grãos de kefir de água



Fonte: Autoria própria (2023)

A estrutura do EPS é formada principalmente por dextrano, que é um polissacarídeo de alto peso molecular, e em menor quantidade por levana, que é um oligossacarídeo constituído por frutose. Essa matriz desempenha um papel fundamental na proteção dos microrganismos que compõem os grãos de kefir (Figura 3), atuando como uma barreira física contra agentes externos e estresses ambientais durante o processo de fermentação (Fels *et al.*, 2018; Laureys *et al.*, 2018; Luang-In *et al.*, 2018; Pendón *et al.*, 2022)

Figura 3 - Imagem de microscopia eletrônica de varredura de grãos de kefir de água



Fonte: Cufaoglu e Erdinc (2023)

Os grãos do kefir de água têm notável aumento no volume após as fermentações, possibilitando várias fermentações consecutivas. Esse fenômeno oferece opções versáteis para o manejo dos excedentes. Esses grãos excedentes têm a possibilidade de serem oferecidos para cultivo caseiro, armazenados visando recuperação posterior ou usados para ampliar a capacidade de produção (Coma *et al.*, 2019; Moretti *et al.*, 2022).

Na indústria láctea, a produção de EPS por bactérias ácido-lácticas é valorizada por contribuir com propriedades funcionais em produtos como queijos, melhorando aspectos sensoriais e atuando como agentes espessantes (Lucena *et al.*, 2022). Além disso, alguns pesquisadores notaram que durante o desenvolvimento das estruturas dos grãos de kefir, a microbiota existente sintetiza um biofilme. Este biofilme possui potencial tanto para ser utilizado em formulações farmacêuticas quanto na criação de

novos materiais biodegradáveis e como estabilizador na fabricação de cosméticos (Luang-in *et al.*, 2018).

1.4 MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR DE ÁGUA

O kefir de água se destaca por sua rica diversidade microbiológica, conforme detalhado no Quadro 1. Os *Lactobacillus* spp. são predominantes dentre as BAL, *Acetobacter* é o gênero predominante das BAA, e as principais leveduras são *Saccharomyces* e *Dekkera* (Laureys e De Vuyst, 2016). A proporção de bactérias e leveduras pode variar, sendo que alguns estudos observaram uma semelhança na proporção dos microrganismos, enquanto outros identificaram uma maior quantidade de leveduras nos grãos (Laureys *et al.*, 2018; Laureys; De Vuyst, 2014; Verce; De Vult; Weckx, 2019).

Quadro 1 - Quadro resumo de bactérias e leveduras identificadas por estudos que realizaram a caracterização de microrganismo em kefir de água.

BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO	LEVEDURAS	BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO
<i>Bifidobacterium crudilactis</i>	<i>Bullera alba</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i>
<i>Bifidobacterium psychraerophilum</i>	<i>Candida ethanolica</i>	<i>Acetobacter indonesiensis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Candida kruisii</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	<i>Candida lambica</i>	<i>Gluconobacter oxydans</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Candida tetragidarum</i>	<i>Gluconobacter frateurii</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Casei</i>	<i>Candida valida</i>	<i>Gluconobacter liquefaciens</i>
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Pseudopantarum</i>	<i>Chaetospermum chaetosporum</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Rhamnosu</i>	<i>Clonostachys miodochialis</i>	
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>Paracasei</i>	<i>Dekkera bruxellensis</i>	
<i>Lactobacillus collinoides</i>	<i>Dipodascus geotrichum</i>	
<i>Lactobacillus farraginis</i>	<i>Guehomyces pullulans</i>	
<i>Lactobacillus fructiovorans</i>	<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Hanseniaspora vinae</i>	
<i>Lactobacillus hordei</i>	<i>Hanseniaspora yalbensis</i>	
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Hanseniospora uvarum</i>	
<i>Lactobacillus nagelii</i>	<i>Kazachstania barnettii</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>	
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	<i>Mortierella alpina</i>	
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Ochrobactrum lupini</i>	

BACTÉRIAS DO ÁCIDO LÁCTICO	LEVEDURAS	BACTÉRIAS DO ÁCIDO ACÉTICO
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	<i>Ramularia pratensis</i>	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	<i>Saccharomyces bayanus</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranicum</i>	<i>Saccharomyces pretonensis</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Mesenteroides</i>	<i>Saitozyma podzolica</i>	
<i>Limosilactobacillus suionicum</i>	<i>Zopfiella marina</i>	
<i>Oenococcus kitaharae</i>	<i>Zygosaccharomyces florentinus</i>	
	<i>Zymomonas mobilis</i>	

Fonte: Azi *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2022; Patel *et al.*, 2022; Rios *et al.*, 2023; Zamberi *et al.*, 2016

A microbiota dos grãos de kefir de água exibe uma atividade metabólica intensa, proporcionando uma aceleração do processo de fermentação conforme a quantidade de grãos aumenta (Laureys *et al.*, 2021). As leveduras nos grãos iniciam a fermentação e contribuem para o aumento dos níveis de glicose e frutose por meio da hidrólise da sacarose, que são metabolizados pelas BAA e BAL (Guzel-Seydim; Gökirmakli; Greene, 2021). As BAA desempenham a função de oxidar o etanol presente na bebida fermentada, transformando-o em ácido acético. Essas atividades levam à formação de uma bebida fermentada que apresenta simultaneamente acidez e frescor (De Roos *et al.*, 2018).

Em alguns estudos, os gêneros predominantes foram *Acetobacter* (Kumar *et al.*, 2021; Tavares *et al.*, 2023) e *Gluconobacter* (Rios *et al.*, 2023;), que desempenham um papel crucial na oxidação do açúcar e etanol, que resulta na produção de ácido acético. As BAA são bactérias Gram-negativas e aeróbias, demonstrando habilidade para suportar condições de baixo pH decorrente dos ácidos orgânicos produzidos durante a fermentação (Lynch *et al.*, 2019).

Ao longo da fermentação do kefir, os microrganismos principais responsáveis pela síntese do EPS são os *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus nagelii*, sendo a proporção desses microrganismos um fator determinante no crescimento dos grãos (Bechtner *et al.*, 2019; Laureys; De Vuyst, 2016). Eckel *et al.* (2020) evidenciaram que as BAL, como *Bifidobacterium aquikefiri* e *Bifidobacterium tibiigranuli*, apresentaram adaptações fisiológicas para metabolizar

a sacarose e demais tipos de açúcares e lidar, de forma eficaz, com a restrição de aminoácidos no kefir de água.

As bactérias lácticas desempenham uma função essencial na preservação do kefir, pois são responsáveis pela síntese de ácido málico, láctico e bacteriocinas (Kumar *et al.*, 2021) e pela geração de compostos voláteis (Romero-Luna, 2020). Em contrapartida, a produção de álcool, essencial para o sabor distinto do kefir, é resultado da atividade metabólica das leveduras (Bengoa *et al.*, 2018).

As leveduras, classificadas como microrganismos unicelulares e pertencentes ao reino dos fungos, têm no gênero *Saccharomyces* seu principal representante, destacando-se pela elevada resistência a condições osmóticas adversas e baixo pH. Com um poder fermentativo notável e considerável potencial probiótico, as leveduras desempenham diversas aplicações (Guzel-Seydim; Gökirmakli; Greene, 2021). Nos grãos de kefir, a espécie de levedura mais prevalente é *Saccharomyces cerevisiae*, desempenhando um papel crucial na fermentação ao transformar os carboidratos presentes em etanol (Fiorda *et al.*, 2017).

A origem geográfica e o tipo de substrato são alguns dos elementos que contribuem para as variações na população microbiana encontrada nos grãos de kefir. Além desses, há outros fatores que exercem influência, como o tempo de fermentação, as condições de armazenamento, a temperatura e a proporção de grãos. Essas condições de fermentação desempenham um papel na modelagem da composição microbiológica (Cai; Zhang; Chen *et al.*, 2020; Garofalo *et al.*, 2020).

1.5 COMPOSTOS PRODUZIDOS DURANTE A FERMENTAÇÃO DO KEFIR DE ÁGUA

Dentre os produtos metabólicos gerados durante o processo de fermentação do kefir de água, os ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético) se sobressaem. Esses ácidos reduzem o pH da bebida e impedem o desenvolvimento de uma diversidade de microrganismos como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas patogênicas. Os ácidos láctico e acético provocam impactos adversos diretamente na membrana celular desses microrganismos e causam morte celular (González-Orozco *et al.*, 2023). Juntamente com os ácidos orgânicos, outros compostos originados durante a fermentação do kefir como as bacteriocinas e o peróxido de hidrogênio, também desempenham atividade antimicrobiana (Afifi *et al.*, 2020; Ibrahim *et al.*, 2021).

As bacteriocinas são peptídeos que as BAL sintetizam e liberam durante o processo de fermentação. Esses peptídeos exibem atividade antimicrobiana, permitindo, assim, a regulação da população bacteriana no ambiente e prevenindo a superpopulação de bactérias potencialmente patogênicas (Darbandi *et al.*, 2021; Kranjec *et al.*, 2020). A habilidade das bacteriocinas em regular os biofilmes formados por bactérias patogênicas é um indicativo promissor da capacidade antibacteriana do kefir de água (Mgomi *et al.*, 2023; Thi *et al.*, 2020).

As BAL especialmente os *Lactococcus* presentes no kefir, produzem bacteriocinas como a lactococina. Essas bacteriocinas são reconhecidas por inibir a formação do peptidoglicano, componente crucial da parede celular bacteriana. Outra bacteriocina destacada é a nisina, que age criando poros na membrana plasmática das bactérias (Ghapanvari *et al.*, 2022; Ibrahim *et al.*, 2021; Petrova *et al.*, 2021).

Assim, o kefir de água exibe efeitos inibitórios no crescimento de patógenos como *E. coli*, *Salmonella enterica* e *Staphylococcus aureus*, assim como fungos, incluindo *Rhizopus spp* e *Aspergillus flavus*. Além disso, a bebida demonstrou eficácia contra microrganismos como *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (Kim *et al.*, 2016; Pendón *et al.*, 2022).

Estudos em andamento buscam avançar na produção industrial de bacteriocinas, visando substituir na indústria alimentícia conservantes sintéticos por opções naturais. Essa alternativa é considerada mais segura tanto para o meio ambiente quanto para os seres humanos (González-Orozco *et al.*, 2023).

1.6 BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE ASSOCIADOS AO CONSUMO DO KEFIR DE ÁGUA

A bebida probiótica kefir de água tem demonstrado benefícios significativos para a saúde, incluindo a melhoria no controle glicêmico, redução de colesterol e equilíbrio da microbiota intestinal (Egea *et al.*, 2020). O equilíbrio microbiano intestinal reduz distúrbios intestinais como constipação e diarreia, melhora a permeabilidade intestinal e reforça o sistema imunológico da mucosa intestinal devido à sua rica composição microbiana (Alves *et al.*, 2021; Calatayud *et al.*, 2021). Tan *et al.* (2022) demonstraram que o kefir de água possui forte ação antimicrobiana contra patógenos intestinais, prevenindo a adesão de patógenos entéricos às células Caco-2.

A fermentação do kefir de água produz metabólitos secundários com propriedades terapêuticas, incluindo ácidos orgânicos, compostos fenólicos e flavonoides, que oferecem atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (Ozcelik; Akan; Kinik, 2021). Zamberi *et al.* (2016) relataram que o kefir de água inibiu a proliferação e migração de células cancerígenas, além de promover a apoptose e modular o sistema imunológico.

Lucena *et al.* (2022) realçaram a atividade antibacteriana do kefir contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, enquanto outros estudos mostraram que *Lactobacillus paracasei* impede o crescimento de patógenos, incluindo *Listeria innocua* e *Salmonella* spp. Os microrganismos do kefir de água também mostraram propriedades antifúngicas, indicando seu potencial como alternativas aos fungicidas na indústria alimentar (Romero-Luna *et al.*, 2020).

1.7 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E ALTERNATIVAS AOS MEDICAMENTOS ANTIMICROBIANOS CONVENCIONAIS

A resistência antimicrobiana (RAM) é um fenômeno onde microrganismos tornam-se resistentes aos antimicrobianos que antes eram eficazes. Este fenômeno resulta de mudanças naturais que conferem resistência aos microrganismos, com o uso excessivo de antimicrobianos sendo um fator chave na disseminação da RAM (Mancuso *et al.*, 2021).

A resistência aos antimicrobianos, que constitui uma crise de saúde pública global, vem sendo agravada pelo uso irracional desses medicamentos. Os enterococos, com destaque para *E. faecalis*, desenvolveram resistência a diversas classes de antimicrobianos (Seyedeh *et al.*, 2019). Da mesma forma, *Acinetobacter* spp. tem demonstrado uma resistência significativa a várias terapias antimicrobianas, adaptando-se com facilidade a diferentes ambientes (Queiroz; Maciel; Santos, 2022).

Recentemente, os probióticos (incluindo o kefir de água), têm recebido atenção como alternativas naturais aos antimicrobianos. Pesquisas mostram que microrganismos isolados do kefir de água possuem atividade inibitória contra patógenos como *E. coli* e *L. monocytogenes* (Gamba *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2020; Al-Mohammadi *et al.*, 2021). Essa eficácia aponta o kefir de água como um promissor agente antimicrobiano natural no combate à resistência antimicrobiana (RAM) (Prado *et al.*, 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi identificar geneticamente os microrganismos isolados do kefir de água, avaliar a sua atividade inibitória (antagonista) contra bactérias patogênicas e caracterizar os aspectos físico-químicos da bebida.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os aspectos físico-químicos do kefir de água cultivados em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo) por meios dos parâmetros: taxa de crescimento dos grãos, acidez total, pH, sólidos solúveis totais e teor de açúcares cultivados em açúcar mascavo;
- Determinar a concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH e ABTS) do kefir de água fermentado em três tipos de açúcares;
- Isolar microrganismos presentes nos grãos e nas bebidas de kefir de água em açúcar mascavo e avaliar sua atividade antagonista contra bactérias patogênicas: *Acinetobacter baumannii*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*; *Listeria. Monocytogenes*.
- Realizar a identificação genética de 40 microrganismos isolados do kefir que apresentaram os maiores halos de inibição do crescimento contra todas as cepas patogênicas testadas..

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS GRÃOS DE KEFIR E DAS BEBIDAS FERMENTADAS

3.1.1 Esterilização de Vidrarias e Utensílios

Para garantir a segurança e a qualidade dos experimentos, todas as vidrarias e utensílios utilizados no preparo das bebidas e na manipulação dos grãos de kefir de água foram esterilizados em autoclave a vapor. O processo de esterilização foi realizado por 15 minutos a uma temperatura de 121 °C. Esse procedimento assegurou que todos os materiais em contato direto com a bebida e os grãos de kefir estavam livres de contaminação.

3.1.2 Obtenção dos grãos de kefir

Os grãos de kefir utilizados nesse estudo foram obtidos através de doações originárias de cultivos artesanais no Distrito Federal. Após serem obtidos, os grãos passaram por sucessivos cultivos e foram adaptados às condições controladas de laboratório. Após adaptações, os grãos excedentes das fermentações foram armazenados a -20 °C e reativados em momentos apropriados para análise.

3.1.3 Obtenção das soluções de açúcares

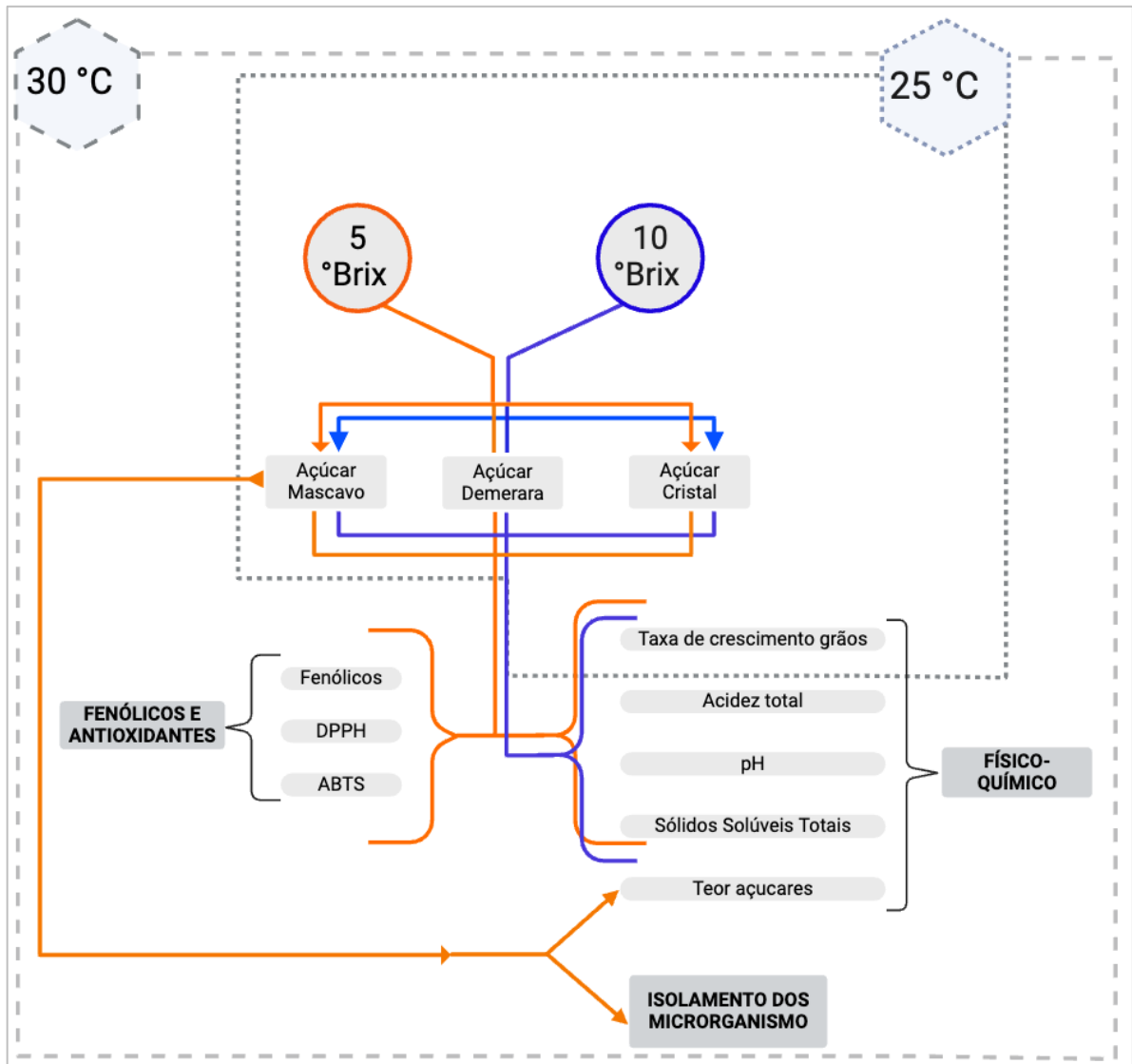
Os açúcares mascavo, demerara e cristal de origem orgânica tiveram uma marca definida e foram comprados em supermercados do Distrito Federal. Para o preparo dos xaropes, 500 g de açúcar foram adicionados em 500 mL de água filtrada. Após aquecido e solubilizado, os xaropes foram distribuídos em potes estéreis e levados para autoclave por 15 min a 121 °C. Os potes foram armazenados sob refrigeração (4 a 8 °C).

3.1.4 Produção da bebida kefir de água

Para a produção da bebida kefir de água, os grãos de kefir na concentração de 10 % (p/v) foram inoculados em xarope de açúcar (mascavo, demerara e cristal) ajustado para 5 e 10 °Brix e fermentados em temperatura controlada de 25 e 30 °C

por 24 e 48 h. Após a fermentação, os grãos foram suspensos em peneiras previamente esterilizadas e deixados por 1 h para drenagem completa do líquido. Após a conclusão desse processo, os grãos e as bebidas foram analisados quanto as características físico-químicas e atividade antagonista, conforme detalhado na Figura 4.

Figura 4 - Detalhamento dos parâmetros utilizados na preparação das amostras



Fonte: Elaboração própria (2023)

3.1.5 Avaliação da taxa de crescimento dos grãos de kefir

Após 1 h de drenagem do líquido, os grãos foram transferidos para cadinhos estéreis e pesados em balança analítica. O procedimento foi realizado nas amostras fermentadas a 25 e 30 °C em 24 e 48 h. A taxa de crescimento dos grãos de kefir foi

determinada pelo aumento da biomassa úmida de grãos no final das fermentações com xarope a 5 e 10 °Brix e comparada ao peso inicial dos grãos que foi de 10 % (p/v), conforme a equação abaixo. Os valores foram expressos como média e desvio padrão em taxa de porcentagem (%), conforme cálculo:

$$TX (\%) = \frac{G1 - G0}{G1 \times G0} \quad (a)$$

TX (%) = Taxa de crescimento

G0 = Peso inicial dos grãos de kefir em 0 h

G1 = Peso final dos grãos de kefir em 24 e 48 h de fermentação

3.1.6 Acidez total

A acidez total da bebida de kefir de água foi avaliada utilizando a metodologia de acidez titulável (IAL, 2008). Para a análise alíquotas de 10 mL de cada amostra foram transferidas para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 10 mL de água destilada e três gotas de solução de fenolftaleína em cada amostra. A titulação foi realizada utilizando uma bureta que contendo NaOH 0,1 M, e o fim do processo foi identificado pela alteração da cor da solução para um tom rosa claro. Para calcular a acidez total, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Acidez total (g.L}^{-1}\text{)} = \frac{V1 \times N \times MM}{V2 \times 1000} \quad (b)$$

V1 = Volume utilizado de NaOH em mL

N = Normalidade (0,1)

MM = Massa Molecular do ácido acético (60)

V2 = Volume da amostra (mL)

3.1.7 pH

A aferição do pH da bebida de kefir de água ocorreu com o auxílio de um pHmetro digital, modelo Gehaka PG 1800 (AOAC, 2006).

3.1.8 Sólidos solúveis totais (SST)

A concentração de sólidos solúveis totais foi avaliada empregando um refratômetro (AOAC, 2006). Inicialmente, as amostras de kefir de água foram preparadas com um xarope de açúcar a uma concentração inicial de 5 e 10 °Brix. As concentrações de SST foram medidas após períodos de fermentação de 24 e 48 h a 30 °C. A análise foi realizada em triplicata, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão em índice refratométrico (°Brix).

3.1.9 Concentração de açúcares

O método ADNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) foi utilizado para quantificar os açúcares (Miller, 1959) na bebida de kefir de água fermentado com açúcar mascavo. Para a hidrólise da sacarose em açúcares redutores, 400 µL de cada amostra e 200 µL de Ácido Clorídrico Puro (P.A.) foram pipetados em tubos de ensaio. A mistura foi incubada a 60 °C, sob agitação. Após 10 minutos, os tubos foram removidos do banho e neutralizados com 400 µL de NaOH 6N. Em seguida, as amostras com e sem hidrólise foram adequadamente diluídas, acrescidas do reagente ADNS e os tubos de ensaio contendo as amostras foram incubados em água fervente por 5 minutos e posteriormente resfriados à temperatura ambiente. Os valores de absorvância foram registrados a 540 nm usando um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi modelo U-3900H). Uma curva de calibração foi preparada usando glicose em concentrações variando de 0,2 a 0,8 g/L (Apêndice A e E). Os resultados foram expressos em gramas por 100 mL de amostra (%), e os valores foram calculados seguindo as equações:

$$AR (\%) = \frac{aS}{10} \quad (c)$$

$$SAC (\%) = \frac{aS - aC}{10} \quad (d)$$

$$ACT (\%) = \frac{AR + SAC}{10} \quad (e)$$

AR (%) = Açúcar Redutor

SAC (%) = Sacarose

ACT (%) = Açúcar Total

aC = resultado da equação da reta com hidrólise

aS = resultado da equação da reta sem hidrólise

3.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS BEBIDAS

3.2.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados conforme protocolo de Folin-Denis (Folin & Denis, 1912). A análise avaliou a concentração de compostos fenólicos totais na amostra. A leitura da absorbância das amostras foi realizada com auxílio de um refratômetro UV-Vis a 760 nm (Hitachi modelo U-3900H). A curva de calibração foi preparada utilizando ácido gálico na concentração de 0,02 a 0,10 mg.L⁻¹ (Apêndice B e E). A análise das amostras foi realizada em triplicata e os valores expressos como média e desvio padrão em gramas (g) de ácido gálico equivalente (GAE) por litro (L) de amostra (g GAE.L⁻¹).

3.2.2 Atividade antioxidante - DPPH

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelo método DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila) (Silveira, 2018), através do sequestro do radical DPPH, caracterizado pela mudança da cor roxa-escura para cor roxa-clara. Uma solução estoque de DPPH foi preparada na concentração de 0,8 mM, para isso, 24 mg de DPPH foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, seguido da adição de álcool etílico absoluto até completo o volume total. A solução foi homogeneizada e transferida para um vidro âmbar e armazenado sob refrigeração. No dia da análise a solução de DPPH foi dissolvida em etanol até a leitura da absorbância entre 0,900 e 1,100 a 517 nm no espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi modelo U-3900H). Em tubos de ensaio as amostras foram diluídas e após o processo de diluição, 100 µL de amostras foram acrescentadas à 3900 µL da solução de DPPH e armazenadas na ausência de luminosidade por 30 min. A leitura da absorbância foi realizada a 517 nm no espectrofotômetro. Uma curva de calibração (Apêndice C e E) foi preparada com Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) na concentração de 0,5 a 1,0 mM, obtidos através da solução estoque de Trolox (2 mM). As análises foram

realizadas em triplicata e os valores expressos pela média \pm desvio padrão em μmol de Trolox equivalente (TEAC) por 100 mL de amostra ($\mu\text{mol TEAC}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$).

3.2.3 Atividade antioxidante – ABTS

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) de acordo com Rufino (2007). O radical ABTS é conhecido por capturar prótons presentes na solução, indicando o potencial antioxidante das amostras. A captura resulta na estabilização do radical, visivelmente marcada pela transição da cor de verde-escura para verde-clara. A solução estoque de ABTS foi preparada adicionando 0,192 g do reagente a um balão volumétrico de 50 mL e o volume foi completado com água destilada. Para a preparação do radical ABTS, 0,88 mL de solução de persulfato de potássio foram adicionados a 50 mL da solução estoque de ABTS, e a mistura foi armazenada por 16 h em um frasco de vidro âmbar sob refrigeração. No momento da análise, a solução de ABTS foi diluída em etanol até a absorvância de 0,700 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (Hitachi modelo U-3900H). As amostras foram diluídas e em seguida, 30 μL das amostras diluídas foram adicionadas a 3000 μL do radical ABTS em tubos de ensaio e homogeneizados. As amostras foram mantidas na ausência de luz por 6 minutos. A leitura foi realizada a 734 nm. Uma curva de calibração (Apêndice D e E) foi obtida de uma solução estoque de TROLOX (2000 μM). As análises foram realizadas em triplicata e os valores expressos como média \pm desvio padrão da atividade antioxidante em μmol de Trolox equivalente (TEAC) por 100 mL de amostra ($\mu\text{mol TEAC}\cdot 100\text{ mL}^{-1}$).

3.3 ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DOS GRÃOS E DAS BEBIDAS DE KEFIR DE ÁGUA

3.3.1 Meios de cultura usados no isolamento dos microrganismos

As bactérias ácido-láticas foram isoladas em três diferentes meios de cultura: Agar All Purpose Tween (APT) (Himedia[®]) foi usado para o isolamento de culturas heterofermentadoras, o Agar M17 (Biolog[®]) foi utilizado para a seleção de *Lactococcus* spp. e o Agar Man Rogosa Sharpe (MRS) (Kasvi[®]) foi utilizado para o

isolar *Lactobacillus* spp. Para o isolar as bactérias do ácido acético foi utilizado o meio de cultivo Agar Hestrin-Schramm (HS) (Sigma®). As leveduras foram isoladas utilizando o meio Agar Yeast Malt (YM) (Acumedia®).

3.3.2 Isolamento dos microrganismos

O kefir foi fermentado com xarope de açúcar mascavo. Para o isolamento dos microrganismos segundo Talib *et al.* (2019), 10 g+ de grãos de kefir foram transferidos para um recipiente estéril, adicionando-se a bebida fermentada até alcançar 25 g (q.s.p.), pesados em balança analítica. Para as diluições seriadas, a amostra foi diluída em 225 mL de água com peptona a 0,1 % (p/v) (Acumedia®), obtendo-se a diluição 10^{-1} . Após homogeneização em vórtex por 2 minutos, 1 mL da diluição 10^{-1} foi transferida para um tubo Falcon contendo 9 mL de água peptona 0,1 % (p/v), resultando na diluição 10^{-2} . As amostras foram diluídas sucessivamente até 10^{-5} . Alíquotas de 100 µL das amostras foram pipetadas em placas de Petri contendo os meios de cultivo (APT, MRS, M17, HS e YM), e com o auxílio de alças de Drigalski estéreis, as alíquotas foram espalhadas sobre a superfície do ágar. Após a secagem, as placas foram incubadas a 28 °C, em condições de aerobiose e anaerobiose, por um período de 24 a 72 h.

3.3.3 Purificação e manutenção dos microrganismos

O isolamento dos microrganismos foi realizado com o auxílio do estereoscópio Leica modelo M-125C, que facilita a observação das estruturas das colônias e permite distinguir diferenças morfológicas. As placas que exibiram crescimento de colônias simbióticas foram submetidas a sucessivas diluições até que fosse possível isolar colônias puras. Após a purificação, os microrganismos foram novamente semeados, em tubos inclinados previamente preparados contendo os mesmos meios de cultura de origem, e após o crescimento, glicerina líquida esterilizada foi adicionada aos tubos, proporcionando condições adequadas para a preservação dos microrganismos.

3.4 TESTE DE ANTAGONISMO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA

3.4.1 Preparação dos microrganismos isolados do kefir para o teste de antagonismo

Para ativação dos microrganismos isolados e com auxílio de uma alça de calibração de 10 µL, os microrganismos isolados foram repicados em tubos contendo 10 mL de caldo APT, caldo MRS, caldo M17, caldo HS e caldo YM, correspondentes ao meio de cultivo do isolamento. As amostras foram incubadas na estufa por 24 h ou até que se observasse turbidez nos tubos. Após a ativação, e com o auxílio de um swab estéril, os isolados foram semeados em placas de ágar (APT, MRS, M17, HS e YM), específicas para cada isolado. As placas foram incubadas a 28 °C por 24 a 72 h. Após o crescimento, os microrganismos isolados estavam preparados para o teste de antagonismo.

3.4.2 Preparação das bactérias patogênicas

As bactérias utilizadas no estudo incluíram *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. Os inóculos foram preparados por meio de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani, ajustando a turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland, o que corresponde a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. A densidade óptica das suspensões foi ajustada para um intervalo entre 0,08 e 0,10 a 625 nm no espectrofotômetro (Hitachi modelo U-3900H).

3.4.3 Testes da atividade antagonista dos microrganismos isolados do kefir de água

Seguindo a metodologia proposta por Valgas (2007) e Magaldi *et al.* (2004), os inóculos das bactérias patogênicas foram semeados em Ágar YM usando swabs estéreis. Posteriormente, discos de ágar de 5 mm contendo os microrganismos isolados do kefir foram colocados sobre as placas de Ágar YM já semeadas com as bactérias patogênicas (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*), promovendo o contato entre os microrganismos isolados do kefir e as bactérias

patogênicas. Os ensaios foram realizados em triplicata. Após 24 h de incubação a 37°C, foram realizadas as medições dos halos de inibição do crescimento das bactérias patogênicas. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média \pm DP) em milímetros de diâmetro.

3.5 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA

Para ativar os microrganismos isolados do kefir, estes foram transferidos para tubos contendo 10 mL de caldo (APT, MRS, M17, HS e YM), com incubação em uma estufa bacteriológica por 24 h. Após essa etapa, os isolados foram transferidos para placas de ágar (APT, MRS, M17, HS e YM), utilizando um swab estéril. Essas placas foram então incubadas a uma temperatura de 28°C, pelo período de 24 a 72 h. As colônias foram coletadas da superfície da placa com o auxílio de um swab estéril. Após a coleta, o swab foi inserido para um microtubo contendo uma solução de estabilizante conhecida como ZSample (BiomeHub). Após homogeneizar a amostra, o swab foi removido do tubo de coleta, e os microtubos contendo os microrganismos isolados do kefir foram enviados para sequenciamento gênico que foi realizado pela empresa BiomeHub. O DNA total das amostras foi extraído usando o kit QIAamp DNA Blood Mini Kit, conforme as instruções do fabricante. Após a extração, as amostras passaram por um processo de preparação de bibliotecas para o sequenciamento de DNA em larga escala. Durante esse processo, foram realizadas amplificações específicas das regiões V3/V4 do gene ribossomal bacteriano 16S rRNA e da região ITS1 de fungos, usando a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Cada amostra foi marcada com um índice ou código de barras único, facilitando sua identificação futura através de análises bioinformáticas. Em seguida, os DNA amplificados (amplicons) foram combinados em grupos para formar as bibliotecas de sequenciamento. Essas bibliotecas foram sequenciadas utilizando o formato single-end e um kit de 300 ciclos no equipamento NextSeq (Illumina®). As sequências de DNA resultantes (reads) foram posteriormente analisadas com um pipeline de bioinformática de propriedade da BiomeHub (Cruz; Christoff; Oliveira, 2021).

3.6 ESTATÍSTICA

As análises experimentais foram realizadas em triplicata, e os resultados obtidos foram expressos como valores de média e desvio padrão. Para a análise estatística, utilizou-se o teste ANOVA não pareado para determinar a significância entre as médias. Quando identificadas diferenças significativas ($p < 0,05$), o teste de Tukey foi aplicado para a comparação detalhada das médias. Todos os dados foram analisados utilizando o software JAMOV[®], versão 2.4.12 e STATPLUS, versão 8, ambos para Mac.

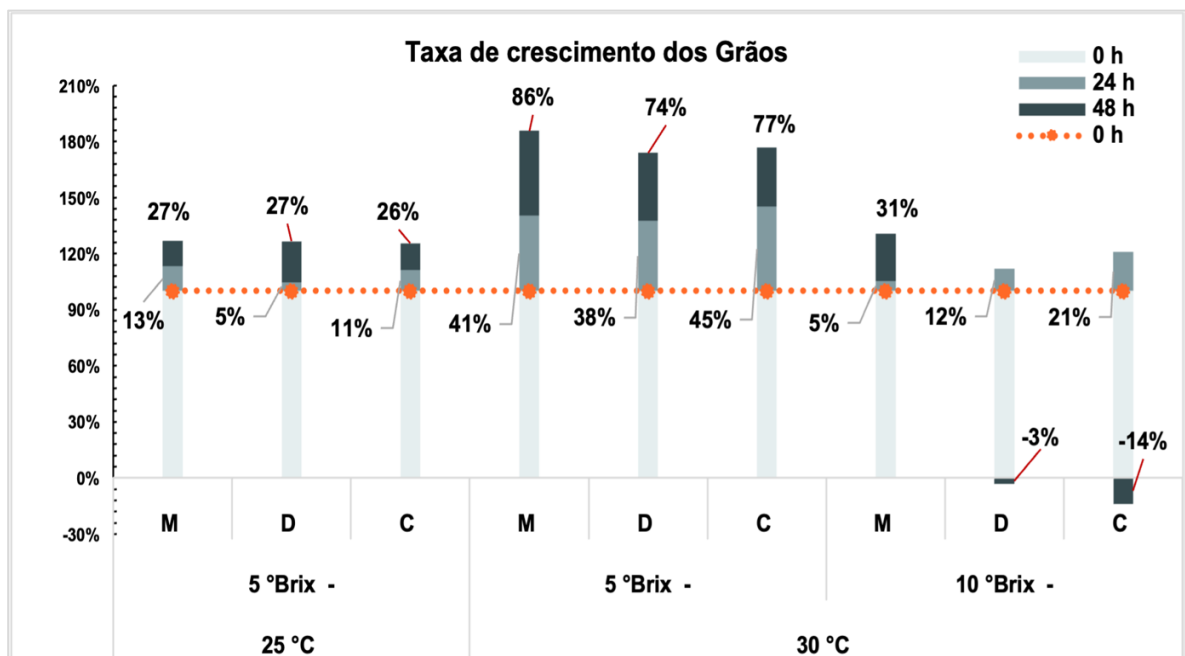
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DO KEFIR DE ÁGUA

4.1.1 Taxa de crescimento dos grãos de kefir de água

O Gráfico 1 apresenta a influência da temperatura (25 e 30°C), da concentração de açúcar utilizada (5 e 10°Brix) e do tipo de açúcar (mascavo, demerara e cristal) na taxa de crescimento dos grãos de kefir durante a fermentação por 24 e 48 h.

Gráfico 1 - Taxa de crescimento dos grãos das amostras de kefir de água



Fonte: Elaboração própria com base em dados experimentais (2023). Resultados apresentados como média de análises em triplicata \pm desvio padrão (Apêndices F e G). M = Kefir de Água com Açúcar Mascavo; D = Kefir de Água com Açúcar Demerara; C = Kefir de Água com Açúcar Cristal.

Em relação a temperatura, os grãos fermentados a 30 °C com concentração de açúcar a 5 °Brix tiveram maior taxa de crescimento (aumento em 41 % mascavo (M), 38 % demerara (D) e 45 % cristal (C) em 24 h, e 86 % (M), 74 % (D) e 77 % (C) em 48 h) em comparação com os grãos fermentados a 25°C, nas mesmas condições, que apresentaram menores taxas de crescimento de 13 % (M), 5 % (D) e 11 % (C) em 24 h, e de 27 % (M), 27 % (D) e 26 % (C) em 48 h.

No que se refere a concentração de açúcar utilizada, os grãos fermentados a 30 °C com concentração de açúcar a 5 °Brix tiveram maior taxa de crescimento

(aumento em 86 % (M), 74 % (D) e 78 % (C) em 48 h) em comparação com os grãos fermentados nas mesmas condições com concentração de açúcar a 10 °Brix (redução da taxa de crescimento em -3 % (D) e -14 % (C) e aumento em 31 % (M) em 48 h). Quanto ao tipo de açúcar utilizado, não foram observadas diferenças significativas na taxa de crescimento dos grãos de kefir com o uso dos açúcares mascavo, demerara ou cristal.

Assim, as condições de temperatura de 30 °C e xarope de açúcar a 5 °Brix influenciaram positivamente a taxa de crescimento dos grãos de kefir de água. A variação da temperatura de 25 para 30°C, associada a uma concentração de açúcar de 5°Brix, resultou em um aumento considerável dos grãos de kefir, sugerindo que a temperatura elevada favorece a atividade metabólica dos microrganismos. O aumento do tempo de fermentação de 24 para 48 h, nas mesmas condições de 30 °C e açúcar a 5°Brix, também resultou em um aumento significativo da taxa de crescimento dos grãos de kefir. Provavelmente a concentração de açúcar a 10 °Brix forneceu um ambiente muito osmótico para os microrganismos, prejudicando sua atividade metabólica, o que resultou no declínio da taxa de crescimento dos grãos.

A taxa de crescimento dos grãos de kefir de água é influenciada por vários fatores, incluindo o tipo de substrato de fermentação, a concentração do inóculo, a temperatura, a presença de oxigênio, entre outros (Laureys e De Vuyst, 2016). Laureys *et al.* (2021) avaliaram a influência do tipo de substrato de fermentação no crescimento dos grãos, e relataram que a substituição da sacarose por glicose ou frutose reduziu a taxa de crescimento dos grãos de kefir. Laureys *et al.* (2022) enfatizaram a temperatura como um fator que influencia diretamente a atividade metabólica dos microrganismos e o desenvolvimento dos grãos de kefir, uma vez que certas espécies microbianas são mais ativas e favorecidas em determinadas temperaturas de fermentação.

Laureys *et al.* (2019) observaram que o crescimento dos grãos de kefir de água podem ser maximizados com concentrações moderadas de sacarose e concentrações baixas de grãos. Esses dois fatores influenciam diretamente a atividade da enzima dextrana sacarase que faz a hidrólise da sacarose em direção a biossíntese de dextrano, o principal constituinte da estrutura dos grãos de kefir. A taxa de crescimento dos grãos de kefir de água diminuiu com o aumento das concentrações de sacarose, provavelmente causada pela inibição da dextrana sacarase pelo substrato. O maior crescimento de grãos de kefir de água foi obtido quando a concentração do inóculo

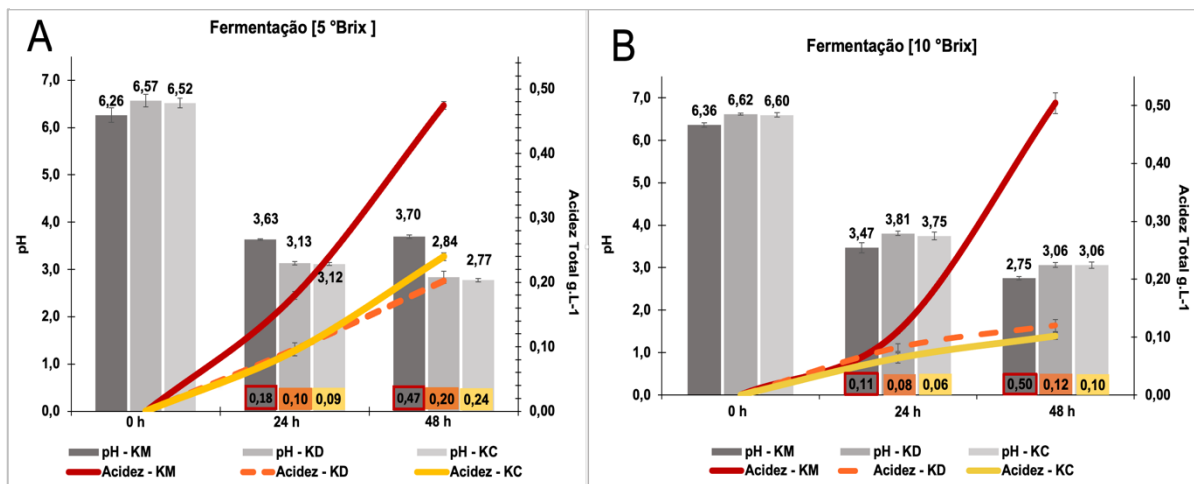
de grãos foi mais baixa, pois isso minimizou o estresse ácido e a depleção de substrato durante a fermentação. O baixo crescimento de grãos de kefir de água diminuiu o tamanho dos grãos que se tornam quebradiços, resultando em um processo de produção instável (Laureys e De Vuyst, 2016; Laureys et al., 2019).

Os resultados sugerem que as condições de fermentações em temperaturas mais elevadas e substratos menos concentrado favoreceram a atividade metabólica dos microrganismos. Portanto, considerando a influência positiva da temperatura de 30 °C na fermentação do kefir de água, as demais análises foram realizadas nessa condição térmica.

4.1.2 Teor de acidez total e valor de pH do kefir de água

O gráfico 2 apresenta os resultados da acidez total e do pH do kefir de água fermentado com diferentes tipos de açúcares (mascavo, demerara e cristal) e concentrações de açúcar de 5 e 10 °Brix em temperatura de 30 °C por 24 e 48 h.

Gráfico 2 - Valores de acidez total e pH das amostras de kefir de água



Fonte: Autoria própria com base em dados experimentais. A= fermentação a 5°Brix; B = fermentação a 10°Brix. Resultados apresentados como média de análises em triplicata \pm desvio padrão (Apêndices H e I). KM = Kefir de Água com Açúcar Mascavo; KD = Kefir de Água com Açúcar Demerara; KC = Kefir de Água com Açúcar Cristal.

Nas amostras com 5°Brix, o kefir fermentado com açúcar mascavo mostrou um aumento significativo na acidez, de 0,18 g/L em 24 h para 0,47 g/L em 48 h. As amostras D e C também mostraram aumento na acidez, porém em uma escala mais moderada (de 0,09-0,10 g/L em 24 h para 0,20-0,24 g/L em 48 h). Quando a concentração de açúcar foi elevada para 10°Brix, observou-se que somente o kefir

fermentado com açúcar mascavo mostrou um aumento significativo na acidez, de 0,11 g/L em 24 h para 0,50 g/L em 48 h, enquanto as amostras D e C tiveram menor variação na acidez (de 0,06-0,08 g/L em 24 h para 0,10-0,12 g/L em 48 h).

A acidez do kefir de água é influenciada tanto pelo tipo de açúcar utilizado quanto pelo tempo de fermentação, como reportado por Gamba *et al.* (2021), que notaram que o kefir preparado com açúcar mascavo obteve níveis elevados de acidez, principalmente após 48 h, sugerindo uma atividade fermentativa mais intensa, aumentando a síntese de ácidos orgânicos no meio.

A introdução de frutas secas ou sucos de frutas no kefir, conforme descrito por Randazzo *et al.* (2016), pode elevar a acidez devido à adição de nutrientes, potencializando a atividade dos microrganismos. Laureys e Vuyst (2016) adicionaram frutas secas e açúcar cristal na fermentação do kefir de água e reportaram valores de acidez de 0,25 g/L em 24 h e de 0,43 g/L em 48 h. Outros estudos que adicionaram frutas na fermentação do kefir de água relataram variações na acidez entre 0,50 e 1,20 g/L pelo período de 24 a 72 h (Köhler *et al.*, 2021; Nikolaou *et al.*, 2019).

Em relação ao pH, nas condições de 5°Brix, as amostras M, C e D tiveram um pH inicial de 6,26-6,57 e houve uma redução significativa para 3,70-3,63 (M), 3,13-2,84 (D) e 3,12-2,77 (C) em 24 a 48 h. Quando a concentração de açúcar foi elevada para 10°Brix, as amostras M, C e D tiveram um pH inicial de 6,36-6,62 e se observou uma queda significativa do pH para 3,47-2,75 (M), 3,81-3,06 (D) e 3,75-3,06 (C) em 24 a 48 h.

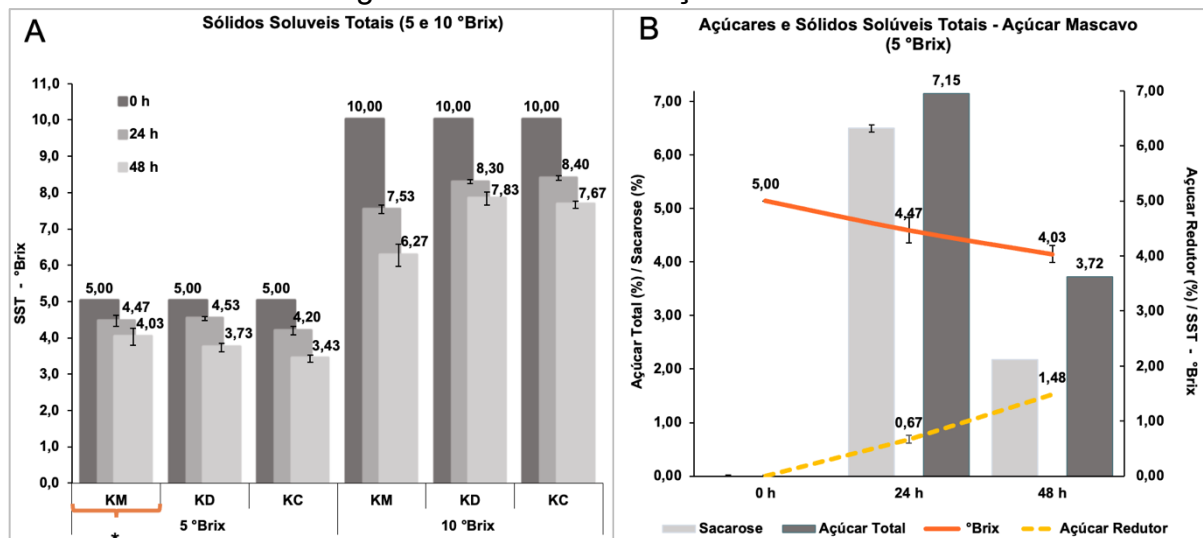
Resultados similares foram reportados na literatura. Köhler *et al.* (2021) observaram uma diminuição do pH durante a fermentação do kefir de água de 4,85 para 3,45 em 72 h. Laureys *et al.* (2017) encontraram valores de 3,34 a 3,50 nas amostras de kefir de água fermentadas com açúcar mascavo. Limbad *et al.* (2023) utilizaram água de coco e açúcar na fermentação de longa duração (96 h) do kefir de água e observaram valor de pH de 2,80. Além disso, Darvishzadeh, Orsat e Faucher (2021) relataram que o pH do kefir de água geralmente se estabiliza em torno de 3,14.

Da Fontoura Prates *et al.* (2022) enfatizaram a importância dos valores de pH ácido no kefir de água, destacando seu impacto na diversidade microbiana, no crescimento dos grãos e na produção de metabólitos. A microbiota do kefir é constituída por bactérias do ácido láctico e bactérias do ácido acético que sintetizam os ácidos orgânicos que contribuem para o sabor ácido e determinam as características únicas da bebida (Lynch *et al.*, 2019; Luang-In *et al.*, 2018).

4.1.3 Teor de Sólidos Solúveis Totais (SST) e açúcares do kefir de água

O Gráfico 3A apresenta os resultados do teor de Sólidos solúveis Totais (SST) do kefir de água fermentado com diferentes açúcares (mascavo, demerara e cristal) nas concentrações de 5 e 10 °Brix em temperatura de 30 °C por 24 e 48 h. Nas condições de 5°Brix, as amostras M, C e D apresentaram uma redução do teor de SST de 4,20-4,53°Brix em 24 h para 3,43-4,03°Brix em 48 h. Quando a concentração de açúcar foi elevada para 10°Brix, a amostra M mostrou a maior atividade fermentativa entre os açúcares testados, apresentando uma redução do teor de SST de 7,53°Brix em 24 h para 6,27°Brix em 48 h. As amostras D e C apresentaram uma menor redução do teor de SST de 8,40-8,30 °Brix em 24 h para 7,83-7,67°Brix em 48 h.

Gráfico 3 - (3A) Concentração Sólidos Solúveis Totais (SST) das amostras de kefir de água em 5 e 10 °Brix e (3B) Teor de açúcares redutores, sacarose e açúcar total da amostra de kefir de água fermentada com açúcar mascavo em 5 °Brix



Fonte: Autoria própria (2023). Resultados apresentados como média de análises em triplicata \pm desvio padrão (Apêndices J e L). KM = Kefir de Água com Açúcar Mascavo; KD = Kefir de Água com Açúcar Demerara; KC = Kefir de Água com Açúcar Cristal; * = Açúcar mascavo utilizado nas análises apresentadas no Gráfico 3B.

O Gráfico 3B apresenta o teor de açúcares redutores, sacarose e açúcares totais da amostra de kefir de água fermentado com açúcar mascavo em 5 °Brix. Observou-se a redução da concentração de sacarose de $6,50 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 24 h para $2,18 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 48 h. O açúcar total apresentou uma redução de $7,15 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 24 h para $3,72 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 48 h. Quanto aos açúcares redutores, houve um

aumento concentração de $0,67 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 24 h de fermentação para $1,48 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 48 h, indicando um aumento na conversão de sacarose em glicose e frutose.

Tavares *et al.* (2023) reportaram resultados similares e observaram que o kefir fermentado com açúcar mascavo apresentou maior redução do teor de SST de $10,03$ para $9,47^\circ\text{Brix}$ e de sacarose de $0,45 \text{ g/L}$ para $0,09 \text{ g/L}$ em 48 h em comparação com o kefir fermentado com açúcar demerara, cujos valores de SST reduziram de $10,47$ para $10,33^\circ\text{Brix}$ em 48 h, acompanhados por uma redução na sacarose de $0,54 \text{ g/L}$ para $0,41 \text{ g/L}$.

Alrosan *et al.* (2021) observaram que a sacarose e a glicose tiveram uma relação inversamente proporcional durante a fermentação do kefir de água. A sacarose teve valor inicial de $6,90 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ e houve uma redução para $1,19 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 24 h e $0,11 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 48 h. Enquanto a glicose teve valor inicial de zero e houve um aumento para $1,24 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 24 h e $2,52 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ em 48 h. Esse fato decorre da liberação de enzimas pela microbiota ativa do kefir que promovem a hidrólise da sacarose e o aumento dos níveis de glicose.

Neste estudo, observamos que a concentração de SST apresentou pequenas variações entre as amostras fermentadas em 24 e 48 h; entretanto, os valores encontrados não representam a concentração real de sacarose nas bebidas de kefir de água fermentadas. O índice refratométrico, simbolizado como $^\circ\text{Brix}$, é amplamente utilizado pela indústria de alimentos e bebidas para medir a concentração de sacarose, onde 1°Brix equivale a 1% (p/v) de sacarose em soluções (Jaywant, Singh e Ari, 2022). Entretanto, a conversão da sacarose em glicose e frutose, a formação de ácidos orgânicos e a solubilização de compostos insolúveis por enzimas liberadas durante a fermentação, podem elevar a concentração de SST na bebida. Isso resulta em valores de $^\circ\text{Brix}$ que não correspondem diretamente ao teor de sacarose após a fermentação (Asevedo, Fontoura e Santos, 2020; Pimentel, Neto e Silva, 2019).

O kefir de água fermentado com açúcar mascavo demonstrou uma potente atividade fermentativa, conforme evidenciado nas análises anteriores (Gráfico 1 e 2) e no teor de açúcares antes e após a fermentação (Gráfico 3). O açúcar mascavo demonstrou ser a melhor opção como substrato fermentativo, na concentração inicial de 5°Brix , equivalente a 5% (p/v). Esses achados corroboram com estudos anteriores (Çevik *et al.*, 2019; Köhler *et al.*, 2021; Tavares *et al.*, 2023) e podem melhorar as características nutricionais e sensoriais das bebidas de kefir de água fermentadas

4.2 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO KEFIR DE ÁGUA

A Tabela 1 apresenta a avaliação dos compostos fenólicos e atividade antioxidante do kefir de água fermentado em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo), na concentração de 5 °Brix em temperatura de 30 °C por 24 e 48 h. Observou-se que o kefir de açúcar mascavo apresentou os maiores valores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em relação as bebidas elaboradas com açúcares demerara e cristal. O xarope de açúcar mascavo apresentou valor de compostos fenólicos de 8,84 g.L⁻¹ e atividade antioxidante de 144,4 µmol.100 mL⁻¹ pelo método DPPH e 348,7 µmol.100 mL⁻¹ pelo método ABTS.

Tabela 1 - Compostos fenólicos e atividade antioxidante da bebida kefir de água fermentada em três tipos de açúcares (cristal, demerara e mascavo) em 5 °Brix a 30°C

Amostras	Fenólicos	ABTS	DPPH
	g GAE.L ⁻¹	µmol TEAC.100 mL ⁻¹	µmol TEAC.100 mL ⁻¹
M0	8,84±1,14 _a	348,7±30,0 _a	144,4±2,2 _a
M1	1,35±0,14 _b	324,3±42,6 _a	56,9±1,2 _b
M2	1,40±0,14 _b	261,2±34,8 _b	60,6±1,1 _b
D0	0,35±0,06 _c	46,6±5,7 _c	N/A
D1	0,15±0,01 _d	43,0±4,7 _d	N/A
D2	N/A	32,1±1,8 _e	N/A
C0	0,20±0,08 _d	62,1±3,1 _f	N/A
C1	0,05±0,01 _f	48,6±5,7 _c	N/A
C2	N/A	47,0±4,8 _c	N/A

Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos em média de análises em triplicata ± desvio padrão. M0 = kefir com açúcar mascavo 0 h; M1 = kefir com açúcar mascavo 24 h; M2 = kefir com açúcar mascavo 48 h; D0 = kefir com açúcar demerara 0 h; D1 = kefir com açúcar demerara 24 h; D2 = kefir com açúcar demerara 48 h; C0 = kefir com açúcar cristal 0 h; C1 = kefir com açúcar cristal 24 h; C2 = kefir com açúcar cristal 48 h; N/A = não houve compostos fenólicos e/ou atividade antioxidante. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a p<0,05 de acordo com o teste de Tukey.

Seguí *et al.* (2015) analisaram a influência de diferentes tipos de açúcares (cristal, mascavo, rapadura e melaço) na fermentação do kefir de água. Os resultados mostraram que o açúcar cristal não apresentou compostos fenólicos em sua composição e a atividade antioxidante pelos métodos ABTS não obteve resultado. Por

outro lado, o açúcar mascavo teve valores moderados de compostos fenólicos ($0,37-0,81 \text{ mg.g}^{-1}$) e capacidade antioxidante pelo método ABTS ($620 \text{ a } 720 \text{ } \mu\text{mol.100 mL}^{-1}$). A rapadura por sua vez obteve um aumento significativo, tanto em compostos fenólicos ($1,02 \text{ a } 2,50 \text{ mg.g}^{-1}$) quanto na capacidade antioxidante pelo método ABTS ($720 \text{ a } 21800 \text{ } \mu\text{mol.100 mL}^{-1}$). Porém, o maior valor foi observado na amostra fermentada com melado, que apresentou um teor de compostos fenólicos de $3,26 \text{ mg.g}^{-1}$ e atividade antioxidante pelo método ABTS de $20600 \text{ e } 28500 \text{ } \mu\text{mol.100 mL}^{-1}$.

O açúcar mascavo quando comparado aos açúcares cristal e demerara possui um valor nutricional superior tanto em vitaminas quanto em minerais (Cifuentes *et al.*, 2021; Zidan; Azlan, 2022). Barreira *et al.* (2020) avaliaram amostras de açúcares não refinados e o teor de compostos fenólicos encontrado foi de $0,58 \text{ a } 3,64 \text{ mg.g}^{-1}$ e a atividade antioxidante pelo método ABTS apresentou valores de $2,1 \text{ a } 13,3 \text{ } \mu\text{mol Trolox.g}^{-1}$. Além disso os autores identificaram os compostos fenólicos ácido clorogênico, cafeico, cumárico, ferúlico, cinâmico, luteolina, tricina, apigenina e flavonas por High Performance Liquid Chromatograph (HPLC).

As amostras de kefir de água desse estudo apresentaram redução no teor dos compostos fenólicos (amostra M = $1,40-1,35 \text{ g.L}^{-1}$) e na atividade antioxidante pelo método DPPH (amostra M = $60,6-56,9 \text{ } \mu\text{mol.100 mL}^{-1}$) e pelo método ABTS (amostra M = $324,3-261,2 \text{ } \mu\text{mol.100 mL}^{-1}$) em 24-48 h.

A redução no teor dos compostos fenólicos e na atividade antioxidante do kefir de água pode estar relacionada a formação de espécies reativas de oxigênio, dessa forma, os radicais livres formados são neutralizados pelos compostos antioxidantes presentes na bebida, o que reduz sua concentração no decorrer da fermentação (Hampton *et al.*, 2021). Ozcelik *et al.* (2021) mostraram que o teor dos compostos fenólicos e a capacidade antioxidante do kefir de água foram influenciados pelo tempo de fermentação, que reduziram os níveis ao longo do tempo, indicando uma sensibilidade desses compostos a uma exposição prolongada.

Velázquez-Quiñones *et al.* (2021) avaliaram a fermentação do tepache de maçã (bebida de fermentação natural) com a adição de grãos de kefir de água. As amostras foram submetidas a uma fermentação prolongada de 168 h e os resultados revelaram uma que as amostras de tepache de maçã fermentadas com grãos de kefir apresentaram uma maior capacidade antioxidante em relação as amostras de fermentação espontânea. Assim, o tepache de maçã fermentado com grãos de kefir apresentou atividade antioxidante pelo método ABTS de $144,2 \text{ mM.mL}^{-1}$ em 144 h.

Talib *et al.* (2019) isolaram *Lactobacillus* de amostras de kefir de água na Malásia e analisaram a capacidade antioxidante do microrganismo, relatando a inibição do radical DPPH entre 48,43 e 76,79 %. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que os lactobacilos podem ser empregados como antioxidantes naturais, devido a capacidade desses microrganismos de sintetizar naturalmente compostos antioxidantes.

Păcularu-Burada *et al.* (2022) reportaram que a atividade metabólica das bactérias e leveduras durante o processo de fermentação do kefir resultaram na liberação de novos compostos bioativos como os ácidos fenólicos e os ácidos orgânicos. A composição dos açúcares utilizados, bem como a adição de frutas e legumes durante a fermentação do kefir tendem a aumentar e estabilizar o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante da bebida (Çevik *et al.*, 2019; Laureys *et al.*, 2021).

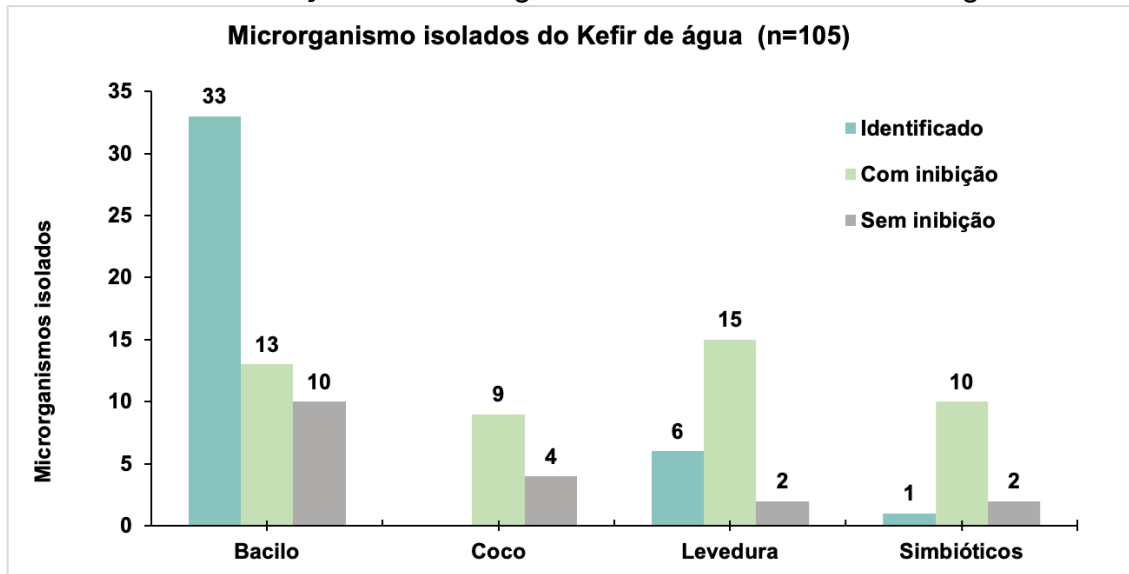
Neste estudo, observou-se que a fermentação do kefir de água com açúcar mascavo não apenas aumentou significativamente os valores de compostos fenólicos, mas também enriqueceu o perfil nutricional da bebida, com características antioxidantes. Esse enriquecimento sugere que o açúcar mascavo é uma fonte rica em compostos bioativos, conforme indicado na Tabela 1, que oferecem efeitos protetores contra o estresse oxidativo. Assim, a escolha do açúcar mascavo como substrato fermentativo representa uma estratégia valiosa para o desenvolvimento de bebidas funcionais com propriedades antioxidantes aprimoradas

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MORFOLOGIA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA

Foram isolados 105 microrganismos do kefir de água (Gráfico 4) identificados morfológicamente por coloração de Gram. As bactérias com morfologia de bacilos foram o grupo com maior número de isolados (n = 56, representando 53,33 %), seguidos pelas leveduras com 23 isolados (21,90 %), 13 isolados eram bactérias com morfologia de cocos (12,38 %) e 13 isolados eram microrganismos simbióticos (12,38 %). O grupo classificado como simbiótico foram aqueles isolados em que não foi possível separar os microrganismos, após sucessivas etapas de diluições e tentativas de isolamento sem sucesso, assim, eles foram categorizados como simbióticos. Todos os 105 microrganismos foram testados quanto a atividade antimicrobiana e a

maioria dos microrganismos ($n = 87$, representando um total de 82,85 %) apresentaram halos de inibição. Os 40 isolados (38,09 %) que apresentaram as maiores atividades antagonistas contra as bactérias patogênicas foram enviados para sequenciamento genético.

Gráfico 4 - Identificação dos microrganismos isolados do kefir de água



Fonte: Autoria própria (2023).

Arrieta-Echeverri *et al.* (2022) isolaram 95 microrganismos do kefir de água e a composição dos isolados foi de 73,7 % de bactérias e 26,3 % de leveduras. No decorrer do processo de fermentação (de 18 a 72 h) foram observadas alterações na comunidade microbiana. Os *Lactobacillus* representaram 80-90 % da composição microbiana em 24 h e as BAA não foram detectadas inicialmente, mas representaram aproximadamente 40 % da composição microbiana após 34 h de fermentação. Kazou *et al.* (2021) destacaram a variação significativa nas populações de BAL e leveduras durante a fermentação do kefir, com BAL variando entre 5,32 e 9,60 log UFC.mL⁻¹ e leveduras entre 2,49 e 7,80 log UFC/mL⁻¹.

Limbad *et al.* (2023) analisaram o comportamento da microbiota do kefir por 96 h fermentação, com sacarose, glicose e água de coco. Foi observado que as bactérias e leveduras apresentaram melhor crescimento na presença de sacarose, além disso as BAA cresceram melhor na presença do ácido láctico. Isso demonstra que a dinâmica da microbiota do kefir é influenciada pelas etapas da fermentação e pela presença de nutrientes essenciais (Zaninni *et al.*, 2022).

Wilches-López *et al.* (2023) reportaram que existem diferenças significativas nas populações de microrganismos nos grãos de kefir de água com base na origem geográfica e nos substratos utilizados para o cultivo. Os autores observaram que os componentes nutricionais do substrato da fermentação selecionaram certas espécies, potencializando seu crescimento em relação aos outros microrganismos e influenciando a constituição final dos metabólitos produzidos.

4.4 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA

A identificação genética dos 40 microrganismos isolados do kefir de água com as maiores atividades antagonistas contra as bactérias patogênicas está apresentada no Quadro 2.

Quadro 2 - Identificação genética dos microrganismos isolados de kefir de água e com base no sequenciamento de DNA de alto desempenho

Família		Sequenciamento	
<i>Acetobacteraceae</i>		V3/V4 do gene 16S rRNA	
Gênero	Espécie	Isolado	Id
<i>Acetobacter</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i>	100 %	231005245976.1.1.1_1_28001
	<i>Acetobacter tropicalis</i>	100 %	231005245977.1.1.1_1_29098
	<i>Acetobacter</i>	100 %	230815230112.1.1.1_1_1137
<i>Gluconobacter / Acetobacter</i>	<i>Acetobacter</i>	5 %	231005245975.1.1.1_1_8020
	<i>Acetobacter tropicalis</i>	2.8 %	231005245975.1.1.1_1_8021
	<i>Gluconobacter</i>	92.4 %	231005245975.1.1.1_1_2_7458
<i>Gluconobacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	100 %	230815230111.1.1.1_1_2827
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	230815230114.1.1.1_1_3058
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	230815230115.1.1.1_1_13142
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	230815230116.1.1.1_1_8143
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	230815230126.1.1.1_1_12534
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	230815230127.1.1.1_1_19605
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245965.1.1.1_1_24966
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245966.1.1.1_1_31865

Família		Sequenciamento	
Acetobacteraceae		V3/V4 do gene 16S rRNA	
Gênero	Espécie	Isolado	Id
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245967.1.1.1_1_18920
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245973.1.1.1_1_38681
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245974.1.1.1_1_31124
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245980.1.1.1_1_28353
	<i>Gluconobacter</i>	100 %	231005245981.1.1.1_1_38372
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100 %	230815230121.1.1.1_1_3889
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100 %	230815230123.1.1.1_1_1907
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100 %	230815230124.1.1.1_1_6172
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100 %	230815230128.1.1.1_1_6305
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100 %	230815230129.1.1.1_1_3813
	<i>Gluconobacter oxydans</i>	100 %	231005245968.1.1.1_1_26858
<i>Gluconobacter / komagataeibacter</i>	<i>Gluconobacter</i>	94.55 %	230815230125.1.1.1_1_11622
	<i>komagataeibacter</i>	5.45 %	230815230125.1.1.1_1_2_670
<i>Komagataeibacter</i>	<i>Komagataeibacter</i>	100 %	231005245969.1.1.1_1_29692
	<i>Komagataeibacter</i>	100 %	231005245971.1.1.1_1_35303
Família		Sequenciamento	
Lactobacillaceae		V3/V4 do gene 16S rRNA	
Gênero	Espécie	Isolado	Id
<i>Gluconobacter/ Lactobacillus</i>	<i>Acetobacter tropicalis</i>	51.8	231005245975.1.1.1_1_8020
	<i>Lactobacillus mali</i>	48.3	231005245975.1.1.1_2_7459
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus mali</i>	100 %	230815230113.1.1.1_1_2130
	<i>Lactobacillus</i>	100 %	230815230110.1.1.1_1_9946
	<i>Lactobacillus</i>	100 %	230815230117.1.1.1_1_6515
	<i>Lactobacillus</i>	100 %	230815230118.1.1.1_1_2361
	<i>Lactobacillus</i>	100 %	230815230119.1.1.1_1_7732-2
	<i>Lactobacillus</i>	100 %	230815230120.1.1.1_1_4218
	<i>Lactobacillus</i>	100 %	230815230122.1.1.1_1_4770-2

Família		Sequenciamento	
Saccharomycetaceae		Região espaçadora ribossomal ITS1	
Gênero	Espécie	Isolado	Id
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100 %	231128244613
<i>Pichia</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>	100 %	231128244614
<i>Hanseniaspora</i>	<i>Hanseniaspora vineae</i>	100 %	231128244611
	<i>Hanseniaspora vineae</i>	100 %	231128244612
	<i>Hanseniaspora vineae</i>	100 %	231128244609
<i>Brettanomyces</i>	<i>Brettanomyces</i>	100 %	231128244616

Fonte: Autoria própria (2023). Sequenciamento elaborado por BIOMEHUB.

O sequenciamento genético de 40 microrganismos isolados do kefir identificou 65,0 % de bactérias do ácido acético (BAA), 17,5 % de bactérias do ácido láctico (BAL) e 15 % de leveduras. As BAA (65,0 %) foram compostas pelos gêneros *Gluconabacter* (n = 19; 47,5 %), *Acetobacter* (n = 3; 7,5 %), *Komagataeibacter* (n = 3; 7,5 %), e pelas simbióticas *Gluconabacter / Acetobacter* (n = 1; 2,5 %) e *Gluconabacter / Komagataeibacter* (n = 1; 2,5 %). As BAL (17,5 %) foram identificadas como *Lactobacillus* (n = 7; 17,5 %), e a composição das leveduras (15 %) foi *Brettanomyces* (n = 1; 2,5 %), *Hanseniaspora* (n = 3, 7,5 %), *Pichia* (n = 1; 2,5 %) e *Saccharomyces cerevisiae* (n = 1; 2,5 %). Um isolado simbiótico (2,5 %) apresentou uma composição com bactérias de famílias distintas, *Gluconabacter / Lactobacillus* (n = 1; 2,5 %).

Zaninni *et al.* (2023) observaram que os gêneros *Acetobacter* e *Gluconobacter* foram dominantes nas bebidas de kefir de água fermentadas com frutas. Azi *et al.* (2020) identificaram *Lactobacillus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia membranifaciens* como os principais microrganismos predominantes em uma bebida à base de soro de soja fermentada por grãos de kefir de água. Kumar *et al.* (2021) avaliaram a composição das bactérias presentes no kefir e observaram 93,8 % de bactérias do ácido láctico e somente 5,9 % de bactérias do ácido acético. A espécie mais abundante foi *Lactobacillus hilgardii* (43,0 %). Outras espécies de lactobacilos presentes foram: *Lactobacillus harbinensis* (4,4 %), *Lactobacillus satsumensis* (1,7 %) e *Lactobacillus zeae* (1,1 %). As espécies de BAA presentes foram *Acetobacter lovaniensis* (2,1 %), *Acetobacter tropicalis* (1,4 %), *Gluconobacter oxydans* (0,3 %) e *Komagataeibacter hansenii* (0,1 %).

A composição microbiana do kefir de água é influenciada por vários fatores, incluindo a natureza dos grãos de kefir e as condições de fermentação. Arrieta-

Echeverri *et al.* (2022) e Cufaoglu e Erdinc (2023) destacaram a diversidade microbiana do kefir de água, com alterações significativas das populações observadas durante o processo de fermentação. Esta diversidade microbiana é fundamental para as características sensoriais e funcionais do kefir.

Os resultados deste estudo estão alinhados à literatura anterior, destacando a importância da composição microbiana do kefir na fermentação e nas propriedades antimicrobianas da bebida. A identificação genética dos microrganismos isolados do kefir de água revelou uma rica diversidade e destacou uma maior proporção de BAA entre os microrganismos identificados, que se destacam por serem grandes produtores de ácido acético e celulose bacteriana, além de participarem da síntese e degradação diversos compostos durante a fermentação (Hata *et al.*, 2022; Lynch *et al.*, 2019). Esses dados reforçam a necessidade de explorar o impacto desses microrganismos como potenciais agentes terapêuticos na saúde humana e suas possíveis aplicações industriais.

4.5 TESTE DE ANTAGONISMO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO KEFIR DE ÁGUA

A tabela 2 apresenta capacidade antagonista dos microrganismos isolados do kefir de água. Observou-se que dentre os 105 microrganismos isolados, 67 (63,80 %) exibiram inibição contra *A. baumannii* (11,28 a 32,63 mm), 66 (62,85 %) contra *P. aeruginosa* (10,81 a 26,87 mm), 76 (72,38 %) contra *E. faecalis* (7,57 a 29,35 mm) e 56 (53,33 %) contra *L. monocytogenes* (10,77 a 27,93 mm).

Tabela 2 - Avaliação da capacidade inibitória dos microrganismos isolados do kefir de água contra *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*

Id	Isolado (N=105) Nome	Halos de inibição (mm)			
		<i>A. baumannii</i> (n=67)	<i>P. aeruginosa</i> (n=66)	<i>E. faecalis</i> (n=76)	<i>L. monocytogenes</i> (n=56)
1	<i>Acetobacter</i>	21,77±0,38	19,97±0,19	16,00±0,30	21,58±1,42
2	<i>Acetobacter tropicalis</i>	24,10±1,26	12,90±0,39	16,01±0,26	16,01±0,67
3	<i>Acetobacter tropicalis</i>	21,42±0,39	17,65±0,76	15,32±0,76	12,70±0,07
4	<i>Gluconobacter</i>	15,73±0,98	17,95±1,95	15,50±0,99	16,03±0,45
5	<i>Gluconobacter</i>	22,91±0,01	18,12±1,04	18,87±0,60	20,78±0,85
6	<i>Gluconobacter</i>	25,34±0,12	18,37±0,23	17,80±0,19	15,50±0,87
7	<i>Gluconobacter</i>	21,11±2,02	18,46±0,38	25,76±0,89	27,93±0,61
8	<i>Gluconobacter</i>	24,22±1,09	19,39±2,97	15,97±3,24	15,48±3,01

Id	Isolado (N=105) Nome	Halos de inibição (mm)			
		<i>A. baumannii</i> (n=67)	<i>P. aeruginosa</i> (n=66)	<i>E. faecalis</i> (n=76)	<i>L. monocytogenes</i> (n=56)
9	<i>Gluconobacter</i>	20,96±0,63	20,28±0,68	26,55±0,69	16,60±3,23
10	<i>Gluconobacter</i>	18,99±0,57	21,04±1,75	21,48±1,21	17,66±1,56
11	<i>Gluconobacter</i>	24,05±0,22	21,04±1,41	19,07±1,30	17,17±0,61
12	<i>Gluconobacter</i>	18,65±2,31	21,06±1,03	24,26±3,66	11,05±0,73
13	<i>Gluconobacter</i>	25,27±1,02	21,07±1,00	26,57±1,16	15,93±0,58
14	<i>Gluconobacter</i>	32,63±2,91	21,23±0,17	20,86±0,70	17,51±0,39
15	<i>Gluconobacter</i>	28,29±0,53	21,68±0,42	28,45±0,86	16,96±4,95
16	<i>Gluconobacter</i>	31,90±1,22	23,01±1,55	28,14±1,96	17,70±0,62
17	<i>Gluconobacter</i> / <i>Acetobacter</i> / <i>Acetobacter</i> <i>tropicalis</i>	18,50±1,33	19,63±0,4	15,47±0,71	12,84±1,25
18	<i>Gluconobacter</i> / <i>komagataeibacter</i>	17,63±0,06	18,27±0,75	21,03±0,46	14,33±0,75
19	<i>Gluconobacter oxydans</i>	16,77±0,26	18,37±0,5	17,72±0,31	15,42±0,21
20	<i>Gluconobacter oxydans</i>	25,67±1,4	20,53±0,67	23,95±1,29	16,68±0,31
21	<i>Gluconobacter oxydans</i>	27,63±0,66	20,84±0,3	29,35±0,88	18,44±0,20
22	<i>Gluconobacter oxydans</i>	24,78±1,10	23,58±0,51	18,35±0,9	17,65±0,49
23	<i>Gluconobacter oxydans</i>	28,15±2,04	23,94±0,78	25,91±0,42	21,46±2,98
24	<i>Gluconobacter oxydans</i>	21,55±1,05	24,89±0,41	16,6±0,73	20,57±1,17
25	<i>Komagataeibacter</i>	24,98±1,07	15,44±0,62	19,15±1,28	16,51±0,86
26	<i>Komagataeibacter</i>	20,91±1,10	16,59±0,48	15,52±0,78	12,31±0,25
27	<i>Lactobacillus</i>	24,46±0,31	17,54±0,47	19,74±1,37	20,42±1,68
28	<i>Lactobacillus</i>	22,83±1,29	18,43±0,63	19,2±1,78	10,93±0,92
29	<i>Lactobacillus</i>	22,48±0,21	19,65±2,05	18,42±1,69	17,84±0,11
30	<i>Lactobacillus</i>	24,79±0,89	19,80±1,03	19,23±0,52	16,97±1,55
31	<i>Lactobacillus</i>	25,40±0,45	21,16±1,91	17,38±0,62	17,01±5,76
32	<i>Lactobacillus</i>	25,39±0,43	22,57±1,7	15,27±0,98	10,75±0,76
33	<i>Lactobacillus mali</i>	24,53±0,7	24,15±0,94	25,35±1,45	N/A
34	<i>Acetobacter tropicalis</i> / <i>Lactobacillus mali</i>	26,81±0,01	20,27±1,56	18,32±0,49	16,52±0,78
35	<i>Brettanomyces</i>	27,31±0,02	24,26±0,27	20,17±0,87	18,39±0,32
36	<i>Hanseniaspora vineae</i>	24,23±0,74	15,77±2,69	18,36±0,76	18,65±0,54
37	<i>Hanseniaspora vineae</i>	19,02±1,32	20,02±0,24	16,03±0,4	12,93±1,02
38	<i>Hanseniaspora vineae</i>	27,95±0,78	20,72±2,34	21,68±1,14	11,27±0,24
39	<i>Pichia membranifaciens</i>	15,71±1,40	16,58±2,70	12,02±0,55	17,32±0,10
40	<i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	11,46±0,78	10,81±0,90	15,74±0,56	16,82±0,84
41	Bacilo_41	N/A	N/A	22,42±1,07	N/A
42	Bacilo_42	18,50±2,58	N/A	17,60±1,51	N/A
43	Bacilo_43	N/A	N/A	15,15±2,02	N/A
44	Bacilo_44	11,28±0,52	N/A	11,72±0,69	N/A
45	Bacilo_45	N/A	N/A	11,15±0,72	N/A
46	Bacilo_46	28,86±0,81	N/A	N/A	N/A
47	Bacilo_47	N/A	11,97±0,74	N/A	11,93±1,28
48	Bacilo_48	19,96±1,74	12,90±0,63	18,20±0,72	15,19±0,41

Isolado (N=105)		Halos de inibição (mm)			
		<i>A. baumannii</i> (n=67)	<i>P. aeruginosa</i> (n=66)	<i>E. faecalis</i> (n=76)	<i>L. monocytogenes</i> (n=56)
Id	Nome				
49	Bacilo_49	16,59±0,38	17,72±1,62	17,03±0,20	21,30±1,40
50	Bacilo_50	25,01±0,73	19,42±4,08	26,35±0,50	N/A
51	Bacilo_51	27,7±2,22	21,12±0,22	14,27±0,68	15,91±0,73
52	Bacilo_52	12,79±0,44	23,19±0,21	N/A	N/A
53	Bacilo_53	N/A	25,20±2,72	21,46±0,64	15,55±1,28
54	coco_54	23,16±0,5	N/A	20,16±0,7	N/A
55	coco_55	N/A	13,61±0,79	7,37±0,23	N/A
56	coco_56	N/A	14,28±0,26	10,44±0,49	N/A
57	coco_57	17,10±0,76	14,61±0,29	4,71±8,16	7,77±5,03
58	coco_58	13,10±0,66	15,50±0,75	14,28±3,99	N/A
59	coco_59	13,12±0,31	15,79±0,45	13,99±0,80	N/A
60	coco_60	17,63±0,34	21,02±0,31	19,08±3,70	14,18±4,46
61	coco_61	14,27±0,27	22,54±0,44	N/A	N/A
62	coco_62	14,27±0,25	26,87±3,07	N/A	16,07±1,01
63	Levedura_63	N/A	N/A	18,52±0,82	N/A
64	Levedura_64	N/A	N/A	14,99±0,21	N/A
65	Levedura_65	N/A	N/A	14,46±0,28	N/A
66	Levedura_66	N/A	N/A	13,84±0,07	N/A
67	Levedura_67	N/A	N/A	13,46±1,09	N/A
68	Levedura_68	16,37±0,26	N/A	13,00±0,67	N/A
69	Levedura_69	11,22±0,95	N/A	N/A	N/A
70	Levedura_70	12,47±0,59	N/A	N/A	N/A
71	Levedura_71	14,51±0,04	N/A	N/A	N/A
72	Levedura_72	43,53±5,69	N/A	N/A	N/A
73	Levedura_73	N/A	8,87±7,68	4,13±7,16	N/A
74	Levedura_74	13,50±0,64	14,36±0,88	16,48±0,46	13,91±0,17
75	Levedura_75	16,28±1,47	22,80±0,79	N/A	22,74±1,93
76	Levedura_76	21,71±2,27	22,87±1,42	14,11±1,85	15,72±0,19
77	Levedura_77	N/A	26,39±1,86	14,52±0,19	15,58±1,25
78	Simbiótico_78	N/A	N/A	14,90±0,10	N/A
79	Simbiótico_79	N/A	N/A	18,33±0,83	N/A
80	Simbiótico_80	N/A	N/A	18,31±1,38	N/A
81	Simbiótico_81	12,97±0,58	N/A	14,09±0,81	N/A
82	Simbiótico_82	11,92±0,84	11,34±0,37	N/A	N/A
83	Simbiótico_83	N/A	14,40±2,16	19,50±1,71	11,45±1,26
84	Simbiótico_84	32,31±0,72	17,86±0,57	16,38±1,21	21,03±0,68
85	Simbiótico_85	N/A	18,47±1,25	14,92±0,33	16,43±1,22
86	Simbiótico_86	32,03±2,04	19,36±1,6	23,99±0,39	12,47±2,24
87	Simbiótico_87	N/A	24,02±5,24	21,58±0	14,19±1,36
88	Bacilo_88	N/A	N/A	N/A	N/A
89	Bacilo_89	N/A	N/A	N/A	N/A
90	Bacilo_90	N/A	N/A	N/A	N/A
91	Bacilo_91	N/A	N/A	N/A	N/A
92	Bacilo_92	N/A	N/A	N/A	N/A

Isolado (N=105)		Halos de inibição (mm)			
		<i>A. baumannii</i> (n=67)	<i>P. aeruginosa</i> (n=66)	<i>E. faecalis</i> (n=76)	<i>L. monocytogenes</i> (n=56)
Id	Nome				
93	Bacilo_93	N/A	N/A	N/A	N/A
94	Bacilo_94	N/A	N/A	N/A	N/A
95	Bacilo_95	N/A	N/A	N/A	N/A
96	Bacilo_96	N/A	N/A	N/A	N/A
97	Bacilo_97	N/A	N/A	N/A	N/A
98	Simbiótico_98	N/A	N/A	N/A	N/A
99	Simbiótico_99	N/A	N/A	N/A	N/A
100	coco_100	N/A	N/A	N/A	N/A
101	coco_101	N/A	N/A	N/A	N/A
102	coco_102	N/A	N/A	N/A	N/A
103	coco_103	N/A	N/A	N/A	N/A
104	Levedura_104	N/A	N/A	N/A	N/A
105	Levedura_105	N/A	N/A	N/A	N/A

Fonte: A autoria própria (2023). (N) total de microrganismos isolados. (n) total de microrganismos com atividade inibitória. N/A = não houve halo de inibição. Análise realizada em triplicata e valores expressos em Média (Desvio Padrão) dos halos de inibição medidos em milímetro (mm). Imagens dos testes de antagonismo estão disponíveis no Apêndice N.

Gut *et al.* (2022) avaliaram a inibição do crescimento de *Salmonella* pelos metabólitos antimicrobianos produzidos pelas leveduras *Kluyveromyces lactis* e *Saccharomyces unisporus*, ambas isoladas de grãos de kefir. Os resultados mostraram a síntese de proteínas como lactotransferrina e mucina-1e lactoperoxidase, e a síntese álcool, que apresentaram efeito inibitório no crescimento dessa bactéria patogênica. Gonzalêz-Orozco *et al.* (2023) observaram que os lactobacilos isolados do kefir de água (*L. kefiranofaciens*, *L. helveticus* e *L. kefiri*) apresentaram tolerância ao pH ácido e a presença de sais biliares, além de sintetizar proteínas antimicrobianas.

Ellatif *et al.* (2022) testaram a capacidade antimicrobiana dos metabólitos produzidos durante a fermentação do kefir de água e obtiveram as seguintes taxas de inibição do crescimento microbiano: *Klebsiella pneumoniae* (36,80 %), *Salmonella* sp. (30,85 %), *E. coli* (23,70 %), e *Pseudomonas aeruginosa* (18,60 %) (bactérias Gram-negativas) e *Streptococcus mutans* (28,60 %) e *Staphylococcus aureus* (27,40 %) (bactérias Gram-positivas).

Em nosso estudo, os microrganismos isolados do kefir de água mostraram uma forte capacidade antagonista contra bactérias patogênicas responsáveis por diversas doenças. Vários estudos reportaram resultados similares da atividade antimicrobiana de microrganismos que foram isolados do kefir contra cepas patogênicas (Ellatif *et al.*, 2021; González-Orozco *et al.*, 2023; Tan *et al.*, 2022). Além disso, estudos atribuíram

a atividade antimicrobiana aos metabólitos produzidos pelos microrganismos do kefir durante a fermentação como bacteriocinas, EPS, peptídeos bioativos e peróxido de hidrogênio, além de ácidos orgânicos e compostos voláteis (Afifi *et al.*, 2020; González-Orozco *et al.*, 2022; Gut *et al.*, 2022; Marques *et al.*, 2020).

5 CONCLUSÃO

As melhores condições para a produção da bebida kefir de água foram: 10 % (p/v) de grãos de kefir adicionados em uma solução de água e açúcar mascavo a 5 °Brix. Assim, os grãos fermentados a 30 °C tiveram maior taxa de crescimento em comparação com a temperatura de 25 °C e os grãos fermentados com concentração de açúcar a 5 °Brix tiveram maior taxa de crescimento em comparação com a concentração de açúcar a 10°Brix. O kefir de açúcar mascavo apresentou os maiores valores de compostos fenólicos e a atividade antioxidante em relação as bebidas elaboradas com açúcares demerara e cristal.

A maioria dos microrganismos isolados do kefir de água (87/105, 82,85 %) apresentaram atividade antagonista contra as bactérias patogênicas testadas, exibindo halos de inibição do crescimento de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*.

Assim, os microrganismos isolados do kefir de água mostraram notável capacidade em inibir uma variedade de bactérias patogênicas. A composição microbiana diversificada do kefir, incluindo bactérias acéticas, bactérias lácticas, e leveduras, contribui para a sua atividade antimicrobiana de amplo espectro, tornando-o uma alternativa natural promissora para combater microrganismos patogênicos. Identificar os isolados que apresentam atividade antagonista pode contribuir com pesquisas futuras e fornecer evidências científicas sobre as propriedades probióticas do kefir. Além de, permitir que novos compostos antimicrobianos ou novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas contra microrganismos patogênicos resistentes.

Para estudos futuros serão realizados os testes de estabilidade frente ao pH estomacal e intestinal, resistência às enzimas digestivas e à presença de sais biliares com os microrganismos isolados do kefir que apresentaram atividade antagonista e foram caracterizados como probióticos. Esses microrganismos podem ser explorados isoladamente tanto nas indústrias farmacêuticas como nas indústrias alimentícias, com possibilidades de aplicações diversas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afifi S, El-Sharif A, Helal Z, El-Musallamy E. Activity of kefir grains against *Gardnerella vaginalis*. Bact Emp [Internet]. 26 nov 2020; 3(4):69-73. Disponível em: <https://doi.org/10.36547/be.2020.3.4.69-73>
- Al-Mohammadi AR, Ibrahim RA, Moustafa AH, Ismaiel AA, Abou Zeid A, Enan G. Chemical constitution and antimicrobial activity of kefir fermented beverage. Molecules [Internet]. 30 abr 2021; 26(9):2635. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26092635>
- Alrosan M, Tan TC, Mat Easa A, Gammoh S, Alu'datt MH, Mohamed Aleid G, Alhamad MN, Maghaydah S. Evaluation of quality and protein structure of natural water kefir-fermented quinoa protein concentrates. Food Chem [Internet]. Out 2022; 134614. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134614>
- Alves E., Ntungwe E., Gregório J., Rodrigues L., Pereira-Leite C., Caleja C. *et al.* Characterization of kefir produced in household conditions: physicochemical and nutritional profile, and storage stability. Foods 2021; 10(5):1057. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10051057>
- Arrieta-Echeverri MC, Fernandez GJ, Duarte-Riveros A, Correa-Álvarez J, Bardales JA, Villanueva-Mejía DF, Sierra-Zapata L. Multi-omics characterization of the microbial populations and chemical space composition of a water kefir fermentation. Front Mol Biosci [Internet]. 2 out 2023; 10. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1223863>
- AOAC - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. v. 2, ed. 15, Washington, 2006.
- Asevedo S M L, Fontoura CRO, Santos LMR. Avaliação dos efeitos da adição de trub na fermentação de uma cerveja do tipo Pilsen. CadUniFOA [Internet]. 24º de abril de 2020,15(42). Disponível em: <https://revistas.unifoa.edu.br/cadernos/article/view/3085>
- Azi F, Tu C, Meng L, Zhiyu L, Cherinet MT, Ahmadullah Z, Dong M. Metabolite dynamics and phytochemistry of a soy whey-based beverage bio-transformed by water kefir consortium. Food Chem [Internet]. Set 2020; 128225. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128225>
- Bechtner J, Wefers D, Schmid J, Vogel RF, Jakob F. Identification and comparison of two closely related dextransucrases released by water kefir borne *Lactobacillus hordei* TMW 1.1822 and *Lactobacillus nagelii* TMW 1.1827. Microbiology [Internet]. 1 set 2019; 165(9):956-66. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/mic.0.000825>
- Bengoa AA, Iraporda C, Garrote GL, Abraham AG. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. J Appl Microbiol [Internet]. 18 out 2018; 126(3):686-700. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14107>
- Bueno RS, Ressutte JB, Hata NN, Henrique-Bana FC, Guergoletto KB, de Oliveira AG, Spinosa WA. Quality and shelf-life assessment of a new beverage produced from

water kefir grains and red pitaya. LWT [Internet]. Abr 2021; 140:110770. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110770>

Cai Y, Sounderrajan A, Serventi L. Water kefir: a review of its microbiological profile, antioxidant potential and sensory quality. Acta Sci Nutr Health [Internet]. 27 maio 2020; 4(6):10-7. Disponível em: <https://doi.org/10.31080/asnh.2020.04.0706>

Calatayud M, Börner RA, Ghyselinck J, Verstrepen L, Medts JD, Abbeele PV, Boulangé CL, Priour S, Marzorati M, Damak S. Water Kefir and derived pasteurized beverages modulate gut microbiota, intestinal permeability, and cytokine production *in vitro*. Nutrients [Internet]. 29 out 2021; 13(11):3897. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu13113897>

Çevik T, Aydoğdu NS, Özdemir N, Kök Taş T. The Effect of different sugars on water kefir grains. Turk J Agric Food Sci Technol [Internet]. 10 dez 2019; 7(sp1):40. Disponível em: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7isp1.40-45.2687>

Cifuentes J, Salazar VA, Cuellar M, Castellanos MC, Rodríguez J, Cruz JC, Muñoz-Camargo C. Antioxidant and neuroprotective properties of non-centrifugal cane sugar and other sugarcane derivatives in an *in vitro* induced Parkinson's model. Antioxidants [Internet]. 29 jun 2021; 10(7):1040. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/antiox10071040>

Coma M., Peltzer M., Delgado J., Salvay A. water kefir grains as an innovative source of materials: study of plasticiser content on film properties. European Polymer Journal 2019; 120:109234. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109234>

Cruz GNF, Christoff AP, de Oliveira LFFV. Equivolumetric protocol generates library sizes proportional to total microbial load in 16S amplicon sequencing. Front Microbiol. 2021 Feb 26; 12:638231.

Cufaoglu G, Erdinc AN. An alternative source of probiotics: Water kefir. Food Front [Internet]. 8 jan 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/fft2.200>

da Fontoura Prates, D., Radünz, M., Gomes, R., de Menezes, J. L., Spinoza, W. A., Costa, J. A. V., Ida, E. I., & Gandra, E. A. (2022). Development, fermentation, and storage of kefir with extract of pineapple residues and *Spirulina* sp. J Food Process Preserv. 2022;46:e17078. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.17078>.

Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, Darb Emamie A, Ghanavati R, Kakanj M. Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. J Clin Lab Anal [Internet]. Dez 2021; 36(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcla.24093>

Darvishzadeh P, Orsat V, Faucher SP. Encapsulation of Russian Olive Water Kefir as an Innovative Functional Drink with High Antioxidant Activity. Plant Foods Hum Nutr [Internet]. 13 mar 2021; 76(2):161-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00886-8>

De Roos J, De Vuyst L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. Fev 2018; 49:115-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.007>

Dong X., Shu G., Kang J., Zhang Q., Ma L., Zhang M. *et al.* Microbial diversity of six commercially available kefir grains. *Acta Universitatis Cibiniensis Series e Food Technology* 2022; 26(2):287-292. <https://doi.org/10.2478/aucft-2022-0023>

Eckel V., Ziegler L., Vogel R., Ehrmann M. *Bifidobacterium tibiigranuli* sp. nov. isolated from homemade water kefir. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020; 70(3):1562-1570. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003936>

Egea MB, Santos DC, Oliveira Filho JG, Ores JD, Takeuchi KP, Lemes AC. A review of nondairy kefir products: their characteristics and potential human health benefits. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 5 nov 2020, 1-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1844140>

Ellatif SA, Abdel Razik ES, Abu-Serie MM, Mahfouz A, Shater AF, Saleh FM, Hassan MM, Alsanie WF, Altalhi A, Daigham GE, Mahfouz AY. Immunomodulatory efficacy-mediated anti-HCV and anti-HBV potential of kefir grains; unveiling the *in vitro* antibacterial, antifungal, and wound healing activities. *Molecules* [Internet]. 21 mar 2022; 27(6):2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27062016>

FAO/WHO. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation - FAO Food and Nutrition Paper, p. 1-85, 2006. Disponível em: <https://www.fao.org/3/a0512e/a0512e.pdf>.

Fels L, Jakob F, Vogel RF, Wefers D. Structural characterization of the exopolysaccharides from water kefir. *Carbohydr Polym* [Internet]. Jun 2018; 189:296-303. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.02.037>

Fiorda FA, de Melo Pereira GV, Thomaz-Soccol V, Rakshit SK, Pagnoncelli MG, Vandenberghe LP, Soccol CR. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiol* [Internet]. Set 2017; 66:86-95. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.004>

Folin O, Denis W. On Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents. *J Biol Chem* [Internet]. Ago 1912; 12(2):239-43. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)88697-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)88697-5)

Gamba RR, Koyanagi T, Peláez AL, De Antoni G, Enomoto T. Changes in microbiota during multiple fermentation of kefir in different sugar solutions revealed by high-throughput sequencing. *Curr Microbiol* [Internet]. 7 maio 2021; 78(6):2406-13. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02501-0>

Gamba RR, Yamamoto S, Sasaki T, Michihata T, Abdel-Hamid M, Koyanagi T, Enomoto T. Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. *Food Sci Technol Res*. 26 April 2019; 25(2):303-312. Disponível em: <https://doi.org/10.3136/fstr.25.303>

Garofalo C., Ferrocino I., Reale A., Sabbatini R., Milanović V., Alkić-Subašić M. *et al.* study of kefir drinks produced by backslopping method using kefir grains from Bosnia and Herzegovina: microbial dynamics and volatile profile. *Food Research International* 2020; 137:109369. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109369>

Ghapanvari P, Taheri M, Jalilian FA, Dehbashi S, Dezfuli AA, Arabestani MR. The effect of nisin on the biofilm production, antimicrobial susceptibility and biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Med Res* [Internet]. 8 set 2022; 27(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00804-x>

González-Orozco BD, García-Cano I, Escobar-Zepeda A, Jiménez-Flores R, Álvarez VB. Metagenomic analysis and antibacterial activity of kefir microorganisms. *J Food Sci* [Internet]. 24 maio 2023 . Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16614>

Gut AM, Vasiljevic T, Yeager T, Donkor ON. Anti-salmonella properties of kefir yeast isolates: An in vitro screening for potential infection control. *Saudi J Biol Sci*. 2022 Jan; 29(1):550-563.

Guzel-Seydim ZB, Gökırmaklı Ç, Greene AK. A comparison of milk kefir and water kefir: Physical, chemical, microbiological and functional properties. *Trends Food Sci Amp Technol* [Internet]. Jul 2021; 113:42-53. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.04.041>

Hampton J, Tang C, Jayasree Subhash A, Serventi L. Assessment of pear juice and puree as a fermentation matrix for water kefir. *J Food Process Preserv*. 2021; 45:e15223. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15223>

Ibrahim SA, Ayivi RD, Zimmerman T, Siddiqui SA, Altemimi AB, Fidan H, Esatbeyoglu T, Bakhshayesh RV. Lactic acid bacteria as antimicrobial agents: food safety and microbial food spoilage prevention. *Foods* [Internet]. 17 dez 2021; 10(12):3131. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods10123131>

IAL. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. ed. 4, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

Kazou M, Grafakou A, Tsakalidou E, Georgalaki M. Zooming into the microbiota of home-made and industrial kefir produced in Greece using classical microbiological and amplicon-based metagenomics analyses. *Front Microbiol*. 2021 Jan 28; 12:621069.

Kebler L. "California bees." 11the author stated that the work on this subject is the result of investigation for the post a c e department relative to improper use of the mails in connection with this product. *The Journal of the American Pharmaceutical Association* (1912) 1921; 10(12):939-943. <https://doi.org/10.1002/jps.3080101206>

Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutr* [Internet]. 2 jan 2013; 2013:1-7. Disponível em: <https://doi.org/10.5402/2013/481651>

Kim DH, Jeong D, Kim H, Kang IB, Chon JW, Song KY, Seo KH. Antimicrobial activity of kefir against various food pathogens and spoilage bacteria. *Korean J Food Sci Anim Resour* [Internet]. 31 dez 2016; 36(6):787-90. Disponível em: <https://doi.org/10.5851/kosfa.2016.36.6.787>

Koh WY, Utra U, Rosma A, Effarizah ME, Rosli WI, Park YH. Development of a novel fermented pumpkin-based beverage inoculated with water kefir grains: a response surface methodology approach. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 12 dez 2017 . Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0245-5>

Köhler S, Schmacht M, Troubounis AHL, Ludszuweit M, Rettberg N, Senz M. Tradition as a steppingstone for a microbial defined water kefir fermentation process: insights in cell growth, bioflavoring, and sensory perception. *Front Microbiol*. 2021 Nov 4; 12:732019.

Kranjec C, Ovchinnikov KV, Grønseth T, Ebineshan K, Srikantam A, Diep DB. A bacteriocin-based antimicrobial formulation to effectively disrupt the cell viability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes* [Internet]. Dez 2020; 6(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00166-4>

Kumar MR, Yeap SK, Mohamad NE, Abdullah JO, Masarudin MJ, Khalid M, Leow AT, Alitheen NB. Metagenomic and phytochemical analyses of kefir water and its subchronic toxicity study in BALB/c mice. *BMC Complement Med Ther* [Internet]. 1 jul 2021; 21(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03358-3>

Laureys D, Leroy F, Vandamme P, De Vuyst L. Backslopping time, rinsing of the grains during backslopping, and incubation temperature influence the water kefir fermentation process. *Front Microbiol* [Internet]. 6 maio 2022; 13. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.871550>

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. *Front Microbiol* [Internet]. 11 fev 2021; 12. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628599>

Laureys D, Aerts M, Vandamme P, De Vuyst L. The buffer capacity and calcium concentration of water influence the microbial species diversity, grain growth, and metabolite production during water kefir fermentation. *Front Microbiol* [Internet]. 13 dez 2019; 10. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02876>

Laureys D, Aerts M, Vandamme P, De Vuyst L. Oxygen and diverse nutrients influence the water kefir fermentation process. *Food Microbiol* [Internet]. Ago 2018; 73:351-61. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.02.007>

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. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 9 jan 2017; 101(7):2811-9. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8084-5>

Laureys D, De Vuyst L. The water kefir grain inoculum determines the characteristics of the resulting water kefir fermentation process. *J Appl Microbiol* [Internet]. 15 fev 2016; 122(3):719-32. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.13370>

Laureys D, De Vuyst L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 14 fev 2014; 80(8):2564-72. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/aem.03978-13>

Limbad M, Gutierrez-Maddox N, Hamid N, Kantono K, Liu T, Young T. Microbial and chemical changes during fermentation of coconut water kefir beverage. *Appl Sci*. 2023; 13(12):7257. <https://doi.org/10.3390/app13127257>

Luang-In V, Saengha W, Yotchaisarn M, Halaslova M, Udomwong P, Deeseenthum S. Microbial strains and bioactive exopolysaccharide producers from Thai water kefir. *Microbiol Biotechnol Lett* [Internet]. 28 dez 2018; 46(4):403-15. Disponível em: <https://doi.org/10.4014/mbl.1804.04019>

Lucena M., Ramos I., Geronço M., Araújo R., Filho F., Silva L. *et al.* Biopolymer from water kefir as a potential clean-label ingredient for health applications: evaluation of new properties. *Molecules* 2022; 27(12):3895. <https://doi.org/10.3390/molecules27123895>

Lynch KM, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK. An update on water kefir: microbiology, composition and production. *Int J Food Microbiol* [Internet]. Maio 2021; 345:109128. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109128>

Lynch KM, Zannini E, Wilkinson S, Daenen L, Arendt EK. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2 abr 2019; 18(3):587-625. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12440>

Magaldi S, Mata-Essayag S, Hartung de Capriles C, Perez C, Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *Int J Infect Dis*. 2004 Jan; 8(1):39-45. doi: 10.1016/j.ijid.2003.03.002. PMID: 14690779.

Maldonado RR, Pedreira AJ, Cristianini LB, Guidi MF, Capato MO, Ávila PF, Goldbeck R, Kamimura ES. Application of soluble fibres in the osmotic dehydration of pineapples and reuse of effluent in a beverage fermented by water kefir. *LWT* [Internet]. Out 2020; 132:109819. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109819>

Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens* [Internet]. 12 out 2021; 10(10):1310. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>

Marco ML, Sanders ME, Gänzle M, Arrieta MC, Cotter PD, De Vuyst L, Hill C, Holzapfel W, Lebeer S, Merenstein D, Reid G, Wolfe BE, Hutkins R. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. *Nat Rev Gastroenterol Amp Hepatol* [Internet]. 4 jan 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-020-00390-5>

Marques VD, Franzolin MR, Sanabani SS, Vigerelli H, Piazza RM, Pimenta DC, Venâncio T, Neves IV, de Sousa Silva HG, dos Santos Courrol D, Mendonça-Previato L, Previato JO, Jorge SA, de Oliveira Domingos M. A new class of antimicrobial molecules derived from kefir, effective against *Pseudomonas aeruginosa* and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. *Sci Rep* [Internet]. 15 out 2020; 10(1). Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73651-7>

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. *Int J Food Sci Amp Technol* [Internet]. 17 nov 2016; 52(2):559-71. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13312>

Metchnikoff, E. *The prolongation of life: Optimistic studies*. Ed. G. P. Putnam & Sons, London; 1907.

Mgomi FC, Yang YR, Cheng G, Yang ZQ. Lactic acid bacteria biofilms and their antimicrobial potential against pathogenic microorganisms. *Biofilm* [Internet]. Abr 2023, 100118. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2023.100118>

Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*,1959; 31(3):426-8. Disponível em :doi.org/10.1021/ac60147a030

Moretti AF, Moure MC, 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* [Internet]. Jun 2022; 5:100123. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100123>

Nikolaou A, Tsakiris A, Kanellaki M, Bezirtzoglou E, Akrida-Demertzi K, Kourkoutas Y. Wine production using free and immobilized kefir culture on natural supports. *Food Chem*. 2019 Jan 30; 272:39-48.

Ozcelik F, Akan E, Kinik O. Use of Cornelian cherry, hawthorn, red plum, roship and pomegranate juices in the production of water kefir beverages. *Food Biosci* [Internet]. Ago 2021; 42:101219. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101219>

Păcularu-Burada B, Ceoromila AM, Vasile MA, Bahrim GE. Novel insights into different kefir grains usefulness as valuable multiple starter cultures to achieve bioactive gluten-free sourdoughs, *LWT*. 2022; 165: 113670. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113670>.

Patel SH, Tan JP, Börner RA, Zhang SJ, Priour S, Lima A, Ngom-Bru C, Cotter PD, Duboux S. A temporal view of the water kefir microbiota and flavour attributes, *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2022; 80. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103084>.

Pendón MD, Bengoa AA, Iraporda C, Medrano M, Garrote GL, Abraham AG. Water kefir: Factors affecting grain growth and health-promoting properties of the fermented beverage. *J Appl Microbiol*. 2022 Jul; v133(1):162-180.

Petrova P, Ivanov I, Tsigoriyna L, Valcheva N, Vasileva E, Parvanova-Mancheva T, Arsov A, Petrov K. Traditional Bulgarian dairy products: ethnic foods with health benefits. *Microorganisms* [Internet]. 25 fev 2021; 9(3):480. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030480>

Pimentel A., Neto F., Silva M., & Tecchio M.. Produção, qualidade e maturação da uva 'syrah' em condição subtropical do brasil. *Revista Brasileira De Engenharia De Biosistemas* 2019;13(1):72-79. <https://doi.org/10.18011/bioeng2019v13n1p72-79>

Queiroz YM, Maciel IA, dos Santos FS. Mecanismo de resistência da bactéria *Acinetobacter baumannii* e suas implicações no controle das infecções hospitalares. *RBAC*. 2022; 54(1):37-43.

Randazzo W, Corona O, Guarcello R, Francesca N, Germanà MA, Erten H, Moschetti G, Settanni L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiol*. 2016; 54:40-51. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.10.018>.

Rios DL, da Silva PCL, Moura CSS, Villanoeva CNBC, da Rocha Fernandes G, Bengoa AA, Garrote GL, Abraham AG, Nicoli JR, Neumann E, Nunes ÁC. Comparative metatranscriptome analysis of Brazilian milk and water kefir beverages. *Int Microbiol*. 28 Sep 2023.

Rodríguez MA, Fernández LA, Díaz ML, Pérez M, Corona M, Reynaldi FJ. Microbiological and chemical characterization of water kefir: An innovative source of potential probiotics for bee nutrition. *Rev Argent Microbiol* [Internet]. Dez 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.09.003>

Romero-Luna HE, Peredo-Lovillo A, Hernández-Mendoza A, Hernández-Sánchez H, Cauich-Sánchez PI, Ribas-Aparicio RM, Dávila-Ortiz G. Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 isolated from water kefir grains (Tibicos). *Curr Microbiol* [Internet]. 5 maio 2020; 77(10):2584-92. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02016-0>

Rufino, M. D. S. M. *et al.* Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comunicado Técnico. Pesq Agropec Bras*. 2007; 128:1-4.

Seguí L, Calabuig-Jiménez L, Betoret N, Fito P. Physicochemical and antioxidant properties of non-refined sugarcane alternatives to white sugar. *Int J Food Sci Technol*. 2015; 50: 2579-2588. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12926>

Seyedeh MJ, Shiadeh AP, Hashemi A, Lak P. Global prevalence of antibiotic resistance in blood-isolated *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*: a systematic review and meta-analysis. *Infec Drug Resist*. 2019; 12:2713-2725.

Silveira, A. *et al.* Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. *Comunicado Técnico. Pesq Agropec Bras*. 2018; 421:1-11.

Talib N, Mohamad NE, Yeap SK, Hussin Y, Aziz MNM, Masarudin MJ, Sharifuddin SA, Hui YW, Ho CL, Alitheen NB. Isolation and characterization of *Lactobacillus* spp. from kefir samples in Malaysia. *Molecules*. 2019 Jul 17; 24(14):2606.

Tan LL, Tan CH, Ng NK, Tan YH, Conway PL, Loo SC. Potential probiotic strains from milk and water kefir grains in Singapore - use for defense against enteric bacterial pathogens. *Front Microbiol* [Internet]. 1 abr 2022; 13. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.857720>

Tavares PP, Mamona CT, Nascimento RQ, dos Anjos EA, de Souza CO, Almeida RC, Mamede ME, Magalhães-Guedes KT. Non-conventional sucrose-based substrates: development of non-dairy kefir beverages with probiotic potential. *Fermentation* [Internet]. 17 abr 2023; 9(4):384. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9040384>

Thi MT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci* [Internet]. 17 nov 2020; 21(22):8671. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

Ward V. The ginger-beer plant, and the organisms composing it: a contribution to the study of fermentation-yeasts and bacteria. *Philos Trans R Soc Lond (B)* [Internet]. 31 dez 1892; 183:125-97. Disponível em: <https://doi.org/10.1098/rstb.1892.0006>.

Wilches-López L, Correa-Espinal A, Pérez-Monterroza EJ, Rojas LF. Metataxonomic and metabolic evaluation of three water kefir microbiomes cultured in sugar cane juice. *J Food Process Engin*. 2023, 46(11):e14281. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpe.14281>.

Valgas C, Souza SM de, Smânia EFA, Smânia Jr. A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2007 Apr; 38(2):369–80. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.

Velázquez-Quiñones SE, Moreno-Jiménez MR, Gallegos-Infante JA, et al. Apple Tepache fermented with tibicos: Changes in chemical profiles, antioxidant activity and inhibition of digestive enzymes. *J Food Process Preserv*. 2021; 45:e15597. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15597>.

Verce M, De Vuyst L, Weckx S. Shotgun metagenomics of a water kefir fermentation ecosystem reveals a novel *Oenococcus* species. *Front Microbiol* [Internet]. 13 mar 2019; 10. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00479>

Hata N. , Surek M. , Sartori D. , Serrato R. , & Spinosa W.. Role of acetic acid bacteria in food and beverages. *Food Technology and Biotechnology* 2022;61(1):85-103. <https://doi.org/10.17113/ftb.61.01.23.7811>

Zamberi NR, Abu N, Mohamed NE, Nordin N, Keong YS, Beh BK, Zakaria ZA, Nik Abdul Rahman NM, Alitheen NB. The antimetastatic and antiangiogenesis effects of kefir water on murine breast cancer cells. *Integr Cancer Ther*. 2016 Dec; 15(4):NP53-NP66.

Zannini E, Lynch KM, Nyhan L, Sahin AW, O' Riordan P, Luk D, Arendt EK. Influence of substrate on the fermentation characteristics and culture-dependent microbial composition of water kefir. *Fermentation*. 2023; 9(1):28. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation9010028>

Zanirati DF, Abatemarco M, Sandes SH, Nicoli JR, Nunes AC, Neumann E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe* [Internet]. Abr 2015; 32:70-6. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.12.007>

Zidan D, Azlan A. Non-Centrifugal Sugar (NCS) and Health: A Review on Functional Components and Health Benefits. *Appl Sci* [Internet]. 4 jan 2022; 12(1):460. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/app12010460>

APÊNDICE

-

Apêndice A - Curva padrão para ADNS

Água (mL)	Glicose (mL)	ADNS (mL)		Absorbância (540 nm)
0,8	0,2	2	0,162	0,100
0,6	0,4	2	0,270	0,416
0,4	0,6	2	0,432	0,945
0,2	0,8	2	0,540	1,308

Fonte: elaboração própria (2023).

Apêndice B - Curva padrão de compostos fenólicos

Solução de Ácido gálico (µL)	Água destilada (µL)	Concentração Final (mg)	Absorbância (760 nm)
200	8300	0,02	0,208
400	8100	0,04	0,429
600	7900	0,06	0,631
800	7700	0,08	0,832
1000	7500	0,10	1,049

Fonte: elaboração própria (2023)

Apêndice C - Curva padrão para DPPH

Solução Trolox 2mM. (µL)	Álcool etílico (µL)	Concentração Final (µM)	Absorbância (517 nm)
			0,910
50	950	100	0,900
100	900	200	0,844
200	800	400	0,730
300	700	600	0,623
400	600	800	0,501
500	500	1000	0,371

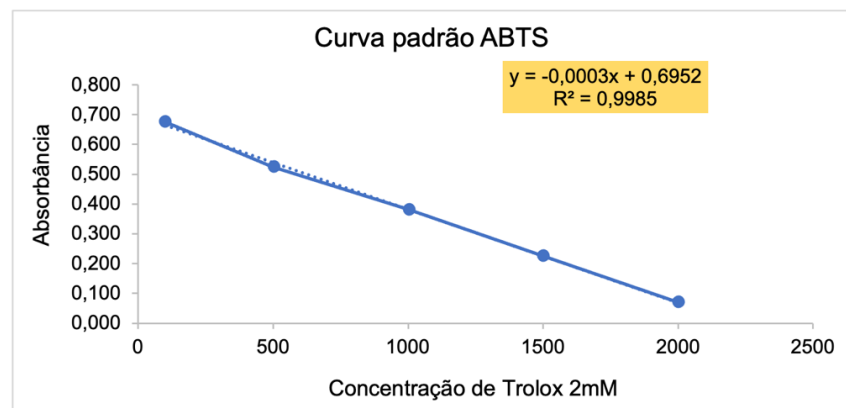
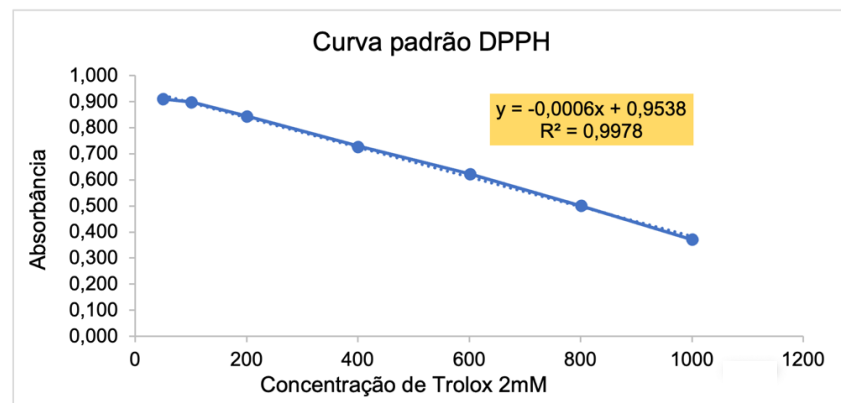
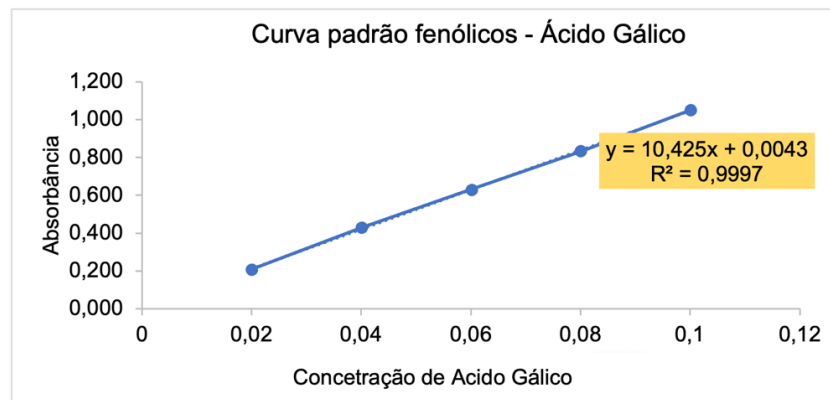
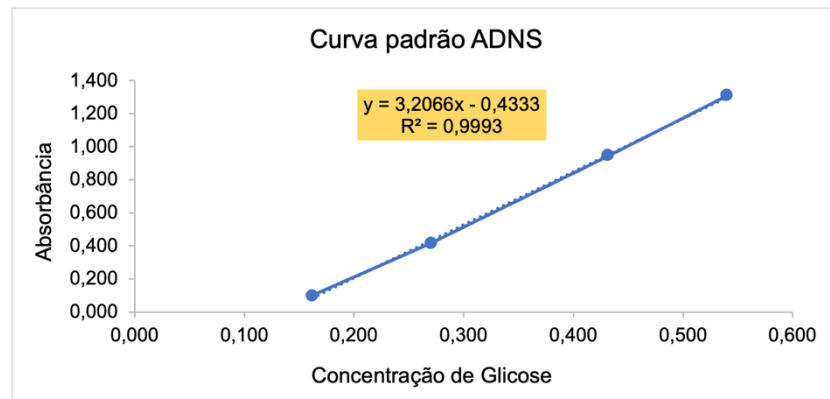
Fonte: elaboração própria (2023)

Apêndice D - Curva padrão para ABTS

Solução Trolox 2mM (mL)	Álcool etílico (mL)	Concentração Final (µM)	Trolox (30 µL) + ABTS (3000µL) Absorbância (734 nm)
50	950	100	0,675
250	800	400	0,524
500	650	700	0,382
750	500	1000	0,225
1000	350	1300	0,071

Fonte: elaboração própria (2023)

Apêndice E - Gráficos de curvas padrões de ADNS, Fenólicos, DPPH e ABTS



Fonte: Elaboração própria (2023)

Apêndice F - Valores de média e desvio padrão da taxa de crescimento dos grãos de kefir fermentados em concentração de açúcar a 5 °Brix e temperaturas de 25 e 30 °C por 24 e 48 h

		Peso dos Grãos (g)					Taxa de Crescimento dos Grãos (%)				
		0 h		24 h		48 h		24 h		48 h	
		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP		Média ± DP	
25 °C	M	10,00	11,33	0,15	12,68	0,17	13 %	0,2	14 %	0,2	
	D	10,00	10,45	0,07	12,66	0,09	5 %	0,0	22 %	0,2	
	C	10,00	11,13	0,14	12,55	0,21	11 %	0,1	14 %	0,2	
30 °C	M	10,00	14,05	0,44	18,56	0,32	41 %	1,3	45 %	0,8	
	D	10,00	13,76	0,37	17,39	0,72	38 %	1,0	36 %	1,5	
	C	10,00	14,54	0,19	17,66	0,63	45 %	0,6	31 %	1,1	

Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos como média e desvio padrão de análises em triplicata. M= açúcar mascavo. D= açúcar demerara. C= açúcar cristal.

Apêndice G - Valores de média e desvio padrão da taxa de crescimento dos grãos de kefir fermentados a 30 °C em concentrações de açúcar de 5 e 10 °Brix por 24 e 48 h

		Peso dos Grãos (g)				Taxa de Crescimento dos Grãos (%)				
		24 h		48 h		24 h		48 h		
		Média±DP		Média±DP		Média±DP		Média±DP		
5°Brix	M	10,00	14,05	0,44	18,56	0,32	41 %	1,3	45 %	1,0
	D	10,00	13,76	0,37	17,39	0,72	38 %	1,0	36 %	2,0
	C	10,00	14,54	0,19	17,66	0,63	45 %	0,6	31 %	1,0
10°Brix	M	10,00	10,52	0,34	13,06	0,22	5 %	0,2	25 %	0,0
	D	10,00	11,18	1,61	10,87	0,65	12 %	1,7	-3 %	0,0
	C	10,00	12,08	1,73	10,68	0,31	21 %	3,0	-14 %	0,0

Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos como média e desvio padrão de análises em triplicata. M= açúcar mascavo. D= açúcar demerara. C= açúcar cristal.

Apêndice H - Valores de média e desvio padrão da acidez total (g.L-1) das amostras de kefir de água

Amostras	° Brix	24 h			48 h		
		Média	DP	p<0,05	Média	DP	p<0,05
KM	5	0,18	0,01	a	0,47	0,01	a
KD		0,10	0,01	b	0,20	0,00	b
KC		0,09	0,00	b	0,24	0,01	c
KM	10	0,11	0,00	c, b	0,50	0,02	d
KD		0,08	0,01	d, b	0,12	0,01	e
KC		0,06	0,01	d	0,10	0,01	e

Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos como média e desvio padrão de análises em triplicata. KM= kefir com açúcar mascavo. KD= kefir com açúcar demerara. KC= kefir com açúcar cristal. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a p<0,05 de acordo com o teste de Tukey

Apêndice I - Valores de média e desvio padrão do pH das amostras de kefir de água

Amostras	°Brix	0 h		24 h		p<0,05	48 h		p<0,05
		Média	DP	Média	DP		Média	DP	
KM	5	6,26	0,15	3,63	0,02	a	3,70	0,04	a
KD		6,57	0,13	3,13	0,04	b	2,84	0,12	b
KC		6,52	0,10	3,12	0,03	b	2,77	0,03	b
KM	10	6,36	0,06	3,47	0,12	ac	2,75	0,04	b
KD		6,62	0,03	3,81	0,05	ac	3,06	0,06	c
KC		6,60	0,05	3,75	0,09	ac	3,06	0,07	c

Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos como média e desvio padrão de análises em triplicata. KM= Kefir com açúcar mascavo. KD= Kefir com açúcar demerara. KC= Kefir com açúcar cristal. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a p<0,05 de acordo com o teste de Tukey.

Apêndice J - Valores de média e desvio padrão do teor dos sólidos solúveis totais (°Brix) das amostras de kefir de água

		5°Brix			10°Brix		
		Média	DP	p<0,05	Média	DP	p<0,05
	0 h	5,00	0,00	a	10,00	0,00	a
KM	24 h	4,46	0,23	b	7,53	0,30	b, f
KD	24 h	4,53	0,11	b	8,30	0,17	c, d
KC	24 h	4,20	0,10	b, c	8,40	0,10	d
KM	48 h	4,03	0,15	c, d	6,26	0,11	e
KD	48 h	3,73	0,05	d, e	7,83	0,05	f
KC	48 h	3,43	0,11	e	7,66	0,05	f

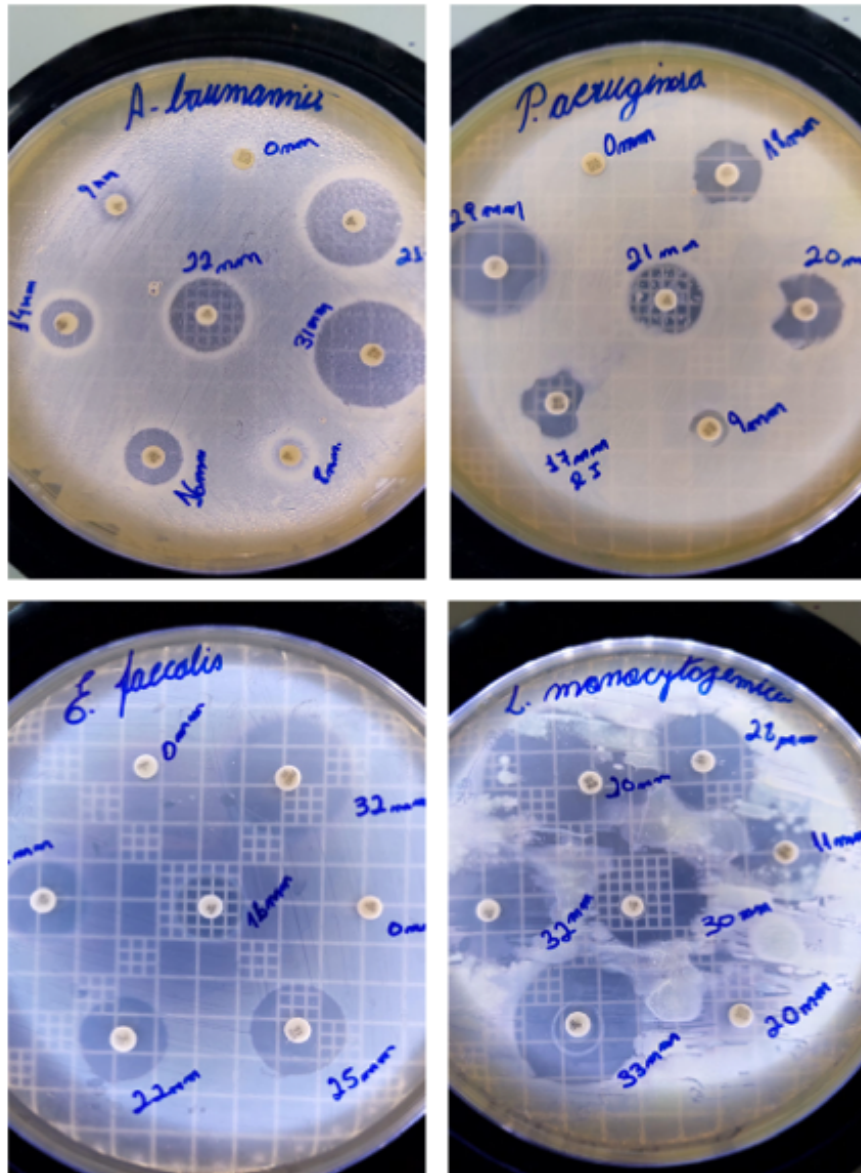
Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos como média e desvio padrão de análises em triplicata. KM= Kefir com açúcar mascavo. KD= Kefir com açúcar demerara. KC= Kefir com açúcar cristal. As médias na mesma coluna com letras diferentes são significativamente diferentes a p<0,05 de acordo com o teste de Tukey.

Apêndice L - Valores de média e desvio padrão de açúcares redutores, sacarose e açúcares totais do kefir de água fermentado com açúcar mascavo por 24 e 48 h

Açúcares	24 h	48 h
	%	%
Açúcares redutores	0,67±0,02	1,48±0,07
Sacarose	6,50±0,17	2,18±0,10
Açúcares Totais	7,15±0,15	3,72±0,12

Fonte: elaboração própria (2023). Valores descritos como média e desvio padrão de análises em triplicata. M= açúcar mascavo. D= açúcar demerara. C= açúcar cristal.

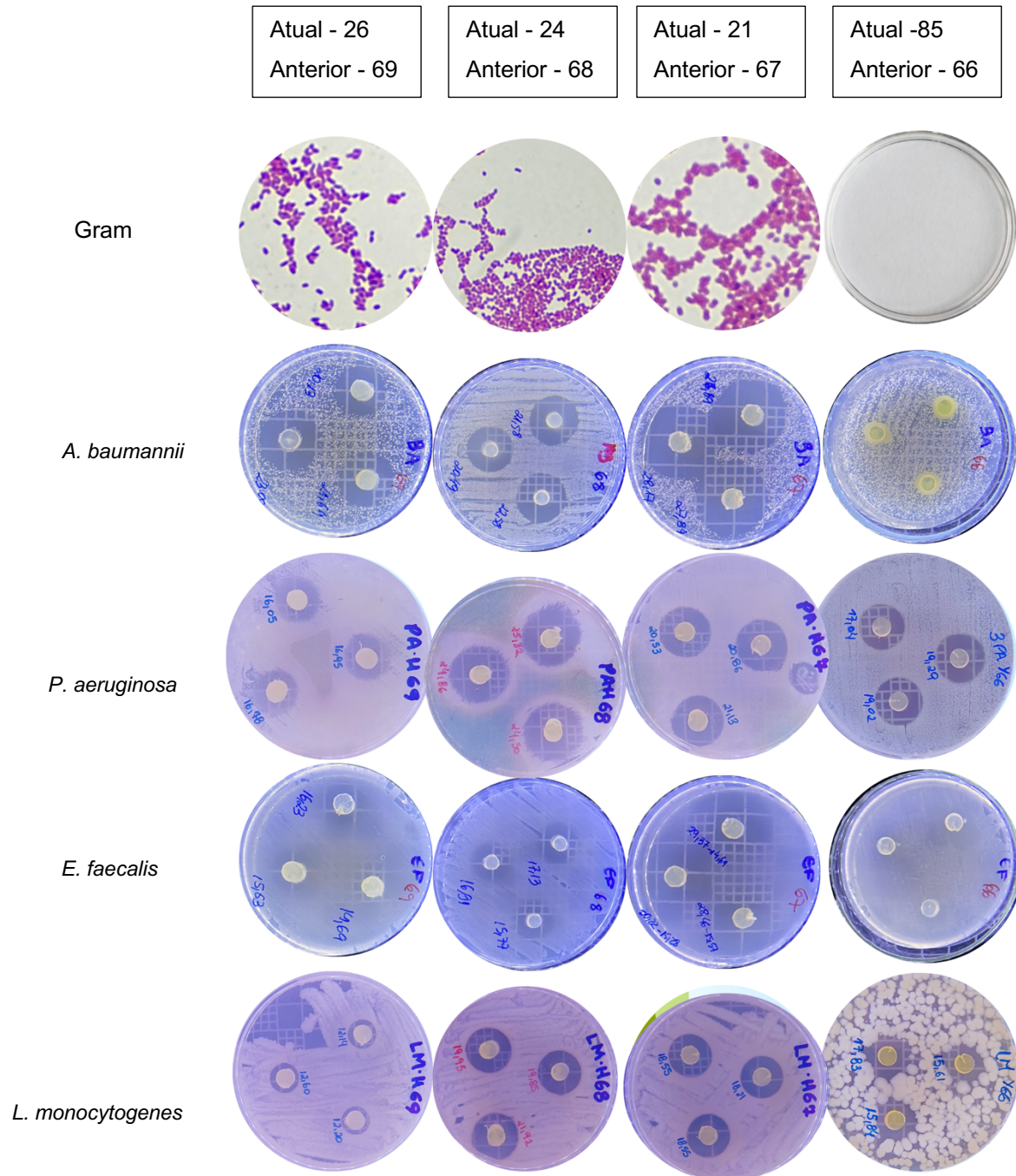
Apêndice M - Antibiograma das bactérias patogênicas: *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299 e *Listeria monocytogenes* ATCC 7644



Elaboração própria (2023)

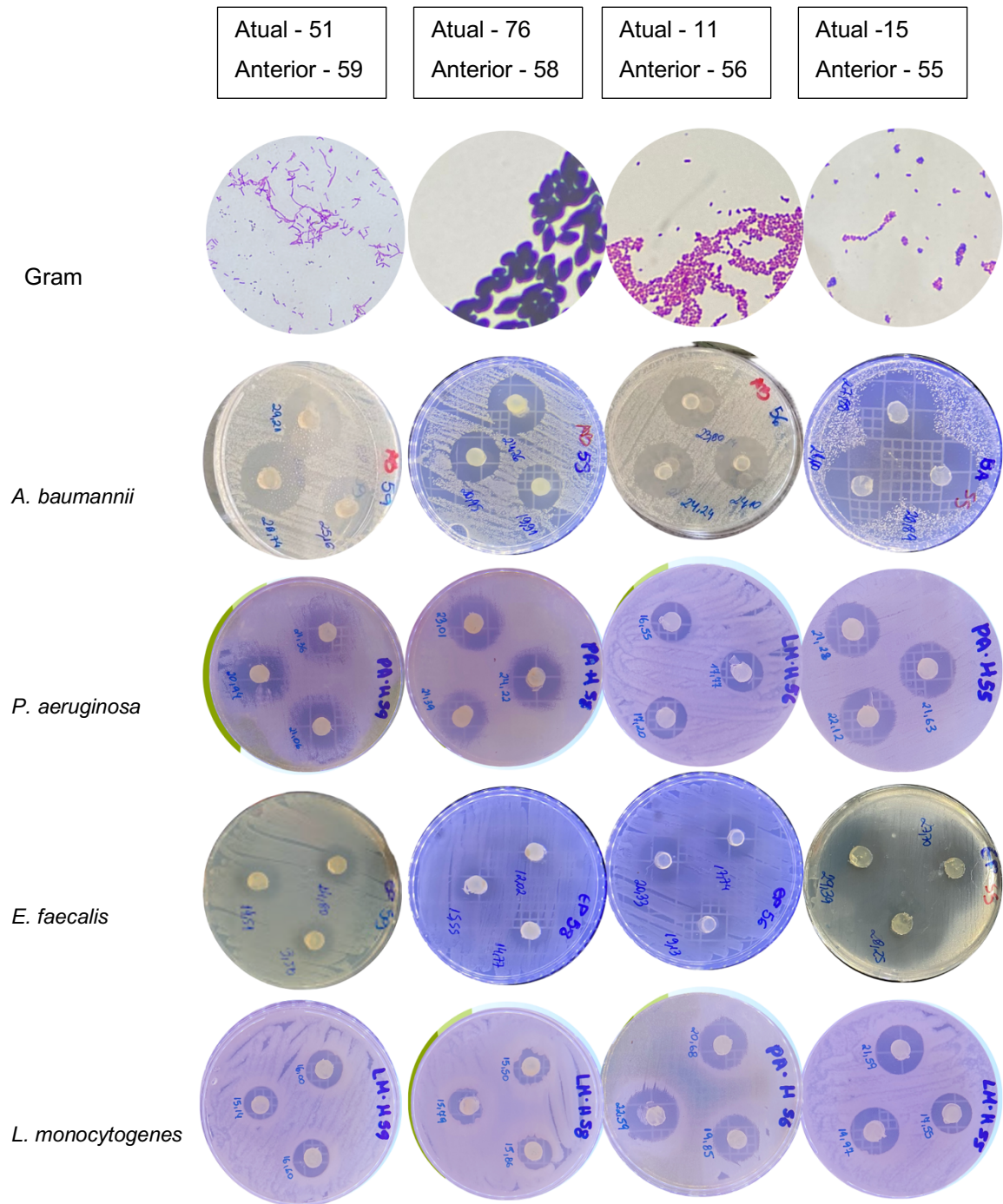
Apêndice N - Imagens dos resultados do teste de inibição dos microrganismos isolados do kefir de água frente a cepas patogênicas

Ilustração 1



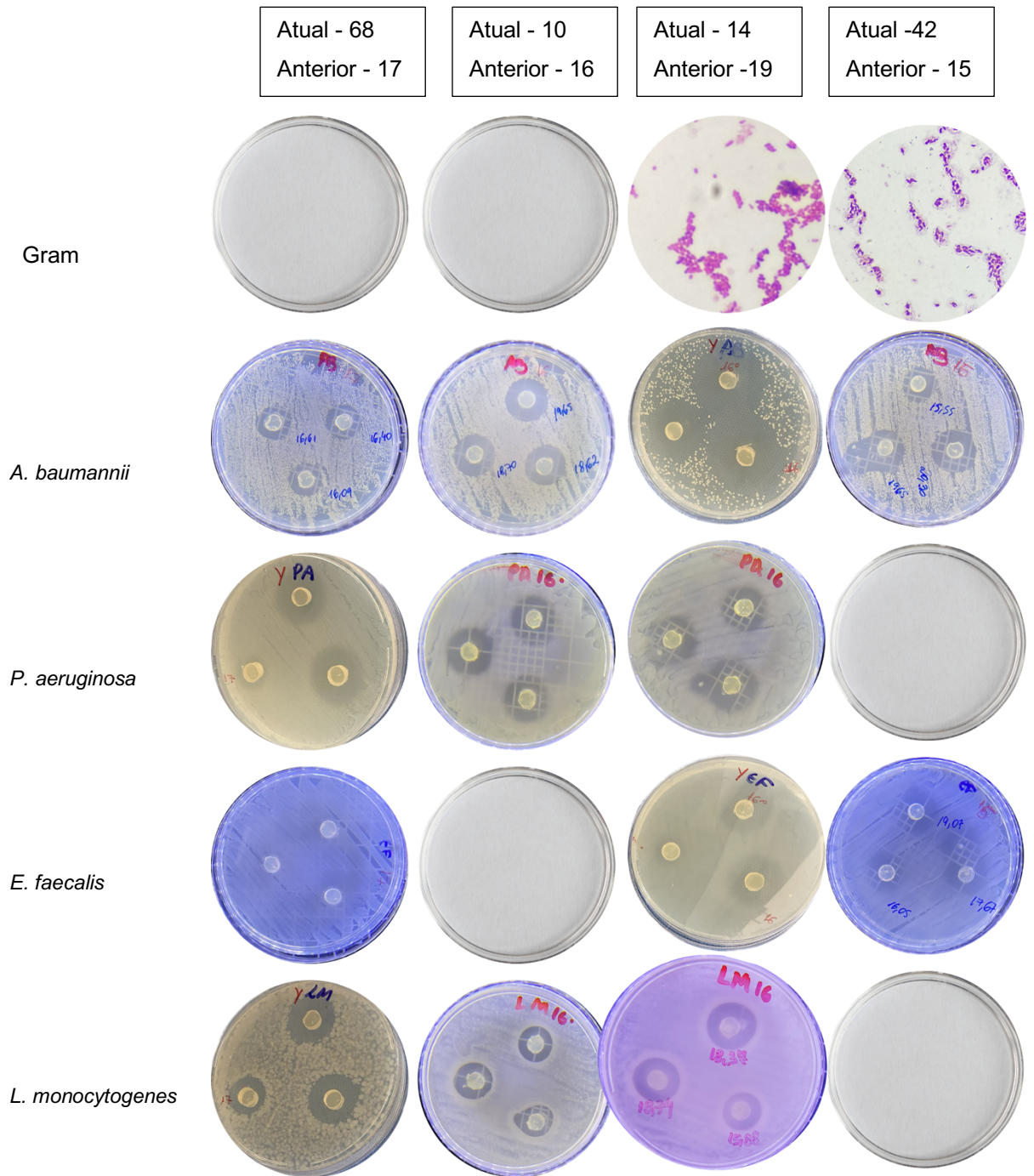
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 2



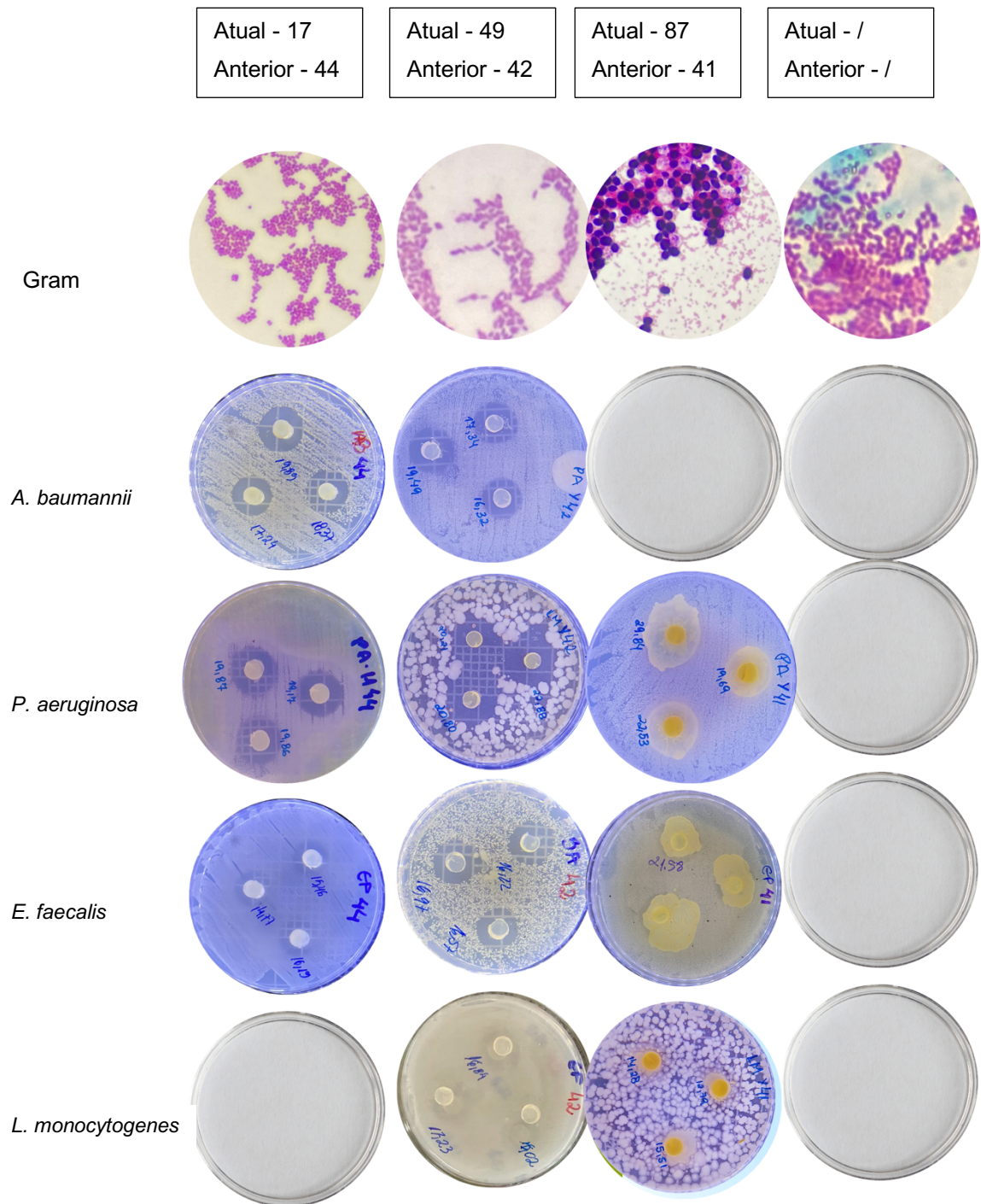
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 3



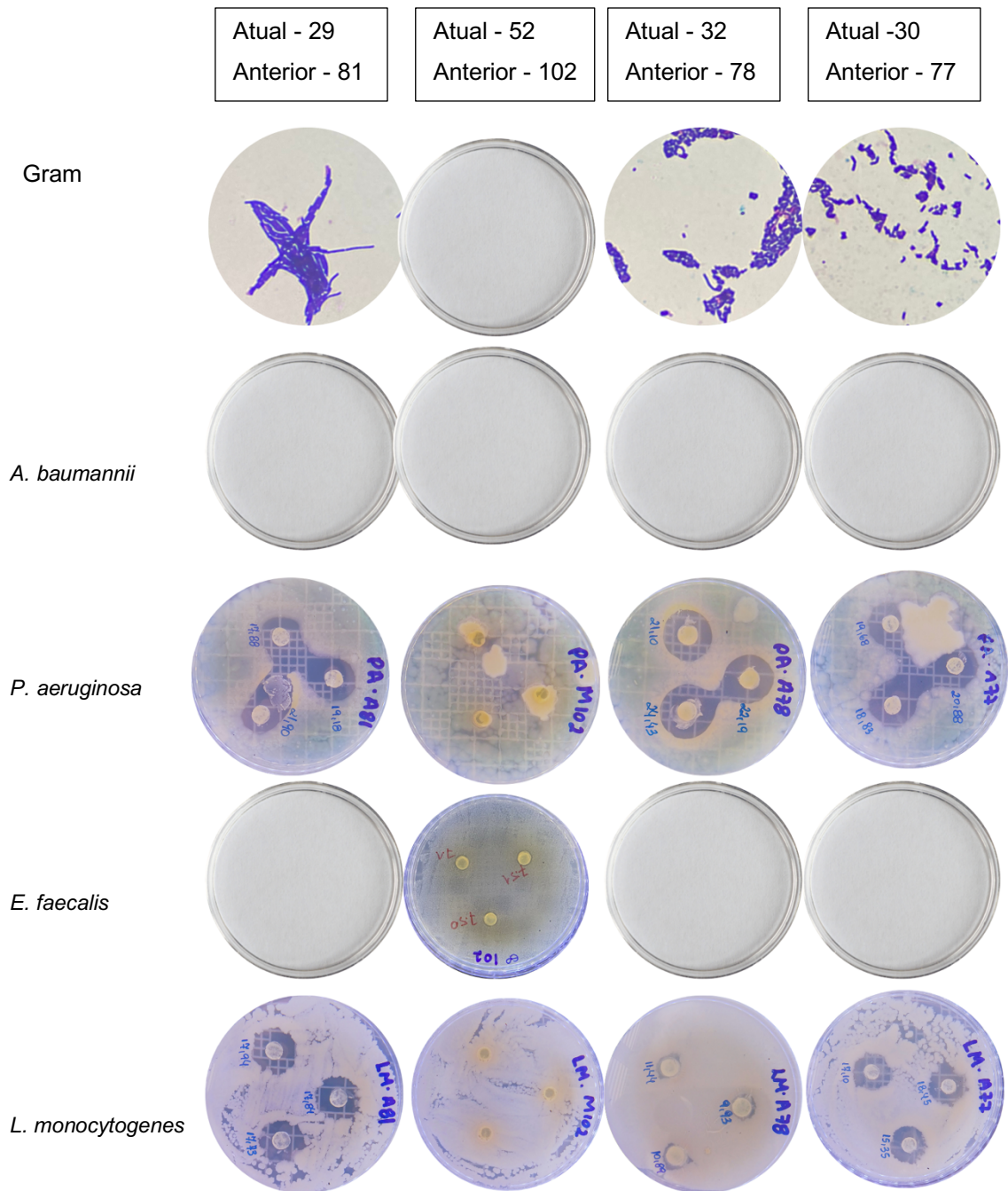
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 4



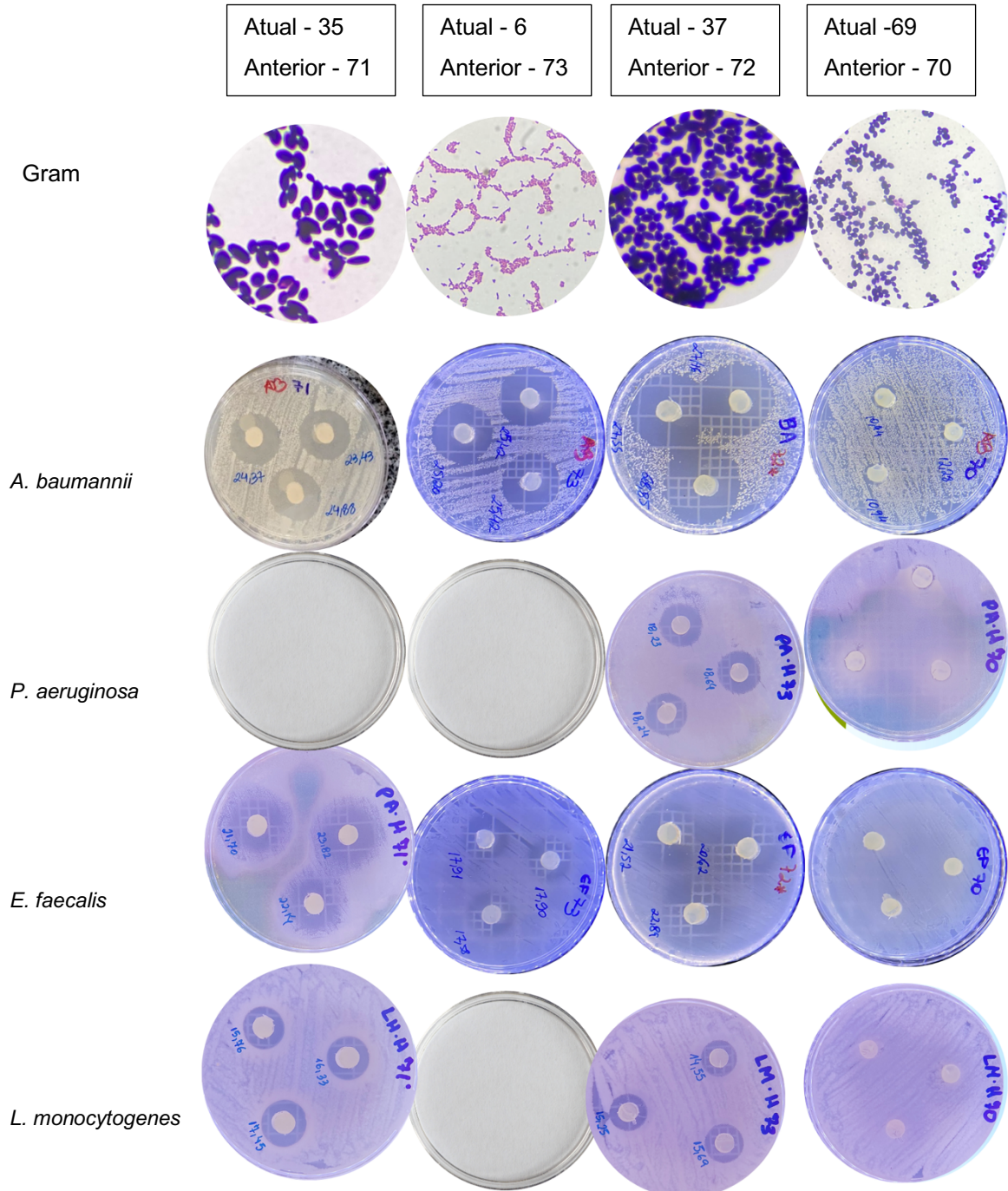
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 5



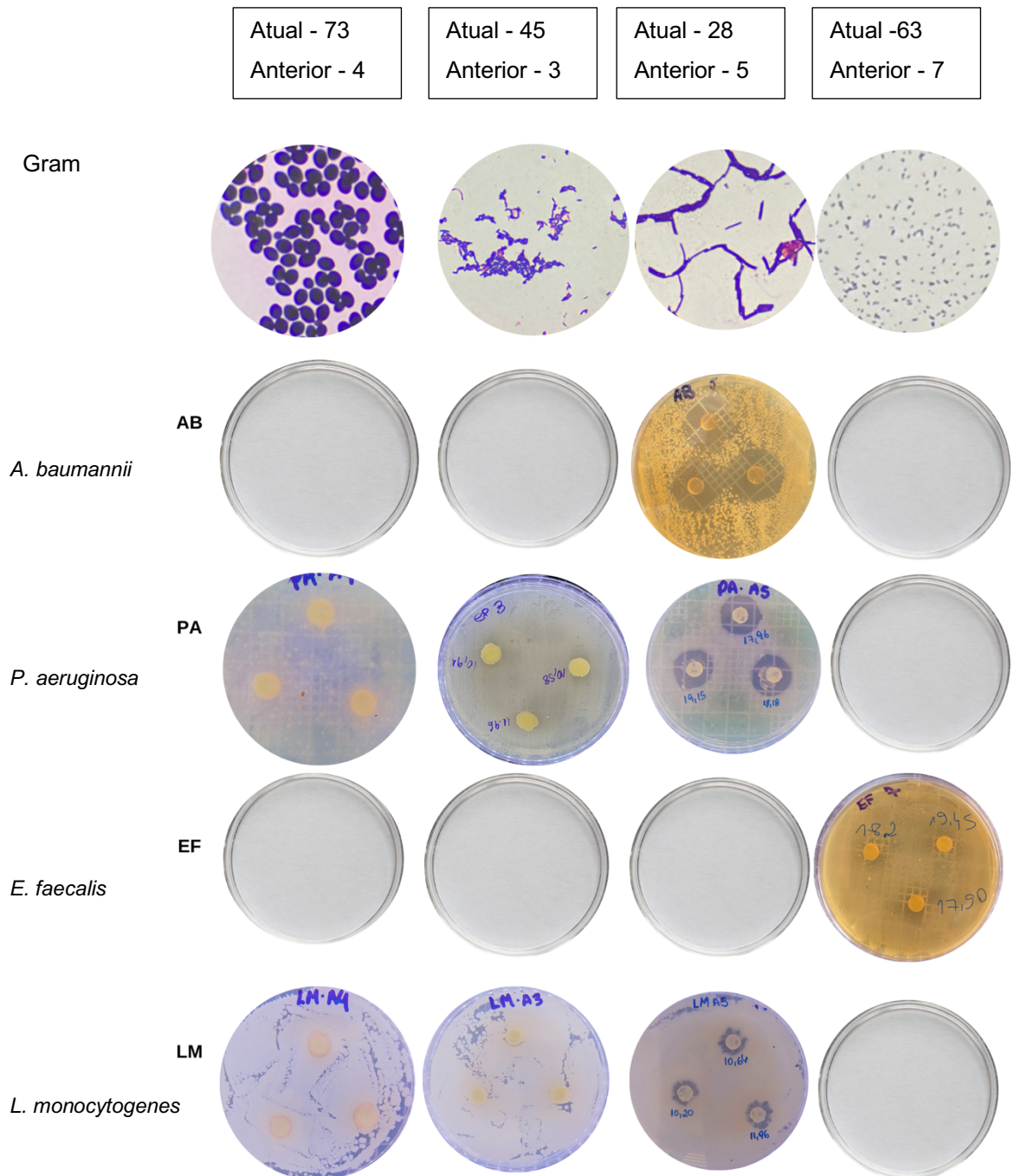
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 6



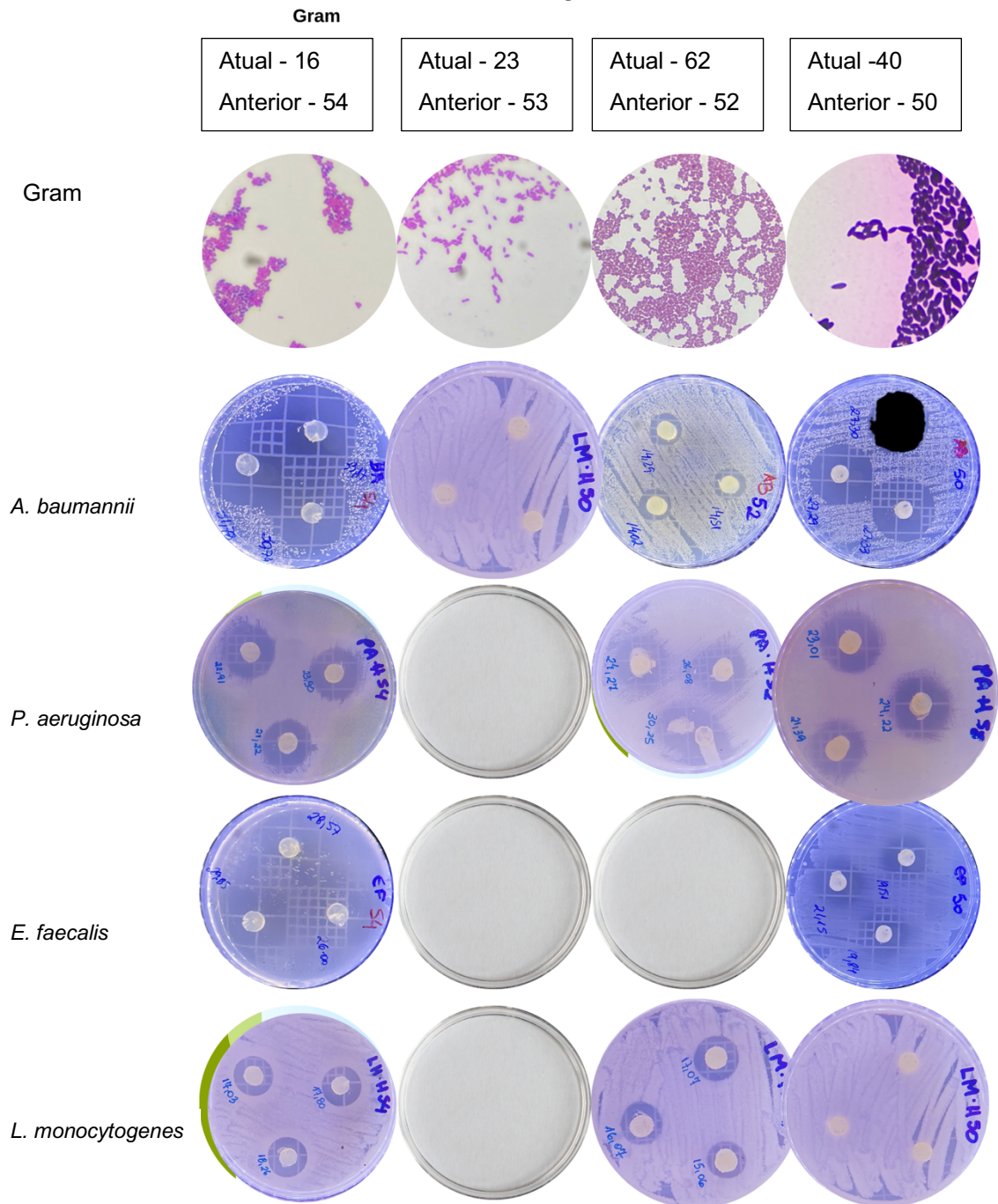
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 7



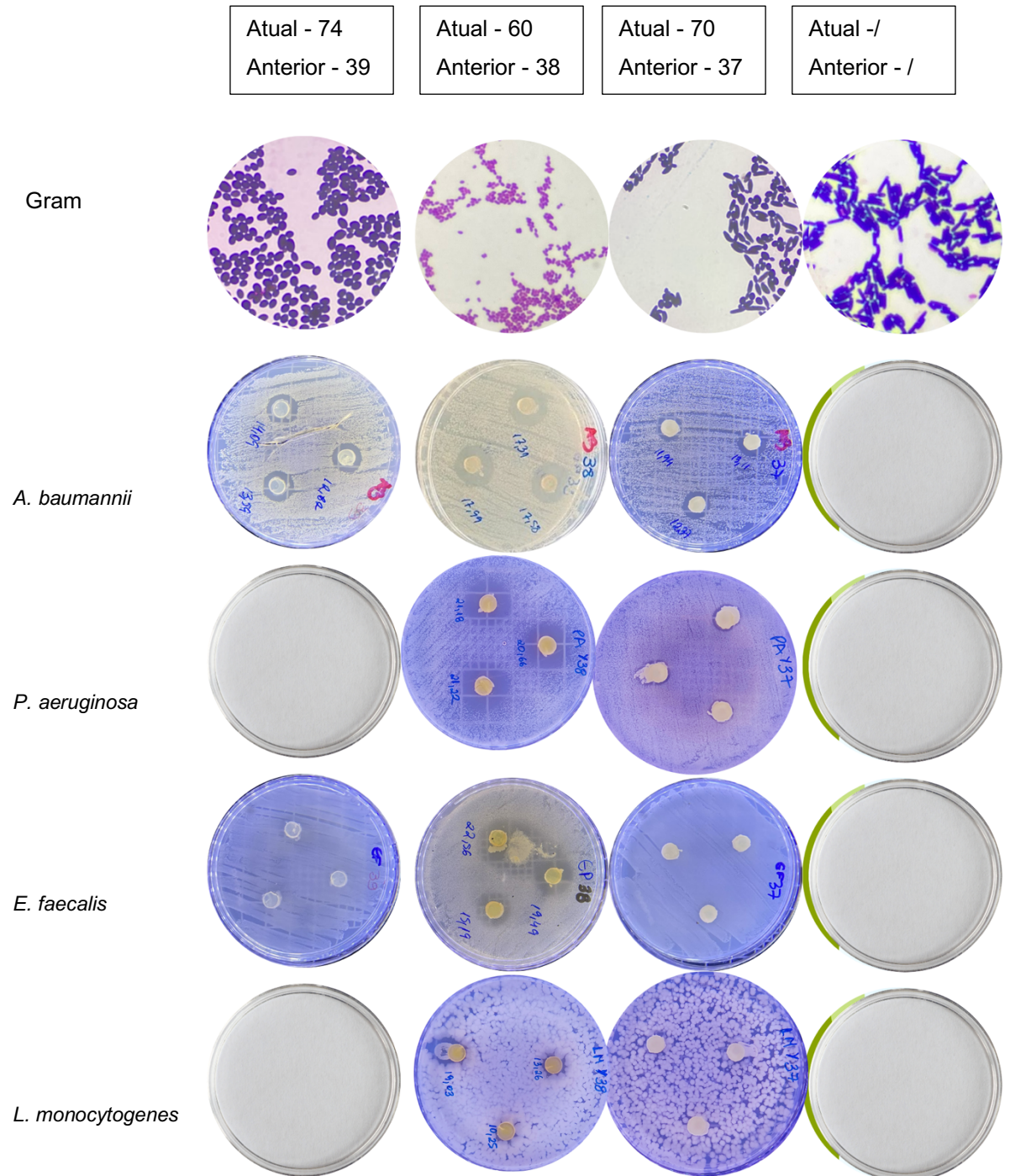
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 8



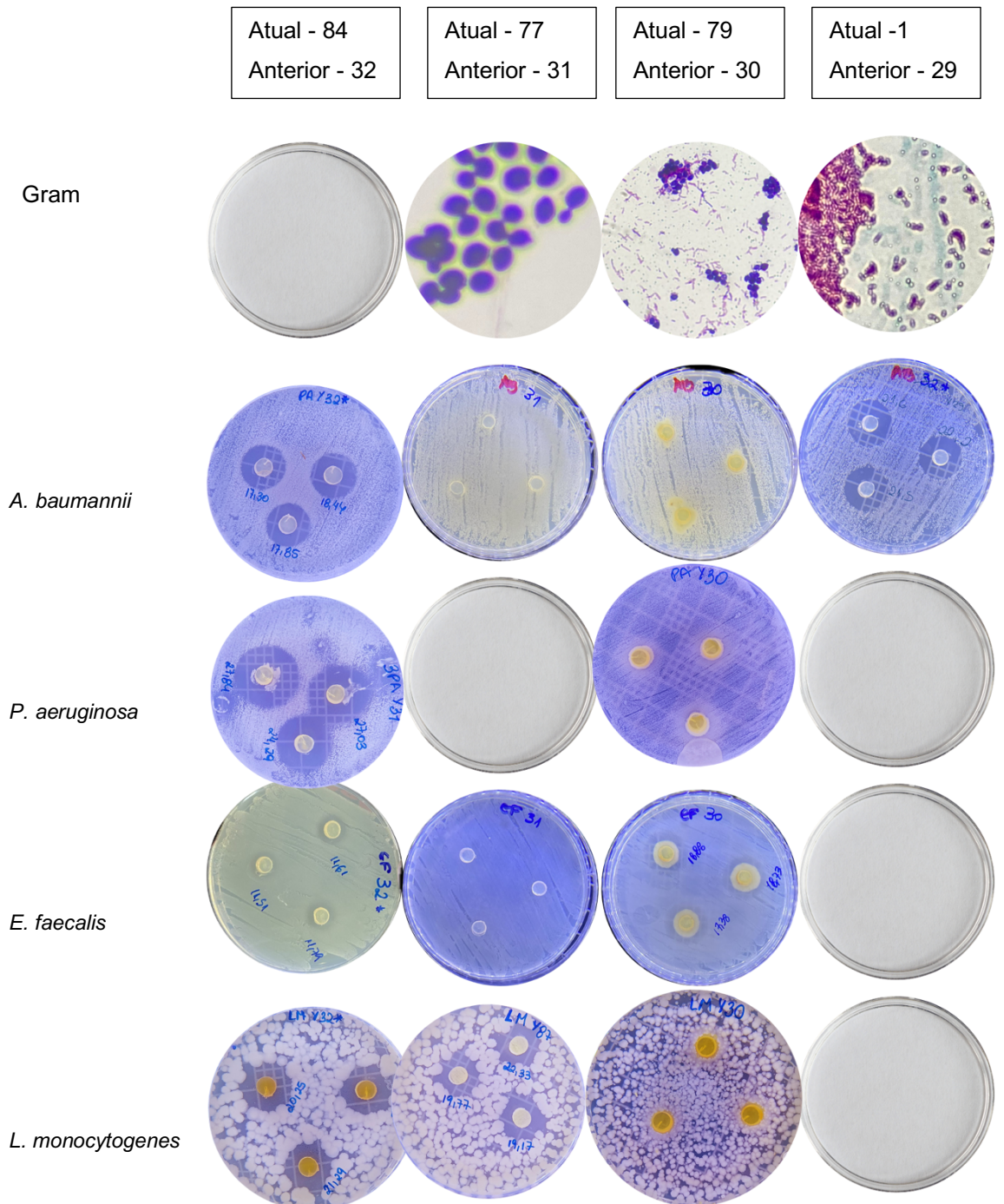
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 9



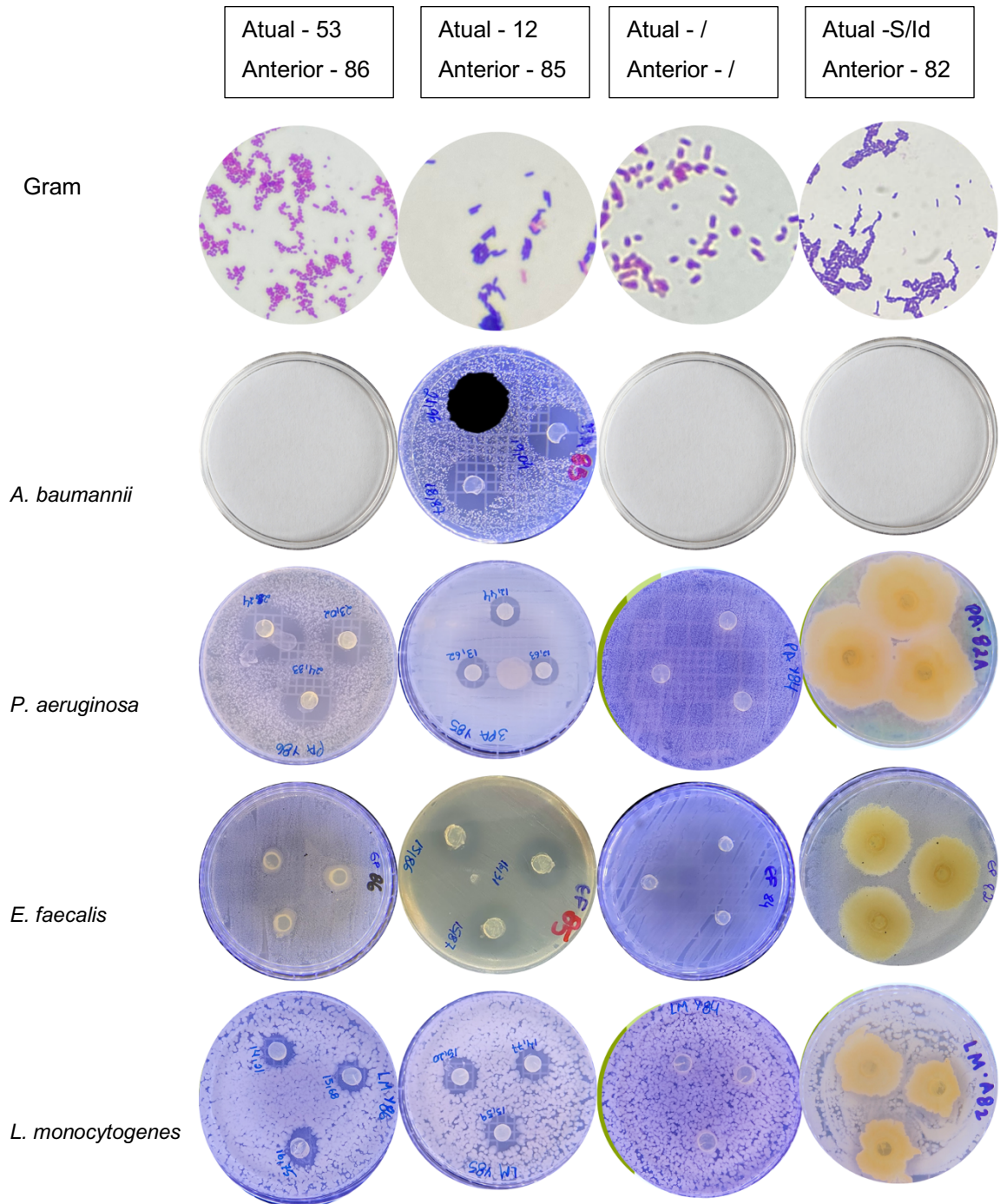
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 10



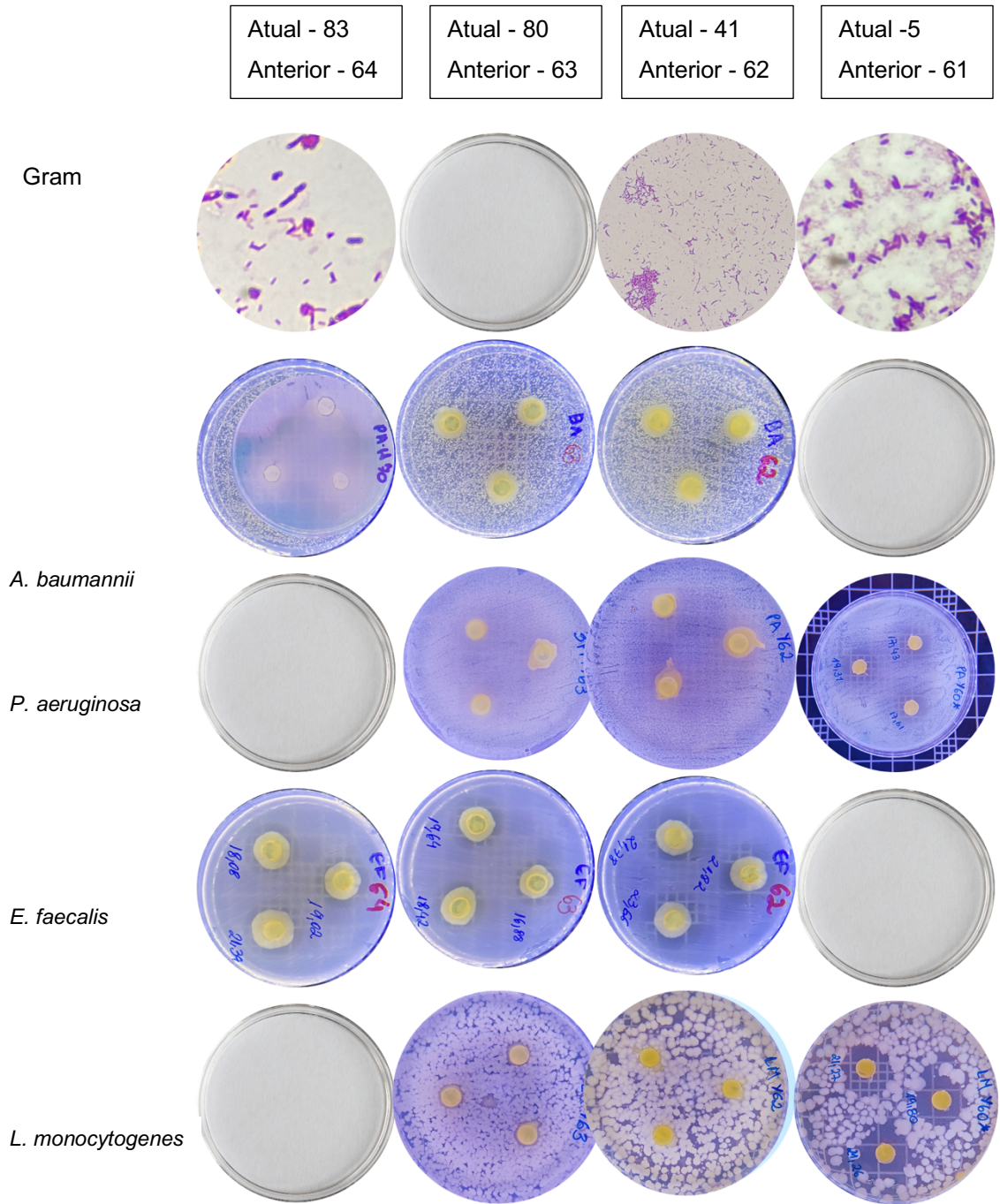
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 11



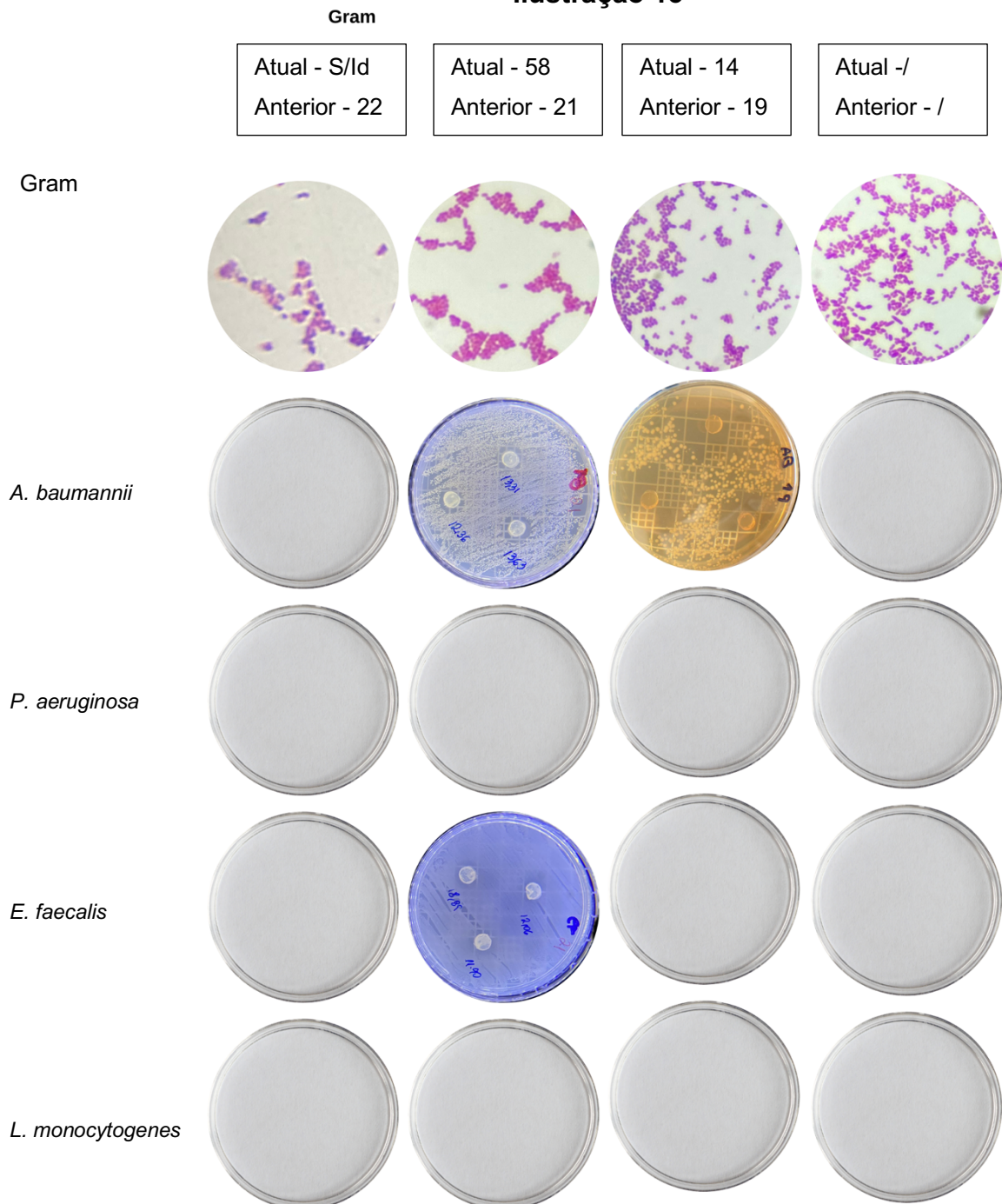
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 12



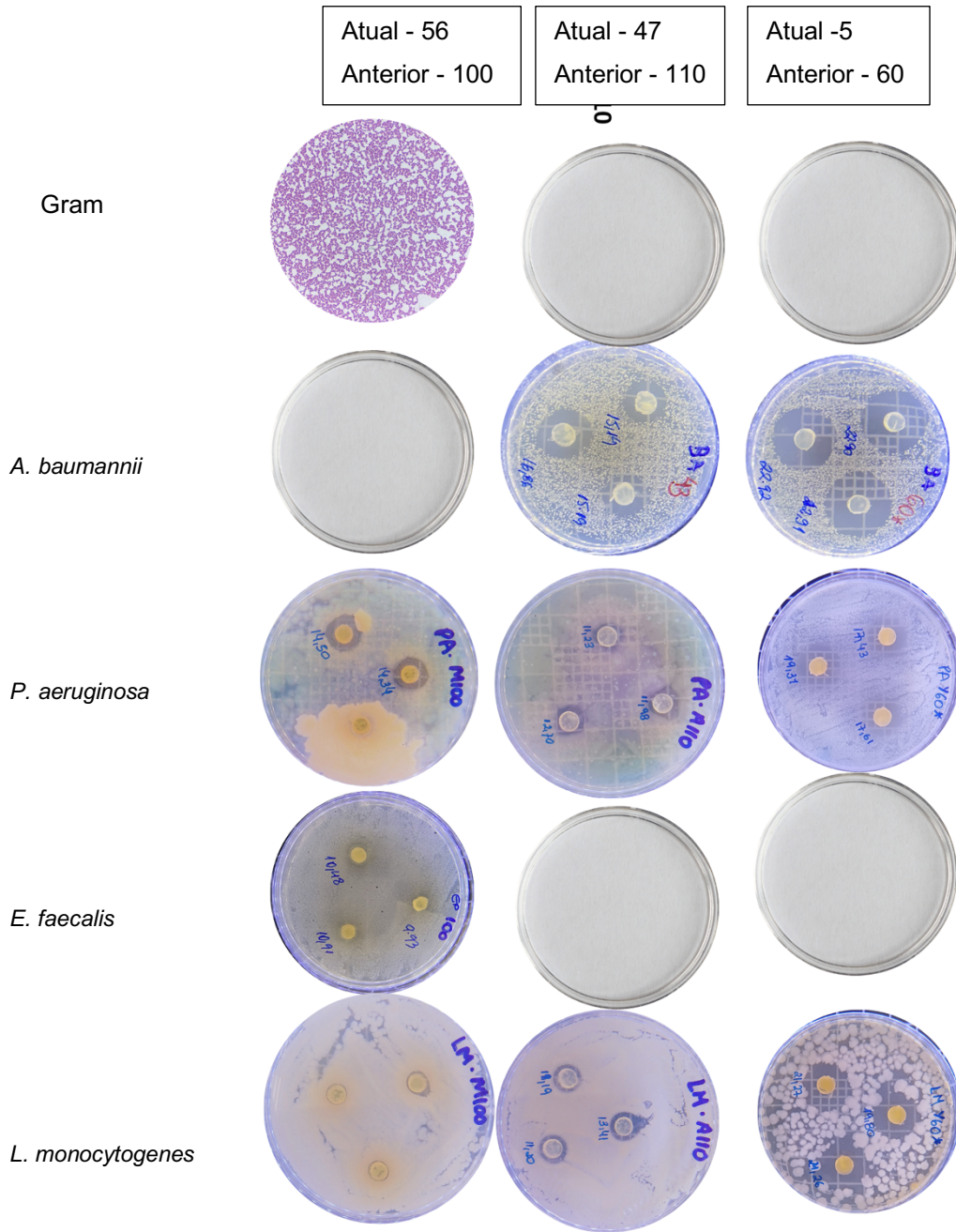
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 13



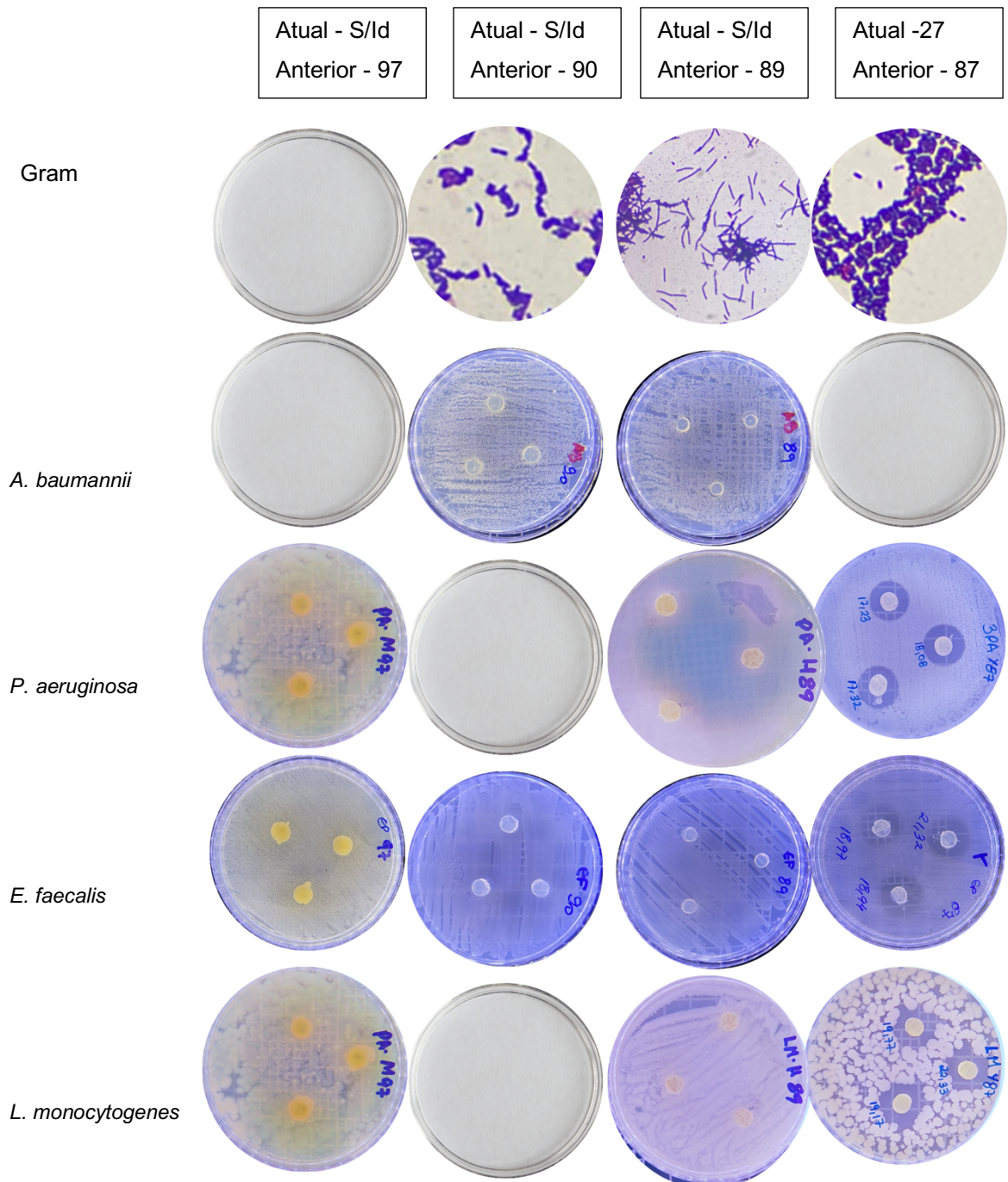
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 14



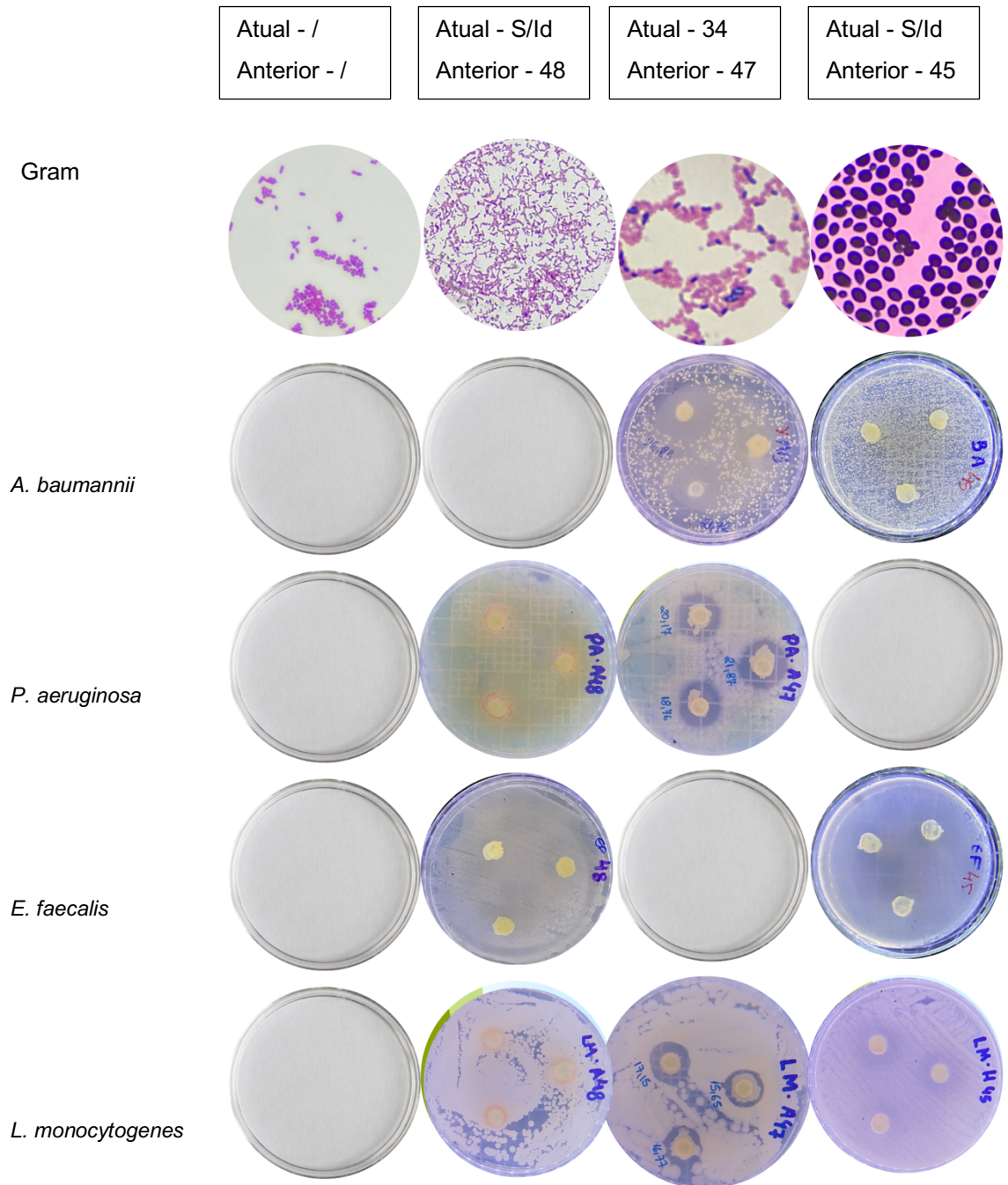
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 15



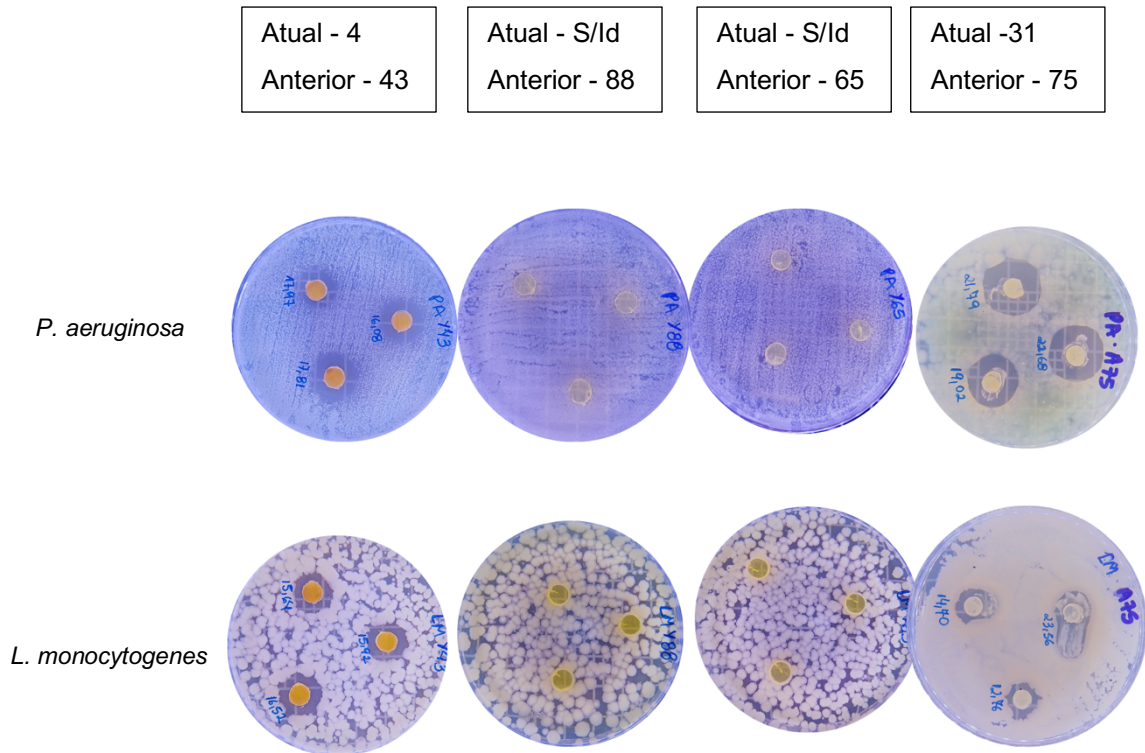
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 16



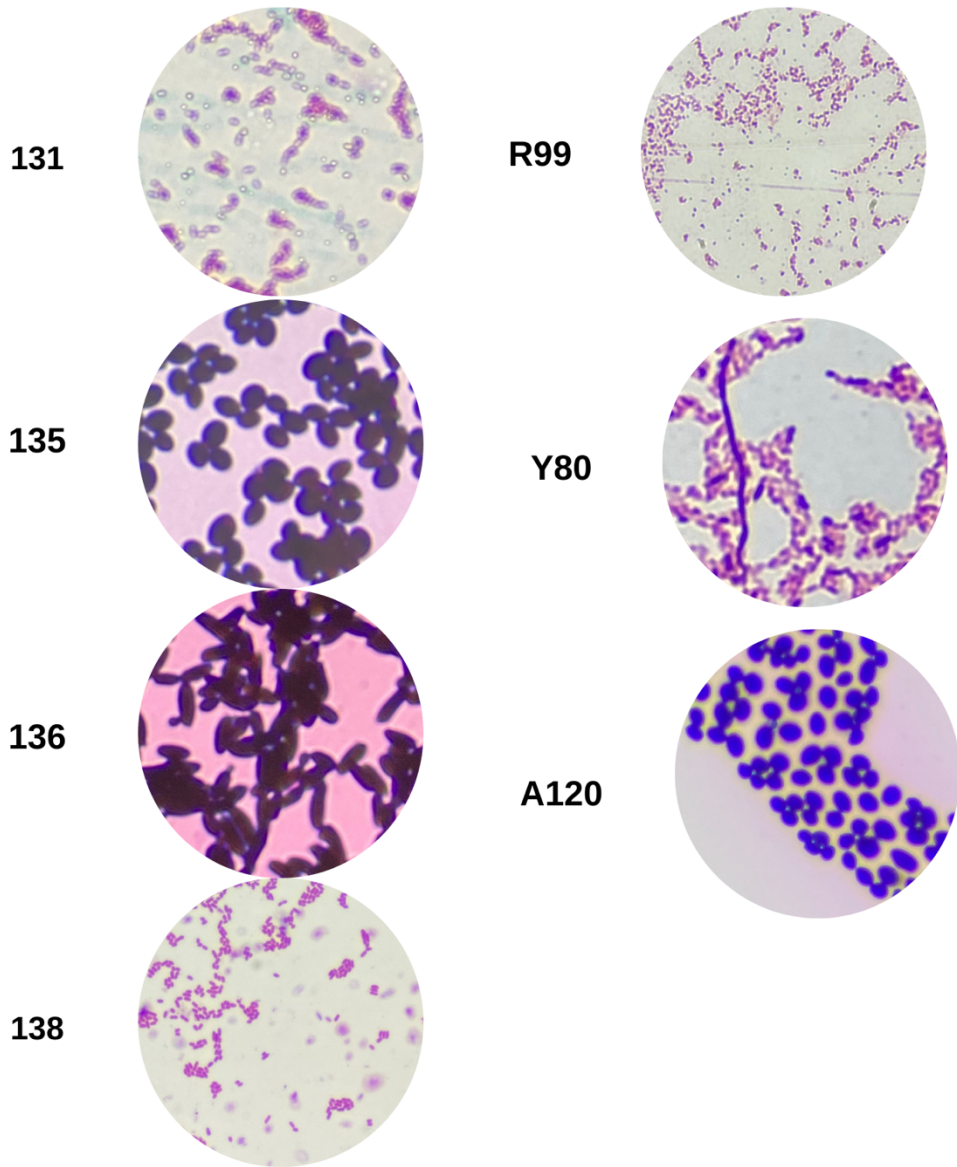
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 17



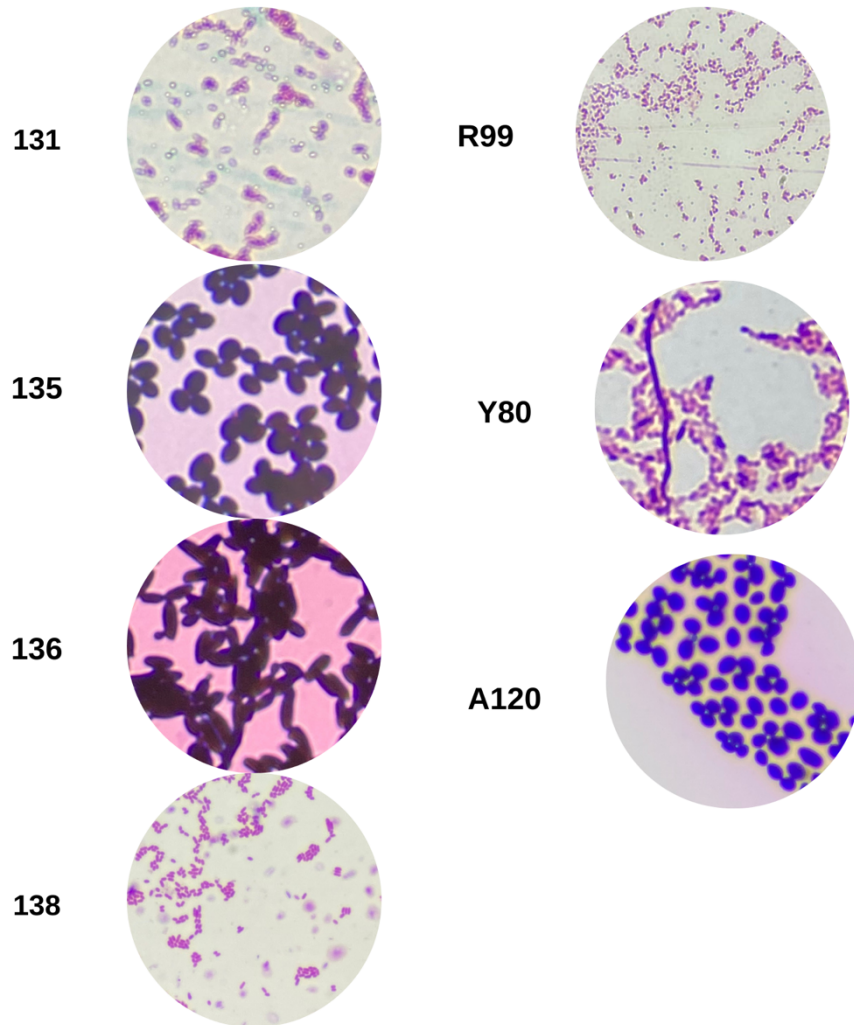
Fonte: Elaboração própria (2023). Zonas claras ao redor dos discos de ágar contendo os microrganismos isolados do kefir representam zona de inibição contra as bactérias patogênicas.

Ilustração 18

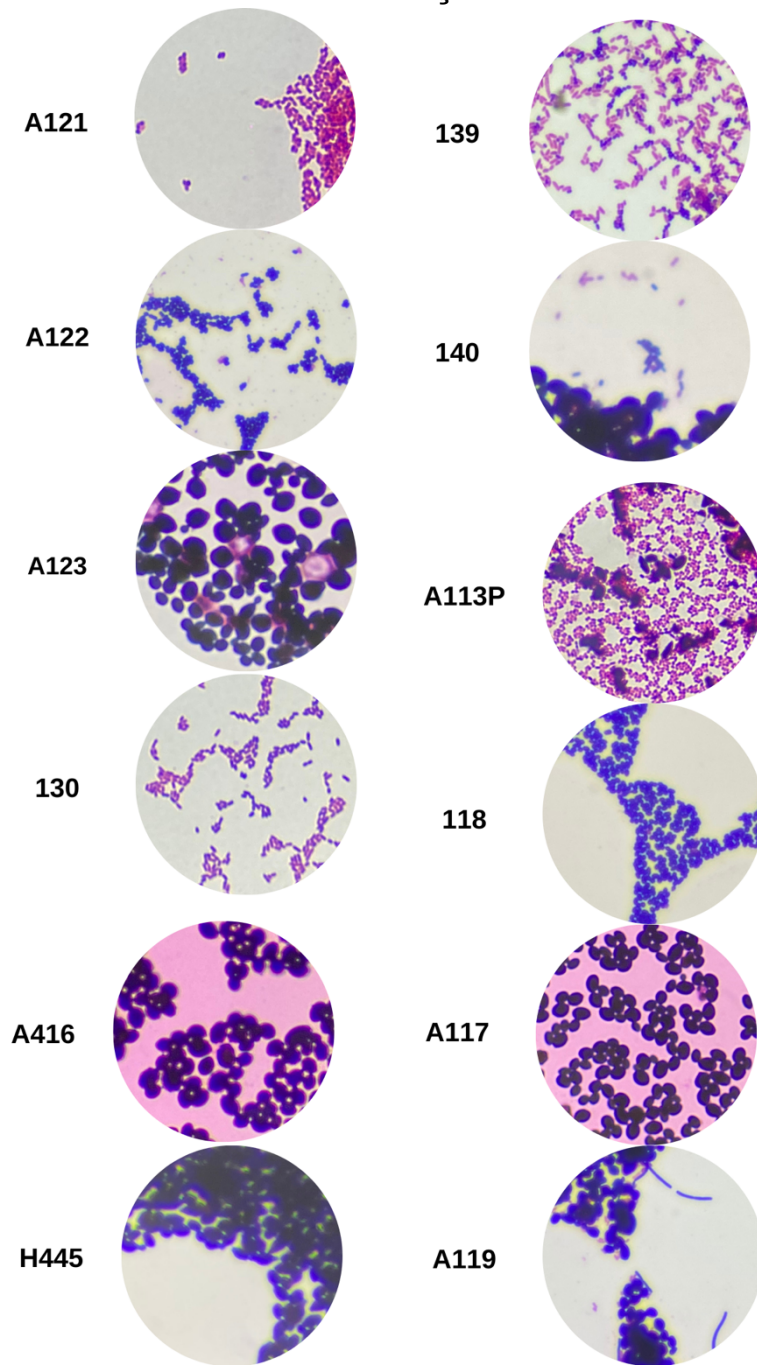


Fonte: Elaboração própria (2023). Coloração de Gram

Ilustração 179



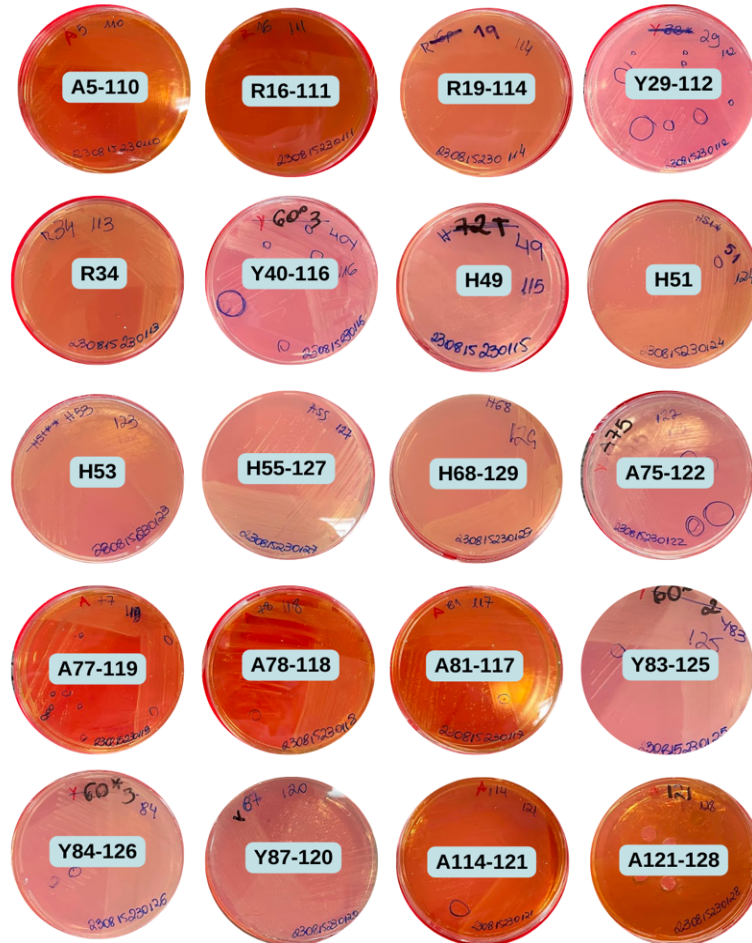
Fonte: Elaboração própria (2023). Coloração de Gram

Ilustração 20

Fonte: Elaboração própria (2023). Coloração de Gram

Ilustração 21

ISOLADOS IDENTIFICADOS

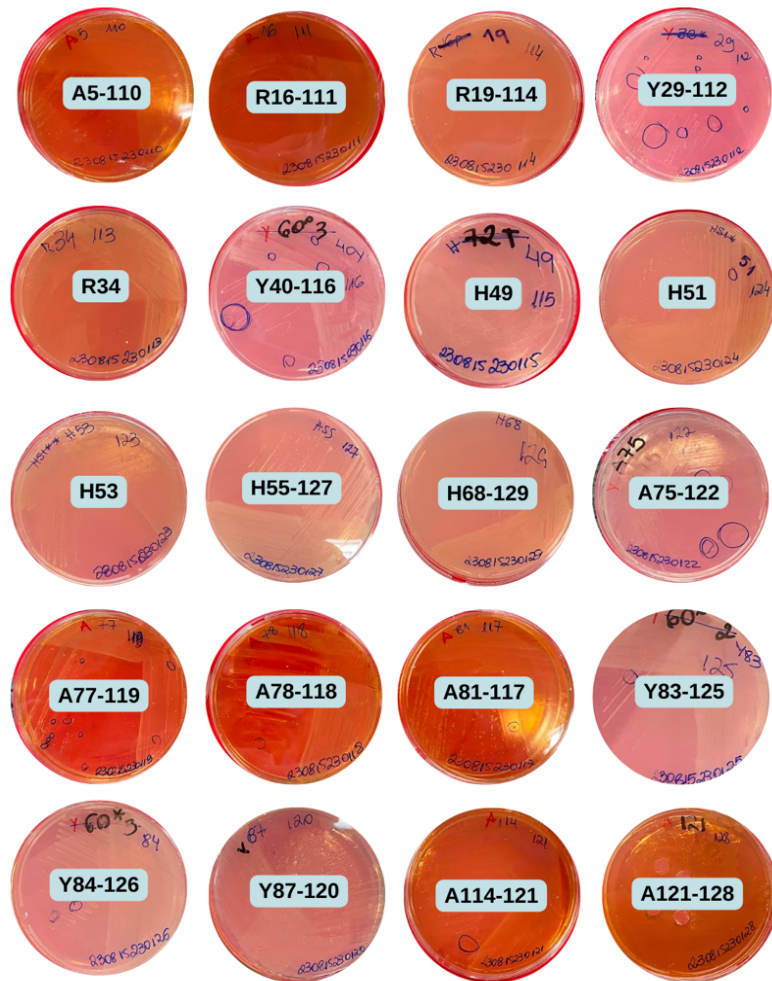


110	A	5	B		<i>lactobacillus</i>	100
111	R	16	B		<i>Glucanobacter</i>	100
112	Y	29	B	Y32*	<i>Acetobacter</i>	100
113	R	34	B		<i>lactobacillus mali</i>	100
114	R	19	B	R16P	<i>Glucanobacter</i>	100
115	H	49	B	H72T	<i>Glucanobacter</i>	100
116	Y	40	B	Y60*3	<i>Glucanobacter</i>	100
117	A	81	B		<i>lactobacillus</i>	100
118	A	78	B		<i>lactobacillus</i>	100
119	A	77	B		<i>lactobacillus</i>	100
120	Y	87	B		<i>lactobacillus</i>	100
121	A	114	B	AH4	<i>G. Oxydans</i>	100
122	A	75	B		<i>lactobacillus</i>	100
123	H	53	B	H51**	<i>G. Oxydans</i>	100
124	H	51	B	H51*	<i>G. Oxydans</i>	100
125	Y	83	B	Y60*2	<i>Glucanobacter / komagataeibacter</i>	94.55/5.45
126	Y	84	BB	Y60*3	<i>glucanobacter</i>	100
127	H	55	B		<i>glucanobacter</i>	100
128	A	121	B		<i>G. Oxydans</i>	100
129	H	68	B		<i>G. Oxydans</i>	100

Fonte: Elaboração própria (2023). Microrganismos preparados para identificação

Ilustração 22

ISOLADOS IDENTIFICADOS



110	A	5	B		<i>lactobacillus</i>	100
111	R	16	B		<i>Glucanobacter</i>	100
112	Y	29	B	Y32*	<i>Acetobacter</i>	100
113	R	34	B		<i>lactobacillus mali</i>	100
114	R	19	B	R16P	<i>Glucanobacter</i>	100
115	H	49	B	H72T	<i>Glucanobacter</i>	100
116	Y	40	B	Y60*3	<i>Glucanobacter</i>	100
117	A	81	B		<i>lactobacillus</i>	100
118	A	78	B		<i>lactobacillus</i>	100
119	A	77	B		<i>lactobacillus</i>	100
120	Y	87	B		<i>lactobacillus</i>	100
121	A	114	B	AH4	<i>G. Oxydans</i>	100
122	A	75	B		<i>lactobacillus</i>	100
123	H	53	B	H51**	<i>G. Oxydans</i>	100
124	H	51	B	H51*	<i>G. Oxydans</i>	100
125	Y	83	B	Y60*2	<i>Glucanobacter / komagataeibacter</i>	94.55/5.45
126	Y	84	BB	Y60*3	<i>glucanobacter</i>	100
127	H	55	B		<i>glucanobacter</i>	100
128	A	121	B		<i>G. Oxydans</i>	100
129	H	68	B		<i>G. Oxydans</i>	100

Fonte: Elaboração própria (2023). Microrganismos preparados para identificação