

Natália Caldeira de Carvalho

**Efeito do método de produção de kefir na vida
de prateleira e na infecção experimental com
Salmonella Typhimurium em camundongos**

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2011**

Natália Caldeira de Carvalho

**Efeito do método de produção de kefir na vida
de prateleira e na infecção experimental com
Salmonella Typhimurium em camundongos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Evelyn de Souza Oliveira Lopes

Coorientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli

Colaboradora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2011**

C331e

Carvalho, Natália Caldeira de.

Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com "*Salmonella Typhimurium*" em camundongos / Natália Caldeira de Carvalho. – 2011.
135f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes.

Co-orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli.

Colaboradora: Profa. Dra. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Probióticos – Teses. 2. Kefir – Teses. 3. Salmonella – Teses.
4. Vida-de-prateleira – Teses. 5. Leite fermentado – Teses. I. Lopes, Evelyn de Souza Oliveira. II. Nicoli, Jacques Robert. III. Laboissière, Lúcia Helena Esteves dos Santos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. V. Título.

CDD 637.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS -PPGCA

NATÁLIA CALDEIRA DE CARVALHO

**“EFEITO DO MÉTODO DE PRODUÇÃO DE KEFIR NA VIDA-DE-
PRATELEIRA E NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *SALMONELLA*
TYPHIMURIUM EM CAMUNDONGOS”**

APROVADA EM 24 DE MAIO DE 2011

COMISSÃO EXAMINADORA


Profa. Dra. ELISABETH NEUMANN


Prof. Dr. JACQUES ROBERT NICOLI


Profa. Dra. SILVANA DA MOTTA


Profa. Dra. EVELYN DE SOUZA OLIVEIRA LOPES
Orientadora

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e amor incondicional, pela oportunidade de realizar meus sonhos.

Ao Túlio pelo seu amor e alegria na minha vida, pela imensa paciência e compreensão, pela preciosa ajuda, conselhos e sugestões, pelo constante incentivo, amizade e por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

A minha mãe, Clara e a minha irmã, Bárbara, pelo incentivo e apoio para perseguir meus sonhos e força nos momentos difíceis, pelo carinho e o amor.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Evelyn de Souza Lopes Oliveira, pela orientação, incentivo, amizade, disponibilidade e confiança em mim.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pela valiosa orientação, disponibilidade e atenção, pela oportunidade de realizar meus experimentos com animais.

A Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière pelo carinho e amizade, pela grande dedicação e a alegria, pela colaboração fundamental na análise sensorial e por todo o aprendizado. Um exemplo de profissional apaixonado e ser humano.

A Prof^a. Dr^a. Denise Carmona Cara Machado pela disponibilidade e primorosa análise histopatológica realizada para meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Gonçalves Junqueira pelo precioso auxílio no tratamento estatístico dos resultados das análises físico-químicas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela concessão da bolsa.

As minhas amigas queridas (Aline, Ana Paula, Beatriz, Laila, Marina, Nat e Ronália) pelos eternos bons momentos, pelo apoio e carinho, almoços fartos e com muitas risadas, pelos conselhos e sugestões, pela ajuda nos experimentos especialmente naqueles momentos mais apertados.

A Tássia pela imensa contribuição nos meus experimentos com animais e grande disponibilidade em ajudar, pela amizade e carinho, pela paciência e alegria.

A Raphaella pela disponibilidade de me ensinar sobre os experimentos de produção de kefir e por permitir que participasse do seu trabalho, pelas sugestões e auxílio, pelo companheirismo, carinho e amizade.

Aos meus estagiários e amigos, Giovanna e Marcelo, pela grande disponibilidade e apoio, pela responsabilidade e respeito dedicados ao meu trabalho, pelo companheirismo, amizade e carinho.

As minhas companheiras do LAMIB (Andréa, Carla, Flávia, Letícia, Luciana e Raquel) pelo apoio e carinho, pelas preciosas sugestões e conselhos, pelo companheirismo e ajuda.

As funcionárias do LAMIB, Ana Diolina e Raimunda, pelo apoio e carinho, e pela constante disponibilidade de ajudar.

A todos os colegas e funcionários do LAMIB, LEFM, Tecnologia de Alimentos e Departamento de Alimentos que tornaram os momentos passados na UFMG mais agradáveis e alegres.

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, me apoiaram e torceram por mim nesta jornada.

SUMÁRIO

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1 LEITES FERMENTADOS.....	17
1.1 História e definições.....	17
1.2 Classificação.....	18
1.3 Aspectos gerais.....	18
1.4 Produtos lácteos adicionados de probióticos.....	19
2 PROBIÓTICOS.....	20
2.1 Histórico.....	20
2.2 Definição.....	21
2.3 Micro-organismos utilizados como probióticos.....	22
2.4 Efeitos benéficos.....	25
2.5 Mecanismos de atuação.....	27
3 KEFIR.....	28
3.1 O kefir.....	28
3.2 Os grãos de kefir.....	29
3.3 Características.....	32
3.3.1 Características químicas.....	32
3.3.2 Características microbiológicas.....	34
3.3.3 Características nutricionais.....	36
3.3.4 Características terapêuticas.....	38
3.3.5 Métodos de fabricação.....	42
4 MICROBIOTA NORMAL DO TRATO INTESTINAL HUMANO.....	44
5 O GÊNERO SALMONELLA	47
6 VIDA-DE-PRATELEIRA DE LEITES FERMENTADOS.....	49
7 ANÁLISE SENSORIAL.....	51
OBJETIVOS.....	55
MATERIAL E MÉTODOS.....	56
1 ELABORAÇÃO E ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DO KEFIR.....	56
1.1 Matérias-primas.....	56
1.2 Elaboração do kefir.....	56
1.2.1 Ativação dos grãos de kefir.....	57
1.2.2 Ativação e padronização do inóculo da cultura iniciadora.....	57
1.2.3 Método tradicional.....	58
1.2.4 Método com cultura iniciadora por fermentação simultânea.....	59

1.3 Análises físico-químicas.....	60
1.3.1 pH.....	61
1.3.2 Acidez em ácido láctico	61
1.3.3 Viscosidade.....	61
1.3.4 Sinérese.....	62
1.3.5 Etanol.....	62
1.4 Análises microbiológicas.....	63
1.4.1 Contagem de bactérias ácido lácticas totais.....	63
1.4.2 Contagem de leveduras totais.....	63
1.4.3 Contagem de coliformes.....	63
1.5 Análise estatística.....	63
1.6 Análise descritiva quantitativa modificada.....	64
1.6.1 Pré-seleção dos provadores.....	64
1.6.2 Levantamento da terminologia descritiva.....	64
1.6.3 Treinamento.....	65
1.6.4 Seleção dos provadores.....	65
1.6.5 Avaliação das amostras de kefir.....	65
1.6.6 Análise estatística sensorial.....	66
2 ESTUDO DO EFEITO DO KEFIR NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM	
SALMONELLA TYPHIMURIUM EM CAMUNDONGOS.....	66
2.1 Animais.....	67
2.2 Kefir.....	67
2.3 Micro-organismo patogênico.....	67
2.4 Tratamento.....	67
2.5 Desafio.....	68
2.6 Determinação da mortalidade e desenvolvimento ponderal em decorrência da infecção experimental por Salmonella Typhimurium em camundongos.....	68
2.7 Exame histopatológico.....	68
2.8 Análise estatística.....	69
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
1 ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DO KEFIR.....	70
1.1 Análises físico-químicas.....	70
1.2 Análises microbiológicas.....	79
1.3 Análise descritiva quantitativa modificada.....	83
1.3.1 Pré-seleção dos provadores e levantamento de atributos.....	83
1.3.2 Seleção dos provadores.....	84
1.3.3 Análise quantitativa descritiva.....	85
2 ESTUDO DO EFEITO DO KEFIR NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM	
SALMONELLA TYPHIMURIUM EM CAMUNDONGOS.....	95
2.1 Avaliação da mortalidade e morbidade em decorrência da infecção experimental por Salmonella Typhimurim em camundongos.....	95
2.2 Análise histológica de órgãos dos animais convencionais.....	98
CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106
APÊNDICES.....	121

APÊNDICE A - TABELAS COM OS RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE KEFIR.....	121
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PROVADORES.....	125
APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO.....	127
APÊNDICE D - FICHA DE AVALIAÇÃO UTILIZADA NA ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA (ADQ) DO KEFIR.....	129
APÊNDICE E - ATRIBUTOS, DEFIRNIÇÕES E AMOSTRAS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NA ADQ MODIFICADA DAS AMOSTRAS DE KEFIR.....	132
APÊNDICE F - COMENTÁRIOS REALIZADOS PELOS PROVADORES DURANTE A ANÁLISE SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE KEFIR EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO.....	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alguns exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos.....	24
Tabela 2: Padrões físico-químicos para o kefir.....	32
Tabela 3: Contagem de micro-organismos em grãos de kefir, cultura iniciadora do kefir e na bebida.....	35
Tabela 4: Micro-organismos encontrados no kefir descritos na literatura.....	37
Tabela 5: Características físico-químicas do kefir tradicional durante os 28 dias de estocagem.....	70
Tabela 6: Características físico-químicas do kefir cultura iniciadora durante os 28 dias de estocagem.....	70
Tabela 7: Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C em kefir tradicional e kefir cultura iniciadora durante o período de estocagem a 4°C.....	82
Tabela 8: Desempenho dos julgadores: níveis de probabilidade de F em todas as amostras derivados da análise de variância por julgador.....	84
Tabela 9: Desempenho dos julgadores: níveis de probabilidade de F relacionados ao poder de repetibilidade das respostas.....	85
Tabela 10: Alterações no valor (*, **) dos atributos sensoriais do kefir durante o armazenamento refrigerado.....	86
Tabela 11: Loadings (cargas) - Correlações (Coeficiente de correlação de Pearson) entre os atributos sensoriais e os três primeiros componentes principais.....	91
Tabela 12: Perfil do pH (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	121
Tabela 13: Perfil do pH (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	121
Tabela 14: Perfil da acidez (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	121
Tabela 15: Perfil da acidez (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	122
Tabela 16: Perfil da viscosidade (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	122
Tabela 17: Perfil da viscosidade (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	122
Tabela 18: Perfil da sinérese (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	122
Tabela 19: Perfil da sinérese (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	123
Tabela 20: Perfil de etanol (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	123
Tabela 21: Perfil de etanol (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	123
Tabela 22: Evolução da população de bactérias ácido lácticas (*, **) em kefir tradicional ¹ e kefir cultura iniciadora ² durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	124
Tabela 23: Evolução da população de leveduras (*, **) em kefir tradicional ¹ e kefir cultura iniciadora ² durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.....	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Proposta de estrutura química para o kefiran.....	31
Figura 2: Fluxograma da elaboração de kefir pelo método tradicional.....	58
Figura 3: Fluxograma da elaboração de kefir cultura iniciadora por fermentação simultânea.....	60
Figura 4: Alteração do pH no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.....	71
Figura 5: Alteração da acidez no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.....	72
Figura 6: Alteração da viscosidade no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.....	74
Figura 7: Alteração da sinérese no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.....	75
Figura 8: Valores médios de viscosidade e sinérese do (A): kefir tradicional e do (B): kefir cultura iniciadora ao longo do período de estocagem.....	76
Figura 9: Alteração do etanol no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento a 4°C.....	77
Figura 10: Evolução da população de bactérias ácido lácticas no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de 28 dias.....	80
Figura 11: Evolução da população de leveduras no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de 28 dias.....	81
Figura 12: (A) Formas de consumo de leites fermentados pelos provadores; (B) Questões sobre o kefir.....	83
Figura 13: Perfil sensorial de amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora durante um período de 28 dias de armazenamento.....	89
Figura 14: (A): Dispersão das amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora em relação aos dois primeiros componentes principais; (B) Loadings (cargas) – Correlação entre aos atributos sensoriais para as amostras de kefir durante o armazenamento.....	90
Figura 15: Sobrevivência dos camundongos CV não tratados (19 animais) ou tratados durante 10 dias com kefir tradicional (20 animais) ou com kefir cultura iniciadora (20 animais) antes do desafio experimental com Salmonella Typhimurium (↓).....	96
Figura 16: Análise comparativa entre as curvas de sobrevivência dos camundongos CV controle não tratados (curva preta, n=19) e dos camundongos CV tratados com kefir tradicional (curva vermelha, n= 20) e kefir cultura iniciadora (curva verde, n= 20).....	96
Figura 17: Ganho de peso dos camundongos CV não tratados ou tratados com kefir e desafiados com Salmonella Typhimurium.....	97
Figura 18: Histologia de fígado de camundongo após 7 dias de infecção com Salmonella Typhimurium, sem tratamento (A) ou tratado com kefir tradicional (B) ou kefir cultura iniciadora (C). A seta indica focos de infiltrado inflamatório no parênquima e próximos ao espaço porta, especialmente na Figura 18A e 18C . H&E. Escala da barra de 100 micrometros.....	100
Figura 19: Histologia do íleo de camundongos após 7 dias de infecção com Salmonella Typhimurium, sem tratamento (A) ou tratado com kefir tradicional (B) ou tratado com kefir cultura iniciadora (C). A seta indica infiltrado inflamatório difuso na mucosa. Nota-se, também, destruição da arquitetura do vilos com áreas de degeneração. H&E. Escala da barra de 100 micrometros.....	101
Figura 20: Histologia do cólon dos camundongos após 7 dias de infecção com Salmonella Typhimurium, sem tratamento (A) ou tratados com kefir tradicional (B) ou tratados com kefir cultura iniciadora (C). A seta indica infiltrado inflamatório difuso na mucosa. Nota-se,	

também, ausência de células caliciformes e mudança de espessura brusca da camada muscular. H&E. Escala da barra de 100 micrometros.....102

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IDF – International Dairy Federation
FAO – Food and Agriculture Organization (Organização da Agricultura e Alimentação)
WHO – World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)
UFC – Unidades Formadoras de Colônias
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DII – doenças inflamatórias do intestino
NK – Natural Killer (células destruidoras naturais)
RTIQ – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leites fermentados
IgA – Imunoglobulina A
ADQ – Análise Descritiva Quantitativa
BPF – Boas Práticas de Fabricação
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
UNIFAL – Universidade Federal de Alfenas
UHT – Ultra High Temperature
MRS – Man, Rogosa & Sharpe
YM – Yeast Malt
IAL – Instituto Adolfo Lutz
cP – centipoise
CETEC – Centro Tecnológico de Minas Gerais
NMP – Número Mais Provável
ANOVA – Análise de Variância
COEP – Comitê de Ética em Pesquisa
ACP – Análise de Componentes Principais
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal
TRAD – tradicional (Kefir produzido pelo método tradicional)
CI – cultura iniciadora (Kefir produzido pelo método com cultura iniciadora)
BAL – bactérias ácido lácticas
CP – componente principal
AGL – ácidos graxos livres

RESUMO

O kefir é um tipo de leite fermentado refrescante, carbonatado e com um sabor levemente ácido, produzido, tradicionalmente, a partir da fermentação do leite pelos grãos de kefir. Todavia a espécie e quantidade dos micro-organismos presentes nestes grãos sofrem mudanças durante produções sucessivas, levando a fabricação de uma bebida com qualidade não padronizada. Há evidências de que o kefir possui efeitos benéficos sobre o sistema imune e gastrointestinal, contudo há poucos estudos publicados sobre experimentos em animais e humanos que sustentem esta visão. O trabalho teve por objetivos determinar o tempo de vida-de-prateleira de amostras de kefir elaboradas com os grãos de kefir (Método tradicional) e com culturas puras isoladas desses grãos (Método com cultura iniciadora) e também verificar o efeito de proteção dessas amostras na infecção experimental com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em modelo animal. O kefir cultura iniciadora apresentou os menores valores de pH e sinérese e os maiores de acidez e viscosidade durante o armazenamento. O teor de etanol do kefir tradicional aumentou significativamente durante o armazenamento. A contagem média de bactérias ácido lácticas no kefir tradicional e cultura iniciadora variou de 9,19 a 8,37 log UFC/mL e 9,37 a 9,78 log UFC/mL, respectivamente, e a de leveduras no kefir tradicional e no kefir cultura iniciadora variou de 6,34 a 6,52 log UFC/mL e 5,75 a 6,10 log UFC/mL. O tempo de armazenamento influenciou nos atributos de presença de espuma, sabor ácido, sabor alcoólico e *off-flavor* em ambas amostras de kefir. A granulabilidade, sabor ácido e cremosidade foram os atributos que, aparentemente, mais diferenciaram o kefir tradicional do kefir cultura iniciadora. Na infecção experimental com *Salmonella* Typhimurium, observou-se que a taxa de sobrevivência dos animais tratados com kefir tradicional (30%) e com kefir cultura iniciadora (20%) não foi diferente estatisticamente quando comparadas ao grupo controle (21,1%). O grupo tratado com kefir tradicional apresentou ausência de lesão no fígado e cólon na maioria dos animais. O método de fermentação do kefir por cultura iniciadora demonstrou ser o melhor tecnologicamente, por resultar em uma bebida com um padrão de qualidade constante e com tempo de vida útil maior, além de possuir características sensoriais semelhantes às do kefir tradicional, enquanto nenhum dos kefir apresentaram efeito de proteção na infecção com *Salmonella* Typhimurium em camundongos.

Palavras-chave: Kefir; probióticos; *Salmonella*; vida-de-prateleira.

ABSTRACT

Kefir is a carbonated fermented milk with a slightly acidic flavor. It is traditionally produced by the kefir's grain inoculation in milk. However the amount and species of microorganisms in kefir grains may change after successive productions, becoming difficult to standardize the drink quality. There are evidences that the kefir produces beneficial effects for the immune and gastrointestinal systems, however there are a few published studies about animals and human experiments proving it. In this work we analyzed the stability of physicochemical, microbiological and sensory characteristics of traditional kefir and starter-culture kefir aside from the possibility of the kefir protection against a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium infection in mice. The starter-culture kefir revealed the lowest pH and the highest acidity. The starter-culture kefir have had the lowest syneresis and the higher viscosity during storage. The counts of lactic acid bacteria on the traditional and starter-culture kefir has changed from 9.19 to 8.37 log CFU/mL and from 9.37 to 9.78 log CFU/mL, respectively, while the yeast has changed from 6.34 to 6.52 log CFU/mL and 5.75 to 6.10 log CFU/mL. The storage time has influenced the presence of foam, acid and alcoholic flavors and off-flavor in both samples. The lumpiness, acid flavor and creaminess were the most important attributes to distinguish the traditional and the starter-culture kefir. In the mortality tests the survival rate of the traditional kefir (30%) and the starter-culture kefir (20%) were statistically identical to the control group (21.1%). The group threatened with traditional kefir have not gotten injured liver and colon in most part of the animals. The starter-culture fermentation method of kefir was technologically better because it produced a drink with better constant quality and a bigger shelflife while preserving the sensory characteristics of the traditional kefir. Nonetheless, while none of kefir showed a protective effect on infection with *Salmonella* Typhimurium in mice.

Keywords: Kefir; probiotic; *Salmonella*; shelflife.

INTRODUÇÃO

No mundo industrializado, ocorre uma explosão de interesse dos consumidores por alimentos que, além das propriedades nutricionais, proporcionam bem-estar e prolongamento da vida, assim como, por alimentos que são eficazes na prevenção do surgimento e do desenvolvimento de câncer, doenças cardiovasculares e osteoporose.

Como resultado, um novo termo foi proposto: alimento funcional (GRAJEK *et. al.*, 2004). Esse termo foi usado pela primeira vez no Japão, na década de 1980, para produtos alimentícios fortificados com constituintes especiais que possuíam efeitos fisiológicos adicionais. O conceito de alimento funcional foi definido em 1984 por cientistas japoneses que estudaram as relações entre nutrição, qualidade sensorial, fortificação e modulação de sistemas fisiológicos (SIRÓ *et. al.*, 2008).

A definição de alimentos funcionais tem sido proposta por governos, indústrias e acadêmicos. Internacionalmente, o conceito de alimentos funcionais parece ser consensual. Os alimentos funcionais devem promover outros benefícios à saúde além das propriedades nutricionais básicas. Esses alimentos são consumidos em dietas convencionais, contudo apresentam capacidade de atuar em funções fisiológicas auxiliando na proteção contra doenças crônicas não degenerativas (diabetes, hipertensão, câncer, doenças cardiovasculares, osteoporose) e infecções microbianas (KWAK & JUKES, 2001; MORAES, 2006).

O interesse por alimentos funcionais tem sido motivado por uma rápida expansão dos conhecimentos científicos sobre a importância de uma dieta saudável, pelos avanços técnicos nas indústrias de alimentos, pelo aumento da demanda dos consumidores por produtos alimentícios promotores de saúde, bem como pelo aumento da expectativa de vida da população, elevando os custos de cuidados com a saúde (SIRÓ *et. al.*, 2008).

Esses fatores criaram um mercado dinâmico de alimentos e bebidas funcionais, oferecendo uma boa perspectiva de crescimento para seus fabricantes. Entre 1998 e 2003, os valores globais de venda aumentaram quase 60%, e em quase 40% em 2008 (EUROMONITOR, 2009). No Japão, considerado como o berço de alimentos funcionais, o mercado destes produtos é significativo. O consumidor norte-americano gasta, em média, em cerca de US\$ 90 por ano em alimentos e bebidas funcionais, resultando em um

mercado superior a US\$ 27 milhões em 2007. No Brasil, a vendas de alimentos funcionais em 2007 atingiu 500 mil dólares correspondendo a quase 1% das vendas totais de alimentos, além disso, cerca de 65% do total de alimentos funcionais brasileiros são produtos probióticos (CRUZ *et. al.*, 2007).

Os alimentos funcionais mais importantes e mais frequentemente consumidos são aqueles adicionados de probióticos, prebióticos, antioxidantes, vitaminas e/ou cálcio. Tem sido dada prioridade à produção de alimentos com probióticos e/ou prebióticos, e à extração de componentes bioativos a partir de matérias vegetais por enzimas e tecnologia de fermentação para reduzir a perda destes compostos, bem como pela engenharia genética para intensificar a sua biossíntese (GRAJEK *et. al.*, 2004).

O interesse no uso de probióticos com a finalidade de beneficiar a saúde do hospedeiro e de prevenir ou tratar doenças, aumentou nos últimos anos, particularmente, devido ao aumento da incidência de micro-organismos resistentes a antibióticos, portanto, a necessidade de buscar tratamentos alternativos para as doenças gastrointestinais (TEITELBAUM & WALKER, 2002; NICOLI & VIEIRA, 2003; MARTINS *et. al.*, 2005).

O mercado mundial de alimentos, ingredientes e suplementos probióticos foi avaliado em US\$ 14,9 bilhões em 2007 e atingiu US\$ 16 bilhões em 2008. Estima-se que as vendas atingirão um total de US\$ 19,6 bilhões em 2013, uma taxa composta de crescimento anual igual a 4,3%. Probióticos do gênero *Lactobacillus* representam a maior fatia do mercado, representando 61,9% das vendas totais em 2007 (FOOD PROCESSING, 2009).

Aplicações em alimentos para os probióticos são encontrados em produtos lácteos, como iogurtes, kefir e bebidas lácteas que representam as principais categorias. Encontra-se à venda no mercado uma grande variedade de leites fermentados adicionados de probióticos. Esses produtos, além de possuírem grande aceitação pelo público em geral e excelente valor nutritivo, são veículos em potencial para o consumo de probióticos (ANTUNES *et. al.*, 2007; VIEGAS, 2008). Os consumidores estão cada vez mais familiarizados com o fato de que os alimentos fermentados podem apresentar micro-organismos vivos (KEMPKA *et. al.*, 2008).

O kefir é um leite fermentado viscoso, refrescante, carbonatado e com sabor levemente ácido (FARNWORTH, 2005). Esse leite fermentado distingue-se dos demais por resultar da fermentação do leite pela ação de uma mistura complexa de micro-

organismos confinados em uma matriz de polissacarídeos e por conter gás carbônico e etanol (GARROTE *et. al.*, 1997; LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006; CHEN *et. al.*, 2008).

Na Europa Oriental a ideia de que kefir possa promover benefícios à saúde é antiga. O kefir seria um probiótico natural (RODRIGUES *et. al.*, 2005), apresentando uma microbiota ativa composta por uma grande variedade de micro-organismos que auxiliam na ação contra organismos patogênicos, na manutenção da microbiota do trato gastrointestinal e no processo de digestão (OTLES & CADINGI, 2003; LEE *et. al.*, 2007).

Entretanto, estudos publicados sobre experimentos com animais e humanos que sustentam esta hipótese ou sobre o mecanismo pelo qual o kefir exerce seus efeitos benéficos são escassos.

O trato gastrointestinal de camundongos fornece um excelente modelo para o estudo do efeito de diferentes tipos de dieta neste ecossistema. Animais experimentais podem ser mantidos sob condições controladas e as diferentes partes do trato gastrointestinal podem ser amostrados após o sacrifício dos animais, evitando, assim, a obtenção de resultados apenas a partir de exames nas fezes. É evidente que a natureza da dieta em animais experimentais deve ser considerada em estudos futuros da microbiota intestinal dos humanos (MARQUINA *et. al.*, 2002).

A produção do kefir utilizando os grãos como cultura iniciadora é muito difícil e irregular devido a complexidade da sua composição microbiológica que varia muito dependendo da origem dos grãos e das condições de estocagem e manipulação (FONTÁN *et. al.*, 2006). Métodos utilizando cultura iniciadora composta de bactérias e leveduras isoladas e selecionadas para a produção de kefir têm sido sugeridos (SARKAR, 2008), eliminando assim os problemas associados ao método com grãos e permitindo a obtenção de um produto com qualidade padronizada (ASSADI *et. al.*, 2000).

As características do kefir têm sido bem descritas na literatura, mas suas variações durante o tempo e as condições de estocagem tem sido pouco estudadas (GARROTE *et. al.*, 1997). Dessa forma, o estudo das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais ocasionadas durante o período de estocagem dos alimentos possibilita estimar a sua vida útil, sendo um fato de fundamental importância para o desenvolvimento de novos produtos, para as indústrias de alimentos, órgãos governamentais e a segurança dos consumidores (SANGALETTI, 2007).

Considerando os fatos relatados, o presente trabalho teve por objetivos avaliar

as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais a fim de determinar o tempo de vida-de-prateleira de amostras de kefir elaboradas com os grãos de kefir (Método tradicional) e com culturas puras isoladas desses grãos (Método com cultura iniciadora) e também verificar o efeito protetor dessas amostras na infecção experimental com *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em modelo animal.

REVISÃO DE LITERATURA

1 LEITES FERMENTADOS

1.1 História e definições

O processo de fermentação para a produção de alimentos, segundo evidências arqueológicas, foi descoberto há milhares de anos atrás incidentalmente. O emprego desse processo em alimentos tornou-se comum após se observar que os alimentos fermentados apresentavam conservação mais longa e melhor valor nutricional em relação ao alimento correspondente não fermentado (FARNWORTH, 2005; MARTINS, 2006). Assim, esse tipo de processo é um dos métodos mais antigos utilizados a fim de prolongar a vida-de-prateleira do leite, e praticado há milhares de anos pelos seres humanos (TAMIME, 2002).

A origem exata da produção de leites fermentados é difícil de se estabelecer, mas é possível afirmar que data de mais de 10.000 anos atrás. Esses produtos são originários do Oriente Médio e Balcãs, e a evolução das técnicas de produção dos leites fermentados ao longo dos anos pode ser atribuída às habilidades culinárias dos habitantes dessas regiões (TAMIME, 2002). Os estudos realizados por Metchnikoff no *Institut Pasteur* em Paris (França), no começo do século 1900, foram os primeiros a apontar a produção de leites fermentados como resultado do metabolismo de micro-organismos (ROBINSON, 2001).

Segundo a definição da *International Dairy Federation* (IDF) (1992), leites fermentados são preparados a partir do leite e/ou produtos de leite (como, por exemplo, combinações de leite integral, parcialmente ou completamente desnatado, concentrado ou leite em pó, *buttermilk* em pó, proteína do leite: concentrados de proteína, caseína e caseinatos comestíveis, creme, manteiga – os quais têm sido produzidos de matérias-primas previamente pasteurizadas) fermentados pela ação de micro-organismos específicos, resultando na redução do pH e coagulação das proteínas do leite.

Os leites fermentados, de acordo com a definição da legislação brasileira, são “os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por

coagulação e diminuição do pH do leite, reconstituído ou não, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos”. E esses micro-organismos devem ser viáveis, abundantes e ativos no produto final durante sua vida de prateleira (BRASIL, 2000).

1.2 Classificação

A definição de leite fermentado inclui os iogurtes, leites cultivados, os leites acidófilos, o kefir, kumys e a coalhada (BRASIL, 2007). ROBINSON & TAMIME (1995) propuseram um esquema para a classificação dos leites fermentados, considerando os micro-organismos que predominam no produto, incluindo seus principais metabólitos:

- Fermentações lácticas que incluem (a) mesófilos: *buttermilk*, filmjok, tatmjolk e langofil; (b) termófilos: iogurte, *buttermilk* búlgaro, zabadi, dahi; e (c) probióticos: leite acidófilo, Yakult, ABT, Onka, Vifit, os produtos deste grupo constituem os leites fermentados mais conhecidos no mundo;
- Fermentações lácticas e leveduras: kefir, koumiss, leite de levedura acidófilo; e
- Fermentações lácticas e bolores: villi (citado por KHURANA & KANAWJIA, 2007).

Hoje os produtos de leite fermentado são produzidos no mundo inteiro e existem aproximadamente 400 nomes genéricos aplicados aos produtos industrializados ou tradicionais. O tipo de inóculo utilizado para a fermentação do leite resulta em diferentes leites fermentados e dentre eles, o mais comum e consumido é o iogurte (MARTINS, 2006).

1.3 Aspectos gerais

Entre 2001 e 2004, o IDF (*International Dairy Federation*) observou um crescimento generalizado do consumo de leites fermentados ao redor do mundo. E os mercados mais significativos, depois do mercado japonês, são a Coréia do Sul e o Brasil, seguidos por um número de mercados da Europa Ocidental. A Europa Ocidental tem aumentado em importância, tornando-se a segunda maior região consumidora de leites fermentados a frente da América Latina (KHURANA & KANAWJIA, 2007).

Os ingredientes obrigatórios para a produção dos leites fermentados são: leite e/ou leite reconstituído padronizado em seu conteúdo de gordura, cultivos de bactérias

láticas e/ou cultivos de bactérias láticas específicas. Os ingredientes opcionais permitidos são: leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra do leite ou *butter oil*, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos e outros ingredientes não lácteos (frutas em forma de pedaços, polpa(s), suco(s) e outros preparados à base de frutas, maltodextrinas, mel, coco, cereais, vegetais, chocolate, especiarias, café, outras, açúcares e/ou glicídios) numa proporção máxima de 30% (m/m) do produto final (BRASIL, 2000).

Os leites fermentados devem apresentar uma consistência firme, pastosa, semissólida ou líquida, cor branca ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou corante(s) adicionado(s) e ainda odor e sabor característicos ou de acordo com a(s) substância(s) alimentícia(s) e/ou substância(s) aromatizante(s)/saborizante(s) adicionada(s) (BRASIL, 2000).

As propriedades químicas, microbiológicas e reológicas dos leites fermentados podem ser modificadas pelo tipo de culturas iniciadoras adicionadas, pela adição de soro, a composição do leite, o processamento, incluindo as etapas pós-fermentação, como por exemplo, a quebra do coágulo e a temperatura de estocagem (CUNHA *et. al.*, 2008).

1.4 Produtos lácteos adicionados de probióticos

A ingestão de micro-organismos com efeito probiótico pode ser feita na forma de preparações farmacêuticas como compostos em pó, tabletes ou cápsulas, ou de iogurtes e outros alimentos fermentados. Esses produtos podem conter somente uma, ou várias espécies distintas de micro-organismos (FOOKS & GIBSON, 2002).

Há muitas pesquisas relacionadas a probióticos que se encontram voltadas para produtos como leites fermentados, especialmente iogurtes, sendo estes os principais produtos presentes no mercado mundial contendo probióticos (SAAD, 2006). Os produtos probióticos são mais populares no Japão onde existe no mercado mais de 53 tipos diferentes de produtos (VASILJEVIC & SHAH, 2008). A maior categoria de alimentos nos EUA que contém culturas de micro-organismos vivos e ativos é a de produtos lácteos fermentados, como o kefir, iogurte e queijos (DOUGLAS & SANDERS, 2008).

O consumo de produtos lácteos funcionais no Oeste da Europa, Estados Unidos (EUA) e Japão aumentou desde 2005 (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Os europeus consomem probióticos em alimentos e suplementos alimentares. O mercado consumidor

de alimentos probióticos é de 11,4 bilhões de euros na Europa Ocidental. O maior setor é de iogurte e sobremesas, com vendas de aproximadamente 1 bilhão de euros, e o restante do mercado é basicamente leite fermentado probiótico. Crescimento anual das vendas está previsto para aproximadamente 7% a 8% nos próximos cinco anos. As diferenças entre os mercados dos EUA e dos países europeus para os probióticos podem ser facilmente explicado pelo consumo per capita anual de leite fermentado (incluindo iogurte), na Europa consomem-se 35 a 45 L / pessoa / ano, enquanto na América do Norte consomem-se 4-5 L / pessoa / ano (SAXELIN, 2008).

No Brasil, estima-se que o consumo de leites fermentados contendo probióticos está em torno de 120 mil toneladas/ano. São encontrados no mercado brasileiro vários produtos alimentícios contendo probióticos, como leite fermentado aromatizado ou não, e iogurte (OLIVEIRA *et. al.*, 2002).

Os micro-organismos utilizados como probióticos destinados à tecnologia de produção de alimentos, além de apresentar os critérios mencionados anteriormente, devem apresentar estabilidade genética, boa capacidade de multiplicação no alimento desejado, permanecer estáveis e viáveis durante o armazenamento e proporcionar características sensoriais adequadas ao produto. As cepas também necessitam ser adequadas à produção industrial em larga escala, resistindo às condições de processamento como liofilização ou secagem por *spray drying* (GRAJEK *et. al.*, 2004; VASILJEVIC & SHAH, 2008).

O crescimento e a viabilidade destes micro-organismos na matriz de alimentos dependem de fatores como a espécie e linhagens presentes, a quantidade do inóculo, a disponibilidade de nutrientes, o tempo de fermentação, concentração de açúcar, o pH, temperatura de estocagem, presença de micro-organismos competidores ou inibidores, oxigênio dissolvido e permeabilidade do oxigênio através da embalagem, e até a adição de ingredientes que favorecem o crescimento das culturas probióticas (OLIVEIRA *et. al.*, 2002; KOMATSU *et. al.*, 2008; VASILJEVIC & SHAH, 2008)

2 PROBIÓTICOS

2.1 Histórico

Há relatos bem antigos acerca dos benefícios à saúde proporcionados pelo uso

de micro-organismos vivos em alimentos, principalmente bactérias ácido lácticas. Na versão Persa do Antigo Testamento (Gênesis 18:8) afirma-se que “Abraão deveria sua longevidade ao consumo de leite ácido”. Em 76 A.C. o historiador romano, Plinius, recomendou o uso de leites fermentados para o tratamento de gastroenterites (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001; TEITELBAUM & WALKER, 2002).

Em 1885, um pesquisador, Escherich, reconheceu, pela primeira vez, a importância do exame para identificar a presença de bactérias no trato gastrointestinal e fezes normais, e conseqüentemente compreender a fisiologia da digestão e a patologia e terapia das doenças intestinais de origem microbiana (DOUGLAS & SANDERS, 2008). O cientista russo, Elie Metchnikoff, ganhador do Prêmio Nobel em 1908, sugeriu o consumo de leite fermentado para modular a microbiota intestinal (NICOLI & VIEIRA, 2003). Ele sugeriu que a ingestão de iogurte contendo *Lactobacillus* diminuía o número de bactérias produtoras de toxina no intestino e contribuía para a longevidade de camponeses búlgaros, grande consumidores de iogurte (TEITELBAUM & WALKER, 2002). Na mesma época, o microbiólogo francês Tissier observou que a microbiota fecal de recém-nascidos amamentados com leite materno apresentava mais *Bifidobacterium* que a microbiota fecal de crianças que eram amamentadas com outro tipo de leite (SCHREZENMEIR & DE VRESE, 2001; NICOLI & VIEIRA, 2003).

Em 1930, uma cepa de *Lactobacillus* capaz de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal foi isolada e cultivada. A cultura, identificada como *Lactobacillus casei* Shirota, foi utilizada com sucesso na produção de um leite fermentado chamado “Yakult”, o qual iniciou a fundação da companhia de mesmo nome em 1935. No período entre o final dos anos de 1930 e de 1950, a pesquisa nesta área perdeu seu ritmo, provavelmente, devido às condições adversas (depressão, guerra) no mundo. A volta do interesse pela pesquisa da microbiota intestinal humana foi iniciada no fim de 1950 e começo de 1960 que conduziu à introdução do conceito de probiótico (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

2.2 Definição

O termo "probiótico" tem origem grega e significa "para a vida" (STEFE, 2008). LILLEY & STILLWELL, em 1965, empregaram a palavra probiótico, pela primeira vez, ao se referir a uma substância secretada por um micro-organismo que estimulava o crescimento de outro (BARBOSA *et. al.*, 2006). PARKER, em 1974, foi o primeiro a utilizar

o termo probiótico com o sentido empregado atualmente e definiu probióticos como “organismos ou substâncias os quais contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal” (COPPOLA & TURNES, 2004).

Atualmente, a definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a adotada pela Organização da Agricultura e Alimentação (FAO) das Nações Unidas e Organização Mundial de Saúde (WHO) (KOMATSU *et. al.*, 2008). Segundo a FAO/WHO (2002), probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”.

Apesar da definição de probióticos focar a importância de sua viabilidade, há estudos que sugerem que micro-organismos não viáveis ou frações de células podem exercer algum efeito benéfico (KATARIA *et. al.*, 2009).

2.3 Micro-organismos utilizados como probióticos

A Tabela 1 apresenta alguns exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos. Os micro-organismos utilizados como probióticos são usualmente componentes não-patogênicos da microbiota humana, tais como bactérias produtoras de ácido láctico: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* e alguns *Streptococcus*; e uma levedura: *Saccharomyces boulardii* (BARBOSA *et. al.*, 2006).

Um micro-organismo para ser definido como probiótico deve apresentar os seguintes critérios: o gênero ao qual pertence o micro-organismo deve ser de origem humana (KAUR *et. al.*, 2002; TEITELBAUM & WALKER, 2002); manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte; tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal; resistir a fagos e ao oxigênio (COPPOLA & TURNES, 2004); aderir à mucosa intestinal e colonizar, mesmo que temporariamente, o trato gastrointestinal humano; produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino, impedindo ou reduzindo, assim, a aderência e proliferação de patógenos (KAUR *et. al.*, 2002; TEITELBAUM & WALKER, 2002; SAAD, 2006). O micro-organismo probiótico também deve ser seguro para uso humano, não apresentar histórico de patogenicidade e não estar associado a outras doenças (SAAD, 2006). O micro-organismo ainda não deve ser capaz de transportar genes transmissores de resistência a antibióticos (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Tabela 1: Alguns exemplos de micro-organismos utilizados como probióticos.

Gêneros	Espécies
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> linhagens LC1, La5, La7, Gilliland
	<i>Lactobacillus casei</i> linhagens Shirota, Imunitass, NCC208
	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> e <i>tolerans</i>
	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
	<i>Lactobacillus salivarius</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>
	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Lactobacillus curvatus</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>
	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>breve</i> , <i>infantis</i> , <i>lactis</i>
	<i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>longum</i> e <i>thermophilum</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>faecalis</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces bouladii</i> e <i>cerevisiae</i>

Fonte: TAMIME, 2002; SAAD, 2006.

O potencial probiótico dos micro-organismos pode diferir entre cepas de uma mesma espécie. Cepas de uma mesma espécie são incomparáveis e podem possuir áreas de aderência distintas, efeitos imunológicos específicos e seus mecanismos de ação sobre a mucosa saudável e a inflamada podem ser distintos (ISOLAURI *et. al.*, 2004).

A fim de exercer suas propriedades funcionais, os probióticos necessitam chegar aos sítios ativos em uma forma viável e ativa (VASILJEVIC & SHAH, 2008). No entanto, a viabilidade e atividade não são os únicos fatores importantes na ação de um probiótico. O nível do micro-organismo deve ser suficientemente elevado (NICOLI & VIEIRA, 2003).

Os níveis recomendados de micro-organismos, geralmente sugeridos pelos estudos, são de 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL a 10^7 e 10^8 UFC/mL. Essas sugestões têm sido feitas para compensar a possibilidade de redução na

concentração dos organismos probióticos durante o processamento e estocagem do produto probiótico, assim como durante a passagem pelo trato gastrointestinal (VASILJEVIC & SHAH, 2008). A ingestão diária de um probiótico é, portanto, indispensável para manter níveis artificialmente elevados do micro-organismo no ecossistema digestivo, assegurando o contínuo efeito benéfico no organismo humano (KOMATSU *et. al.*, 2008).

A recomendação, atualmente, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é baseada na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo de 10^8 a 10^9 UFC/dia (BRASIL, 2007).

Dentre as bactérias probióticas, 56 espécies são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e 29 espécies são classificadas como *Bifidobacterium*, apesar de serem poucas as cepas com efeito probiótico bem documentado (SHAH, 2007). A tabela a seguir apresenta exemplos de alguns micro-organismos utilizados como probióticos.

Os lactobacilos, de modo geral, podem colaborar na digestão da lactose em indivíduos com intolerância a esse dissacarídeo, diminuir a constipação e a diarreia infantil, ajudar na resistência a infecções por *Salmonella*, prevenir a "diarreia do viajante" e aliviar a síndrome do intestino irritável (KOMATSU *et. al.*, 2008).

As bifidobactérias são conhecidas por estimularem o sistema imunológico, produzirem vitaminas do complexo B, inibirem a produção de amônia e colesterol no sangue e ajudarem a restabelecer a microbiota normal após tratamento com antibióticos (KOMATSU *et. al.*, 2008). Existe a necessidade de identificar de maneira apropriada, particularmente no caso de *Bifidobacterium*, as cepas a serem empregadas em produtos contendo probióticos, uma vez que três de suas espécies – *B. dentium*, *B. denticolens* e *B. inopinatum* estão associadas à cárie dentária e não devem ser utilizadas em produtos alimentícios (OLIVEIRA *et. al.*, 2002).

A levedura *Saccharomyces boulardii* é um dos poucos micro-organismos utilizados como probióticos que não é de origem humana e ainda possui ao seu favor o maior número de ensaios laboratoriais e clínicos. Este probiótico é usado no combate a vários tipos de distúrbios gastrointestinais. *S. boulardii* tem sido sugerida na manutenção do tratamento da doença de Crohn e na prevenção de diarreia em pacientes recebendo alimentação por sonda. Além destes, existem ensaios clínicos mostrando o seu efeito

sobre a microbiota de prematuros e na diminuição da diarreia em pacientes com amebíase aguda. A possibilidade de translocação do *S. boulardii* no interior do intestino é praticamente inexistente, uma vez que a levedura somente sobrevive, mas não coloniza o cólon (MARTINS *et. al.*, 2005).

As propriedades probióticas dos micro-organismos são usualmente estudadas em diferentes modelos, como *in vitro* com culturas de células epiteliais, *in vivo* (animais de laboratório) e voluntários humanos (GRAJEK *et. al.*, 2004).

2.4 Efeitos benéficos

Os benefícios à saúde promovidos pelos micro-organismos probióticos são específicos à cepa, conseqüentemente, não há uma cepa universal que pode promover todos os benefícios propostos, e nem cepas pertencentes a mesma espécie que promovem os mesmos benefícios (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Existe uma grande escala de aplicações clínicas dos probióticos como em cáries dentárias, ozostomia, dermatites atópicas, asma, infecções respiratórias, doença intestinal inflamatória, intolerância à lactose, síndrome do intestino irritável, infecção por *Helicobacter pylori*, diarreia, câncer cólon, infecções vaginal, encefalopatia hepática e pancreatites, que permanecem ainda sem evidências completas (CARPUSO *et. al.*, 2008; DOUGLAS & SANDERS, 2008).

Em muitos casos, desconhece-se: a dose apropriada para a aplicação, o tempo necessário para alcançar o ponto final da terapia, a interação dos probióticos com os alimentos no intestino e a interação entre os micro-organismos probióticos misturados (CARPUSO *et. al.*, 2008).

Alguns dos potenciais efeitos benéficos dos probióticos:

- Intolerância à lactose - Várias revisões (DE VRESE *et. al.*, 2001; GILL & GUARNER, 2004; LOMER *et. al.*, 2008; VASILJEVIC & SHAH, 2008) tem descrito que alguns probióticos podem melhorar a digestão da lactose e eliminar os sintomas da intolerância. Os mecanismos pelos quais estes probióticos exercem seus efeitos não são totalmente compreendidos, mas podem envolver alteração do pH intestinal, expressão da enzima β -galactosidase, efeitos positivos sobre as funções intestinais e a microbiota do cólon. Alguns estudos (ROSADA, 1992; RIZKALLA *et. al.*, 2000; HE *et. al.*, 2008) demonstraram a melhora da digestão da

lactose e alívio dos sintomas gastrointestinais;

- Prevenção e redução dos sintomas de diarreia – Os probióticos podem atuar na redução dos sintomas ou duração e/ou prevenção de: diarreia infantil (SULLIVAN & NORD, 2002; HUANG *et. al.*, 2002; NOMOTO, 2005), diarreia do viajante (MCFARLAND, 2007; SPIES, 2008), aquelas associadas ao uso de antibióticos (KOTOWSHA *et. al.*, 2005; MCFARLAND, 2006; HICKSON *et. al.*, 2007) e causadas por patógenos de origem alimentar (FOOKS & GIBSON, 2002);
- Prevenção e tratamento de alergias – A prevenção e controle das alergias é outra área que os probióticos podem exercer o seu papel potencialmente benéfico (FURRIE, 2005; VILJANEN *et. al.*, 2005; GUEIMONDE *et. al.*, 2006). Os mecanismos do efeito protetor dos probióticos sobre as reações alérgicas não são completamente conhecidos (VASLJEVIC & SHAH, 2008);
- Redução do risco associado a mutagenicidade e carcinogenicidade - Estudos experimentais demonstram a habilidade de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* em diminuir a atividade genotóxica de certos compostos químicos e aumentar a atividade antimutagênica durante o crescimento em meio selecionado (VASLJEVIC & SHAH, 2008);
- Efeito hipocolesterolêmico – A capacidade dos probióticos para reduzir os níveis séricos de colesterol é ainda assunto para debate. Esta habilidade pode estar relacionada à atividade de algumas cepas do gênero *Lactobacillus* em desconjugar sais biliares pela produção de hidrolases (MOMBELLI & GISMONDO, 2000).
- Inibição da *Helicobacter pylori* - Os probióticos demonstram ser capazes de reduzir a carga microbiana e a inflamação em estudos em animais e humanos (FEDORAK & MADSEN, 2004). Estudos (FELLEY *et. al.*, 2001; CRUCHE *et. al.*, 2003; PANTOFLICKOVA *et. al.*, 2003) indicaram a supressão do crescimento da *H. pylori* e redução da inflamação. Nenhum estudo, no entanto, identificou a erradicação do patógeno (FLOCH *et. al.*, 2005).
- Prevenção de doenças inflamatórias do intestino (DII) – A doença inflamatória do intestino é uma inflamação crônica e recorrente que afeta geralmente o intestino delgado e o cólon e inclui doença de Crohn e colite ulcerativa (SULLIVAN & NORD, 2002). A manipulação terapêutica da microbiota intestinal normal utilizando probióticos tem sido considerada como uma opção de tratamento adicional

(MUTLU *et. al.*, 2002; GEIER *et. al.*, 2007; REIF & KELLY, 2010).

2.5 Mecanismos de atuação

O mecanismo de ação dos probióticos ainda não está completamente esclarecido, contudo há sugestões de vários processos que podem atuar independentemente ou associados (COPPOLA & TURNERS, 2004). Os mecanismos de ação propostos para explicar os efeitos benéficos dos probióticos são, basicamente, os mesmos atribuídos à microbiota digestiva normal no exercício de suas funções, dentre elas, proteção ecológica, imunomodulação e contribuição nutricional ao hospedeiro (NICOLI & VIEIRA, 2000).

Produção de compostos com atividade antimicrobiana: os micro-organismos produzem substâncias que inibem o crescimento de vários micro-organismos patogênicos como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas e outros (FOOKS & GIBSON, 2002; RASTALL *et. al.*, 2005; SAAD, 2006).

Competição por nutrientes e sítios de adesão: consiste em uma exclusão competitiva, em que o probiótico compete com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo a sua fixação e o seu desenvolvimento. A exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada e as elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos (COPPOLA & TURNES, 2004; RASTALL *et. al.*, 2005; SNELLING, 2005).

Modulação do sistema imune do hospedeiro: estudos recentes apontam à atuação dos micro-organismos probióticos na modulação da resposta imune do hospedeiro saudável ou não como outro mecanismo (FEDORAK & MADSEN, 2004; RASTALL *et. al.*, 2005). Os probióticos podem estimular tanto a resposta imune não-específica quanto a específica. Acredita-se que esses efeitos sejam mediados pela ativação dos macrófagos, aumento dos níveis de citocinas, aumento da atividade das células destruidoras naturais (NK - “natural killer”) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (SAAD, 2006).

3 KEFIR

3.1 O kefir

O kefir é um leite fermentado refrescante, carbonatado e com um sabor levemente ácido produzido pela fermentação com grãos de kefir, os quais são compostos por uma mistura complexa de bactérias e leveduras, resultando, principalmente, na produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (GARROTE *et. al.*, 2001; LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006; SARKAR, 2007). O kefir é também conhecido como Kefyr, Kephir, Kefer, Kiaphur, Knapon, Kepi ou Kippi (FARNWORTH, 2005).

A FAO/WHO (2003) propôs uma definição do kefir baseada na composição dos grãos de kefir e do produto final, um leite fermentado produzido pela inoculação de grãos de kefir ou cultura iniciadora, compostos por *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, leveduras lactose-positiva e/ou lactose-negativa que crescem em sinergismo.

O kefir, segundo a legislação brasileira, é um leite fermentado resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado realizada com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono (BRASIL, 2007).

O kefir originou-se nas montanhas dos Cárpatos. Os grãos de kefir, historicamente, foram considerados um presente de Alá entre o povo muçulmano do norte das montanhas (GARROTE *et. al.*, 1997; LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006). Tradicionalmente, os caucasianos preparavam o kefir pela fermentação do leite em sacos feitos do couro cru (ou estômago) de animais. O leite fresco era adicionado do leite fermentado e após um tempo, ocorria um acúmulo de camadas de micro-organismos embebidos em um material com proteína e polissacarídeo e, eventualmente, a formação dos grãos (REA *et. al.*, 1996).

A palavra kefir é derivada da palavra, em Turco, *keif* a qual pode ser traduzida como “sentir-se bem”, sensação experimentada após ingeri-lo. Os grãos de kefir foram passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso, sendo estes considerados uma fonte de riqueza familiar (LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006).

O kefir ocupa um importante lugar na dieta humana em muitas partes do mundo, incluindo Sudoeste da Ásia, Europa Oriental, Norte da Europa, América do Norte, Japão, Oriente Médio, África do Norte e Rússia devido aos seus atributos nutricionais e terapêuticos (SARKAR, 2007). A produção artesanal do kefir é difundida em países como Argentina, Taiwan, Portugal, Turquia e França. No Brasil, o kefir ainda é pouco conhecido, apesar de ser fabricado a nível caseiro, principalmente por aquelas pessoas procedentes de países onde seu consumo é tradição (FARNWORTH, 2005).

3.2 Os grãos de kefir

Os grãos de kefir são uma massa gelatinosa irregular, branca ou levemente amarela, com uma textura fina, mas firme. Esses grãos apresentam uma estrutura similar à pipoca ou couve-flor e um diâmetro que varia de 0,3 a 3,5 cm (GARROTE *et. al.*, 1997; GARROTE *et. al.*, 2001; FARNWORTH, 2005). Eles são compostos, na maior parte, de proteínas e polissacarídeos nos quais existe uma microbiota diversa (GARROTE *et. al.*, 1997; TAMIME *et. al.*, 2001; SARKAR, 2007).

A microbiota presente nos grãos de kefir depende, principalmente, da sua origem. Há relatos que os grãos de kefir contêm *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e leveduras e, algumas vezes, bactérias ácido acéticas, dependendo da sua origem ou país de origem, assim como do método de cultivo e substrato adicionado. Essa microbiota, apesar de complexa, encontra-se em equilíbrio simbiótico, mas ela nem sempre se mantém constante (GUZEL-SEYDIM *et. al.*, 2005; DOGAN, 2010).

Na parte exterior dos grãos pode se observar um biofilme complexo e firmemente envolvido, enquanto a parte interior compreende, principalmente, um material não estruturado. A microbiota é dominada por células de leveduras limoniforme ou com filamentos longos crescendo em associação com bactérias em forma de cocos e de bacilos longos ou curtos. Os cocos são observados preferencialmente nas superfícies das células de leveduras, enquanto os bacilos são encontrados, principalmente, entre as células de leveduras (LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006).

A composição química dos grãos de kefir pode variar de 890-900 g/Kg de água, 2 g/Kg de lipídios, 30 g/Kg de proteínas, 60 g/Kg de carboidratos e 7 g/Kg de cinzas (GARROTE *et. al.*, 1997). Grãos de kefir originários da Rússia, Iugoslávia e Bulgária contêm aproximadamente 90% de água, 3,2% m/m de proteínas, 0,3% m/m de lipídios,

5,8% m/m de substâncias solúveis não-nitrogenadas e 0,7% m/m de cinzas. Valores similares têm sido encontrados em grãos de kefir provenientes da Suécia (GARROTE *et. al.*, 2001).

LIUT KEVICIUS & SARKINAS (2004) relataram grãos de kefir com 86,3% de umidade, 4,5% m/m de proteínas, 1,2% m/m de cinzas e 0,03% m/m de lipídios. GARROTE *et. al.* (2001) avaliaram grãos de kefir originários da Argentina os quais apresentaram 83% de umidade, 9,10% m/m de polissacarídeos e 4,5% m/m de proteínas.

Os grãos são mantidos viáveis por transferência diária para leite fresco e, em seguida, crescimento por aproximadamente 20 horas; durante esse tempo, os grãos, geralmente, aumentam sua massa em 25% (FARNWORTH, 2005). Esse aumento de massa dos grãos de kefir deve-se ao aumento na biomassa de micro-organismos junto ao aumento na quantidade da matriz composta por proteínas e polissacarídeos. Os grãos são, em geral, retirados do leite após o processo de fermentação e utilizados em uma nova fermentação (GARROTE *et. al.*, 2001).

Apesar da intensa pesquisa e muitas tentativas realizadas para produzir grãos de kefir a partir de culturas puras ou mistas, normalmente presentes nos grãos, nenhum resultado positivo foi relatado (LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ, 1990). Atualmente, novos grãos de kefir somente podem ser obtidos a partir do crescimento de grãos preexistentes (SHOEVEERS & BRITZ, 2003).

As populações de micro-organismos presentes nos grãos de kefir podem também ser preservadas por outros métodos, incluindo congelamento, liofilização, secagem e refrigeração. Pesquisas demonstraram que a preservação dos grãos de kefir por secagem e liofilização mantém sua atividade por 12 a 18 meses. Os grãos congelados e estocados a -20°C mantém atividade microbiana por 7 a 8 meses, enquanto os grãos estocados sob temperaturas de refrigeração demonstraram uma diminuição da atividade antes de 10 dias (WITTHUHN *et. al.*, 2005a).

Nos grãos de kefir, o polissacarídeo kefirano serve como uma matriz onde vivem as bactérias e leveduras. As vias metabólicas que levam à produção de kefirano não são completamente compreendidas, no entanto, sabe-se que esse polissacarídeo é composto por unidades repetitivas de hexa- e heptassacarídeos constituídos principalmente de glicose e galactose, com ramificações (FARNWORTH, 2005; GUZEL-SEYDIM *et. al.*, 2005), estruturada representada na Figura 1.

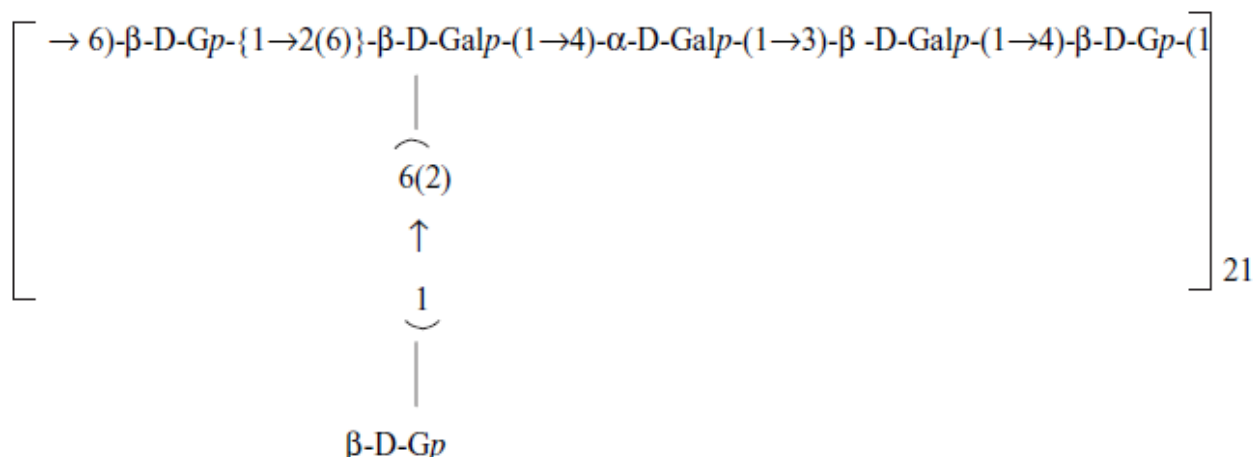


Figura 1: Proposta de estrutura química para o kefiran.

Fonte: FARNWORTH, 2005.

Desde o início do seu isolamento, tem sido relatado que o kefirano pode ser produzido por uma variedade de bactérias isoladas dos grãos de kefir obtido de diferentes fontes (FARNWORTH, 2005). Este exopolissacarídeo não está presente apenas nos grãos, mas também nos produtos fermentados (leite e soro) (RIMADA & ABRAHAM, 2003).

Há relatos que o kefirano possui atividade antibacteriana e antitumoral, modula o sistema imunológico do intestino e protege as células epiteliais contra *Bacillus cereus* (MAEDA *et. al.*, 2004; RODRIGUES *et. al.*, 2005; VINDEROLA *et. al.*, 2006; MEDRANO *et. al.*, 2007).

O kefirano também pode ser usado como aditivo alimentar para produtos fermentados a fim de realçar as propriedades reológicas dos géis de leites fermentados, aumentando sua viscosidade aparente e a estabilidade desses géis durante o armazenamento (WANG *et. al.*, 2008).

ABRAHAM & RIMADA (2006) demonstraram que as propriedades de viscosidade e viscoelasticidade dos géis ácidos foram melhoradas pela adição de kefiran, sugerindo uma possível aplicação deste polissacarídeo natural como um agente de corpo alternativo para produtos lácteos. A viscosidade intrínseca do kefiran é menor do que de alguns polissacarídeos utilizados como aditivos alimentares, como a goma guar (LAUNAY *et. al.*, 1997), mas é maior do que a viscosidade intrínseca de determinadas dextranas (ARMSTRONG *et. al.*, 2004).

3.3 Características

3.3.1 Características químicas

A composição físico-química do kefir varia, consideravelmente, com o tipo de leite empregado na fermentação. Um kefir típico contém 89-90% (m/m) de umidade, 0,2% de lipídios, 3,0% de proteína, 6,0% de carboidratos, 0,7% de cinzas e 1% de álcool e de ácido láctico. Há relatos que o kefir possui 1,98 g/L de dióxido de carbono e 0,48% de álcool, sendo que o conteúdo de CO₂ aumenta com a elevação da concentração de grãos de kefir (SARKAR, 2007).

Entretanto, a produção de CO₂ durante o manufaturamento do kefir, especialmente após a embalagem, apresenta alguns problemas práticos, visto que os micro-organismos (particularmente, as leveduras) no kefir continuam a crescer mesmo depois da estocagem. O recipiente utilizado para embalar o kefir deve ser suficientemente forte para suportar o acúmulo de pressão (por exemplo, vidro) ou flexível o suficiente para conter o volume de gás produzido (por exemplo, plástico) (FARNWORTH, 2005).

A composição físico-química para o kefir recomendada pela FAO/WHO (2003) e pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados (BRASIL, 2007) é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Padrões físico-químicos para o kefir.

Parâmetros	FAO/WHO (2003)	BRASIL (2007)
Proteína (%m/m)	mín. 2,8%	mín. 2,9%
Gordura (%m/m)	< 10,0%	3,0 a 5,9%
Ácido láctico (%m/m)	mín. 0,6%	<1,0%
Etanol (%v/m)	não mencionado	0,5 a 1,5%

Fonte: FAO/WHO, 2003; BRASIL, 2007.

TAMIME *et. al.* (2001) relataram que há diferenças significativas na quantidade de sólidos totais, proteína, carboidratos e cinzas entre kefir elaborados com diferentes tipos de leites. Essas diferenças no conteúdo de proteína (29 a 65 g/Kg), carboidratos (38 a 47 g/Kg) e cinzas (7 a 11 g/Kg) refletem as diferenças entre os leites das diferentes espécies de mamíferos. Entretanto, a quantidade de lipídios foi em torno de 30 g/Kg em todos os tipos de leites pois a quantidade de gordura dos leites é padronizada.

O leite de vaca na Rússia é utilizado para produção de kefir e gera um produto final que contém 0,8% de ácido láctico, 1% de etanol e de CO₂ (REA *et. al.*, 1996). A quantidade de lactose é reduzida aproximadamente em 25% no kefir em relação ao leite empregado na fermentação (IRIGOYEN *et. al.*, 2005) e o nível de β -galactosidase é aumentado como resultado da fermentação. As leveduras contribuem para a redução dos valores de lactose no produto final de kefir (MARQUINA *et. al.*, 2002).

O sabor e aroma únicos do kefir devem-se à atividade metabólica das diferentes espécies de bactérias ácido lácticas e leveduras presentes nos grãos. Os principais produtos finais da fermentação do kefir são ácido láctico, acetaldeído, etanol, acetoína, diacetil e dióxido de carbono (ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM, 2009; FERREIRA *et. al.*, 2010). O etanol e o dióxido de carbono conferem um aroma refrescante único e exótico ao kefir (BESHKOVA *et. al.*, 2003; LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006). O ácido láctico promove um ligeiro sabor ácido e amargo e o acetaldeído está relacionado ao sabor característico de leite fermentado (ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM, 2009).

Os seguintes compostos aromáticos foram detectados na produção de kefir, além de acetaldeído, diacetil e etanol: acetona, acetato de etila e 2-butanona. Em um estudo sobre produção de compostos carbonila na elaboração de kefir cultura iniciadora ou com grãos de kefir, encontrou-se acetaldeído, acetato de etila, 2-butanona, diacetil e etanol (BESHKOVA *et. al.*, 2003).

As concentrações de acetaldeído e acetoína aumentam durante a fermentação. E no decorrer do tempo de estocagem, a concentração de acetaldeído aumenta enquanto a de acetoína diminui. A produção de compostos voláteis (como, por exemplo, etanol, acetato de etila, 1-propanol, álcool isobutílico e álcool amílico) tem sido demonstrada ser dependente da temperatura de fermentação (FARNWORTH, 2005).

O sabor e aroma assim como a composição deste leite fermentado também variam dependendo do tipo de leite, processo tecnológico e origem dos grãos de kefir utilizados (MARSHALL, 1984).

3.3.2 Características microbiológicas

A composição microbiológica dos grãos de kefir é ainda controversa. Diferentes relatos indicam que a microbiota dos grãos de kefir depende fortemente da origem dos grãos, condições de cultivo e dos processos de produção e estocagem (GARROTE *et. al.*,

2001; WITTHUNN *et. al.*, 2005).

ABRAHAM & ANTONI (1999, citado por SARKAR, 2007) relataram que aproximadamente 0,9% do peso seco total do kefir é representado pela sua microbiota. A atividade do grão depende da viabilidade da microbiota. Bactérias ácido lácticas e leveduras coexistem em uma associação simbiótica e são responsáveis pelas fermentações ácido láctica e alcoólica, respectivamente (GARROTE *et. al.*, 1997).

O crescimento de espécies distintas de bactérias e leveduras nos grãos de kefir pode ser estimulada ou inibida pelo número e linhagens de bactérias e leveduras existentes, pela competição entre os micro-organismos por nutrientes do meio e/ou pela produção de metabólitos (LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006), resultando em grãos com uma microbiota em constante mudança e, conseqüentemente, um leite fermentado sem um padrão de qualidade.

Nos grãos de kefir, geralmente, as bactérias lácticas são mais numerosas (10^8 - 10^9 UFC/mL) que as leveduras (10^5 - 10^6 UFC/mL) e bactérias ácido acéticas (10^5 - 10^6 UFC/mL), embora as condições de fermentações possam afetar esse padrão (FARNWORTH, 2005). Estudos indicam que o conteúdo de bactérias no kefir varia de $6,4 \times 10^4$ a $8,5 \times 10^8$ UFC/g e de leveduras de $1,5 \times 10^5$ a $3,7 \times 10^8$ UFC/g (SARKAR, 2007).

IRIGOYEN *et. al.* (2005) relataram uma população viável de 10^8 UFC/mL de *Lactobacillus* e *Lactococcus* e 10^5 UFC/mL de leveduras, e ainda 10^6 UFC/mL de bactérias ácido acéticas após 24 horas em fermentação de amostras de kefir elaborado com adição de grãos em porcentagens distintas. Em outro trabalho encontrou-se 78,3% ($1,59 \times 10^9$ UFC/g) de *Lactobacillus*, 0,9% ($1,64 \times 10^7$ ufc/g) de *Lactococcus* e 20,8% ($4,23 \times 10^8$ UFC/g) de leveduras (GARROTE *et. al.*, 1997). Segundo a legislação brasileira, o kefir deve apresentar contagens mínimas de 10^7 UFC/g de bactérias lácticas totais e de 10^4 UFC/g de leveduras específicas (BRASIL, 2007).

A composição da microbiota dos grãos de kefir, culturas iniciadoras do kefir e a bebida do kefir variam consideravelmente em termos de bactérias e leveduras (SARKAR, 2007) como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3: Contagem de micro-organismos em grãos de kefir, cultura iniciadora do kefir e na bebida.

Micro-organismos	Grãos de kefir (UFC/g)	Cultura iniciadora (UFC/mL)	Bebida (UFC/mL)
<i>Lactococcus</i>	10^6	$10^8 - 10^9$	10^9
<i>Leuconostoc</i>	10^6	$10^7 - 10^8$	$10^7 - 10^8$
<i>Lactobacillus</i> termófilos	10^8	10^5	$10 - 10^8$
<i>Lactobacillus</i> mesófilos	$10^6 - 10^9$	$10^2 - 10^3$	-
Bactérias ácido-acético	10^8	$10^5 - 10^6$	$10^4 - 10^5$
Leveduras	$10^6 - 10^8$	$10^5 - 10^6$	$10^4 - 10^5$

Fonte: adaptado de SARKAR, 2007.

A Tabela 4 apresenta os micro-organismos isolados do kefir e identificados por diferentes autores.

MOTAGHI *et. al.* (1997) isolaram e identificaram os micro-organismos presentes em um kefir tradicional produzido no Irã. No total, foram isolados e identificados 11 tipos de micro-organismos, incluindo bactérias lácticas, bactérias não ácido lácticas e leveduras. As bactérias predominantes foram *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Acetobacter aceti*. E as leveduras identificadas foram *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces lactis* e *Candida kefir* (MOTAGHI *et. al.*, 1997).

A produção de álcool durante a fermentação para produção do kefir é principalmente devido às leveduras, contudo também pode resultar do co-metabolismo da lactose e citrato pelos *Leuconostoc* (REA *et. al.*, 1996). Há evidências que as leveduras têm um importante papel na preparação de produtos lácteos fermentados, nos quais elas podem fornecer, além de etanol e CO₂, nutrientes essenciais como aminoácidos e vitaminas, e alterar o pH do meio (FARNWORTH, 2005).

O D- e o L-lactato são os produtos formados em maior quantidade durante a fermentação para produção do kefir e são produzidos pelos *Lactococcus* e *Lactobacillus*, e *Leuconostoc*, respectivamente. Ao final da fermentação a quantidade do isômero L produzido é 10 vezes maior que a do isômero D devido ao aumento do número de *Lactococcus* comparado ao de *Leuconostoc* (REA *et. al.*, 1996).

Tabela 4: Micro-organismos encontrados no kefir descritos na literatura.

Referências	Micro-organismos isolados e identificados
<p>GARROTE <i>et. al.</i>(2001), WITTHUNN <i>et. al.</i> (2005), SARKAR (2007), CHEN <i>et. al.</i> (2008), JIANZHONG <i>et. al.</i> (2009).</p>	<p>Bactérias ácido-láticas: <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus kefir</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus viridescens</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> <i>Lactobacillus kefirgranum</i> <i>Lactobacillus parakefir</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i></p>
<p>MARSHALL <i>et. al.</i> (1984) GARROTE <i>et. al.</i>(2001), SARKAR (2007), JIANZHONG <i>et. al.</i> (2009).</p>	<p>Leveduras: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Saccharomyces delbrueckii</i> <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>Torulopsis holmii</i> <i>Candida holmii</i> <i>Torulasporea delbrueckii</i> <i>Torulasporea delbrus</i> <i>Candida friedricchii</i> <i>Candida kefir</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Pichia fermentum</i> <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> <i>Debaryomyces hansenii</i> <i>Kazachstania unispora</i> <i>Kazachstania exigua</i></p>
<p>GARROTE <i>et. al.</i>(2001)</p>	<p>Bactéria ácido-acética: <i>Acetobacter aceti</i></p>

Leuconostoc mesenteroides, uma bactéria láctica heterofermentativa, constitui outro micro-organismo dominante que produz compostos aromáticos, pode degradar lactose a ácido láctico, ácido acético, etanol e CO₂, e degradar ácido cítrico a diacetil, proporcionando um sabor agradável (JIANZHONG *et. al.*, 2009). O acúmulo de lactato produzido pelos *Lactobacillus* leva a rápida redução do pH do meio inibindo a produção deste metabólito e favorecendo a produção de compostos responsáveis pelo aroma e sabor característicos do leite fermentado (LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006).

3.3.3 Características nutricionais

Os atributos nutricionais do kefir são devido aos componentes químicos como as vitaminas, proteína e minerais sendo que o processo de fermentação induz o aumento do seu perfil nutricional (SARKAR, 2007). O kefir é rico em vitamina B₁, B₁₂, cálcio, aminoácidos essenciais, ácido fólico e vitamina K (OTLES & CADINGI, 2003).

Vitaminas – O conteúdo de vitaminas do kefir é influenciado pelo tipo de leite e a microbiota (SARKAR, 2007). Foi relatado que quantidades consideráveis de piridoxina, vitamina B₁₂, ácido fólico e biotina são sintetizadas durante a fermentação do kefir, enquanto os níveis de tiamina e riboflavina diminuem (FARNWORTH, 2005).

O kefir constitui uma boa fonte de biotina, uma vitamina B que auxilia no sistema digestivo. Os numerosos benefícios das vitaminas B vão da regulação dos rins, fígado e sistema nervoso ao auxílio no alívio de distúrbios de pele, aumento da energia e promoção da longevidade (OTLES & CADINGI, 2003).

Minerais – O cálcio e o magnésio são abundantes no kefir, os quais são importantes minerais para o bom funcionamento do sistema nervoso e outros. Essa bebida também constitui boa fonte de fósforo, o segundo mineral mais abundante no corpo humano que auxilia na utilização dos carboidratos, gorduras e proteínas para o crescimento das células (OTLES & CADINGI, 2003). LIUT KEVIVIUS & SARKINAS (2004) relataram a presença de macro minerais como potássio, cálcio, magnésio, fósforo e micro minerais como cobre, zinco, ferro, manganês, cobalto e molibdênio no kefir.

Proteínas – O kefir possui proteínas íntegras e parcialmente digeridas, facilitando a utilização delas pelo organismo (OTLES & CADINGI, 2003). Os aminoácidos valina, leucina, lisina e serina são formados durante a fermentação do kefir, enquanto a alanina e o ácido aspártico aumentam quando comparados ao leite (FARNWORTH,

2005).

O espectro e o nível de aminoácidos livres nos leites fermentados dependem de diversas variáveis como o tipo de leite, a composição da cultura iniciadora, método de preparação e condições de estocagem (SIMOVA *et. al.*, 2006).

3.3.4 Características terapêuticas

Há uma crença antiga, especialmente na Europa oriental de que o kefir oferece benefícios à saúde. Há vários componentes no kefir que podem apresentar propriedades bioativas (FARNWORTH, 2005).

Tem sido postulado que a longevidade dos camponeses búlgaros é parcialmente devida ao consumo frequente de kefir (LIU *et. al.*, 2006). Em países soviéticos, o kefir tem sido recomendado para o consumo, a fim de reduzir o risco de doenças crônicas e também tem sido indicado para certos pacientes para tratamento clínico de um número de doenças metabólicas e gastrointestinal, hipertensão, doença isquêmica do coração e alergia (CHEN *et. al.*, 2008).

Atividade antimicrobiana – O kefir possui atividade antimicrobiana *in vitro* contra uma ampla variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e alguns fungos (ULUSOY *et. al.*, 2007; PĂUCEAN & SOCACIU, 2008). O mecanismo exato da atividade inibitória do kefir não está completamente esclarecido, contudo há sugestões de que alguns compostos inibitórios do kefir, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, e ácidos orgânicos, possam ser responsáveis pela morte dos micro-organismos patogênicos (PĂUCEAN & SOCACIU, 2008; SILVA *et. al.*, 2009).

VAN WYK (2001) observou que o kefir possui atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium tyobutyricum* e *Listeria monocytogenes*. ULUSOY *et. al.* (2007) demonstraram que o kefir possui atividade antibacteriana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, sendo que se observou melhor efeito antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*.

A atividade antimicrobiana do kefir produzido com três diferentes fontes de carboidrato pelos grãos de kefir foi determinada por SILVA *et. al.* (2009). Os autores verificaram que o fermentado do açúcar mascavo promoveu a maior atividade antimicrobiana, produzindo halos de inibição correspondentes a 35, 14, 12, 14 e 14 mm

para *Candida albicans*, *Salmonella typhi*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Sendo que diferentes fontes de carbono, concentrações e o tempo de fermentação, influenciaram o tamanho dos halos de inibição contra micro-organismos patogênicos.

RODRIGUES *et. al.* (2005) avaliaram a atividade antimicrobiana do kefir e seu polissacarídeo insolúvel, kefiran, contra várias espécies de bactérias e *Candida albicans* e a atividade cicatrizante do gel kefir 70% em camundongos com lesões dorsais infectadas com *Staphylococcus aureus*. O kefir e kefiran apresentaram atividade contra todos os micro-organismos testados, sendo os valores médios das zonas de inibição do kefir e do kefiran iguais a $28,0 \pm 2,0$ mm e $26,3 \pm 2,1$ mm, respectivamente. O gel de kefir apresentou um efeito protetor sobre a pele do tecido conjuntivo e, após 7 dias de tratamento, melhor cicatrização comparado à emulsão de clostebol-neomicina.

Efeito no trato gastrointestinal – Além dos compostos inibitórios produzidos pelos micro-organismos presentes no kefir, as bactérias podem promover adesão competitiva a superfície epitelial gastrointestinal protegendo o organismo de micro-organismos patogênicos (PĂUCEAN & SOCACIU, 2008; SILVA *et. al.*, 2009).

SANTOS *et. al.* (2003) demonstraram que duas cepas de micro-organismos (*Lactobacillus acidophilus* CYC 10051 e *Lactobacillus kefiranofaciens* CYC 10058) isoladas do kefir apresentaram capacidade de adesão às células do cólon humano (células Caco-2) e de inibir a aderência da *Salmonella* Typhimurium, além de uma atividade antimicrobiana contra várias estirpes patogênicas, dois dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos.

MARQUINA *et. al.* (2002) avaliaram a influência da administração de kefir na microbiota do trato gastrointestinal de camundongos e as mudanças nesta população de micro-organismos e relataram que a administração de kefir aumentou significativamente a contagem de bactérias ácido lácticas na mucosa intestinal dos camundongos. E a ingestão de kefir diminuiu especificamente as populações de *Enterobacteriaceae* e *Clostridia*.

LIU *et. al.* (2006a), estudando o efeito da administração oral de kefir obtidos da fermentação de dois tipos de leite pelos grãos no ecossistema intestinal de camundongos, observaram que o consumo de kefir-leite ou kefir-soja durante 28 dias aumentou significativamente as populações de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, enquanto diminuiu

significativamente as populações fecais de *Clostridium perfringens*.

Estimulação do sistema imune – Vários compostos, incluindo DNA bacteriano solúvel, bem como metabólitos produzidos durante a fermentação do leite, tais como peptídeos ativos e o kefiran, podem ser responsáveis pela imunomodulação (HONG *et. al.*, 2009).

HONG *et. al.* (2009), investigando a capacidade de imunomodulação *in vitro*, observaram que frações de kefir, sobrenadante obtido após centrifugação, *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 e seu sobrenadante induziram a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e as interleucinas IL-1 β , IL-6 and IL-12. Isto sugere que o sobrenadante de kefir pode ser capaz de promover respostas imunológicas mediadas por células contra tumores e infecções por patógenos intracelulares.

VINDEROLA *et. al.* (2006b) investigaram *in vivo* a capacidade imunomoduladora do exopolissacarídeo (EPS) produzido pelo *Lactobacillus kefiranofaciens* ATCC 43761 e indicaram que o EPS pode melhorar a produção de IgA tanto no intestino delgado quanto no cólon e influenciar a imunidade sistêmica pela liberação de citocinas no sangue.

A administração oral de sobrenadante de kefir em camundongos induziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-6, em macrófagos peritoneais, mas não a IL-1 α (VINDEROLA *et. al.*, 2006a).

Atividade de β -galactosidase – A má digestão da lactose afeta aproximadamente 75% da população adulta do mundo e ocorre mais frequentemente como resultado de uma diminuição programada geneticamente da atividade da lactase no intestino após 3 a 5 anos de idade (SWAGGERTY *et. al.*, 2002).

O termo “intolerância à lactose”, muitas vezes, é utilizado como sinônimo de má digestão de lactose, mas esse uso não está necessariamente correto (HERTZLER & CLANCY, 2003). A má digestão ocorre quando uma quantidade substancial de lactose não é digerida no intestino. A intolerância à lactose indica que a má digestão de lactose provoca sintomas gastrointestinais, como dor abdominal, flatulência, distensão abdominal, náusea ou diarreia (SHAUKAT *et. al.*, 2010).

Os grãos de kefir possuem atividade de β -galactosidase e o kefir pode ser igualmente efetivo, como o iogurte, na redução dos sintomas em adultos intolerantes a lactose. O kefir contém menos lactose que o leite e sua ingestão melhora a digestão

desse carboidrato e reduz a gravidade da flatulência de 54-71% em contraste com o leite (LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006; SARKAR, 2007). O conteúdo de lactose diminui e os níveis de β -galactosidade aumentam como resultado da fermentação (OTLES & CADINGI, 2003).

HERTZLER & CLANCY (2003) realizaram o primeiro estudo em adultos com má digestão da lactose e demonstraram que o kefir melhora a digestão da lactose tão bem como o iogurte natural. Isso poderia ser explicado, em parte, pela elevada atividade da enzima β -galactosidade encontrada no kefir, a qual foi 60% maior do que a do iogurte natural.

Efeito hipocolesterolêmico – As doenças cardiovasculares (DCV) representam a maior causa de morte em países ocidentais. Um elevado nível de colesterol total está, geralmente, relacionado ao risco de DCV (HASLER, 2002).

LIU *et. al.* (2006) observaram que os níveis de triglicerídeos séricos, as concentrações de colesterol total, o acúmulo de colesterol no fígado e a concentração de colesterol, principalmente da fração não-HDL, foram significativamente reduzidos pela dieta com leite de soja, kefir de leite ou kefir de soja em hamster por oito semanas.

Os mecanismos envolvidos na atividade hipocolesterolêmica das bactérias lácticas poderiam estar relacionados à inibição da absorção de colesterol exógeno pelo intestino, à ligação do colesterol e ácidos biliares a células bacterianas e assimilação do colesterol, bem como à supressão da reabsorção de ácidos biliares por desconjugação dos sais biliares pela atividade hidrolase das bactérias (XIAO *et. al.*, 2003).

Inibição do crescimento de tumor – Alguns estudos encontraram evidência do efeito inibidor do kefir sobre o desenvolvimento de tumores e a proliferação de células cancerígenas (NANINE *et. al.*, 2009).

A atividade antimutagênica do kefir foi determinada por LIU *et. al.* (2005) utilizando por meio do ensaio de mutagenicidade com *Salmonella*. Eles observaram que tanto o kefir do leite quanto o kefir do leite de soja demonstraram uma atividade antimutagênica significativa maior do que o leite e leite de soja e sugerem que a atividade antimutagênica do kefir de leite pode ser atribuída, em parte, à liberação de peptídeos das proteínas do leite durante a fermentação.

LIU *et. al.* (2002) demonstraram que administração oral de kefir de leite de soja inibiu o crescimento tumoral e induziu a apoptose das células tumorais, além de aumentar

os níveis de IgA em extratos do tecido da parede do intestino delgado de camundongos.

Alergias – Estudos demonstram que a ingestão de kefir liofilizado reduz a resposta inflamatória da mucosa brônquica provocada por reação alérgica em camundongos e diminui a taxa de indicadores da resposta imune (IgE e citocinas) e, em paralelo, as manifestações asmáticas de constrição dos brônquios e a produção de muco ocasionada pela resposta imune a alérgenos (NINANE *et. al.*, 2009).

LEE *et. al.* (2007) demonstraram que o kefir suprimiu significativamente a inflamação alérgica das vias aéreas e hiper-responsividade em um modelo animal de asma e também observaram que estes efeitos do kefir estão relacionados à atividade diminuída da IgE no fluido broncoalveolar lavado e das citocinas. Esses resultados apóiam a hipótese de que o kefir pode ser utilizado na terapia em pacientes com inflamação alérgica das vias aéreas.

A administração oral de kefir de leite ou kefir de leite de soja em camundongos durante 28 dias reduziu significativamente ($p < 0,05$) a secreção de IgE e IgG1 induzida por ovalbumina, enquanto a secreção de IgG2a não foi inibida. Esses resultados sugerem que o kefir de leite e de leite de soja podem contribuir para a prevenção de alergias (LIU *et. al.*, 2006a).

3.3.5 Métodos de fabricação

O kefir pode ser produzido pela inoculação do leite com grãos de kefir ou com culturas puras isoladas dos grãos (SARKAR, 2008). A produção do kefir comercial utiliza leite de vaca cru, pasteurizado ou UHT, mas também pode ser feito de leite de ovelha, cabra e búfala. Além disso, a produção de kefir empregando leite de soja tem sido recentemente relatada (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006).

Durante o início do processo de fermentação do leite os *Streptococcus* homofermentativos crescem rapidamente, levando, inicialmente, a diminuição do pH. O pH baixo favorece o crescimento de *Lactobacillus*, mas causa o declínio do número de *Streptococcus*. A presença de leveduras, aliada a temperatura de fermentação, favorece o crescimento de *Streptococcus* heterofermentativos produtores de aroma. À medida que a fermentação prossegue, as bactérias ácido-lácticas crescem em detrimento do crescimento de leveduras e bactéria acéticas (FARNWORTH, 2005).

As características e qualidade do kefir podem ser influenciadas por inúmeros

fatores, entre estes se destacam: o número de micro-organismos e a proporção de espécies entre si, a razão grãos:leite, temperatura e tempo de incubação, agitação durante a fermentação, higiene durante a separação dos grãos, lavagem dos grãos e armazenamento sob refrigeração (GARROTE *et. al.*, 1998; GUZEL-SEYDIM *et. al.*, 2005; ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM, 2009).

O método tradicional ou artesanal de fabricação do kefir ocorre pela adição direta dos grãos de kefir ao leite. O leite contendo 3% de gordura é homogeneizado e pasteurizado a uma faixa de temperatura de 90° a 95°C durante 5 a 10 minutos. O leite é resfriado entre 18° a 24°C e inoculado com 2 a 8% de grãos de kefir. A fermentação é realizada a 22°C durante um período de tempo que varia de 18 a 24 horas. O coágulo é resfriado lentamente de 3° a 10°C durante 24 horas (OTLES & CADINGI, 2003). Os grãos de kefir são separados do leite fermentado utilizando uma peneira e lavados com água esteril antes de serem usados novamente (FARNWORTH, 2005; LOPITZ-OTSOA *et. al.*, 2006). O kefir é distribuído em garrafas de vidro esteréis e estocado sob refrigeração a 4°C (OTLES & CADINGI, 2003).

O método tradicional resulta na produção de kefir sem um padrão de qualidade, pois a microbiota diversificada e variável dos grãos dificulta a obtenção de um inóculo com uma composição ideal e constante (GARROTE *et. al.*, 1998, SARKAR, 2008).

Processos de produção de kefir utilizando culturas puras isoladas do grão de kefir tem resultado em um leite fermentado com características físico-químicas e sensoriais semelhantes ao kefir tradicional (ASSADI *et. al.*, 2000; BESHKOVA *et. al.*, 2002; CARNEIRO, 2010), eliminando, assim, os problemas decorrentes do uso de grãos de kefir e viabilizando a fabricação de um produto padronizado pela indústria de laticínios (ASSADI *et. al.*, 2000; BESHKOVA *et. al.*, 2002).

Dois métodos utilizando culturas puras têm sido sugeridos para superar as desvantagens do método tradicional de produção: o kefir pode ser produzido pelo método com culturas puras por fermentação simultânea (adiciona-se ao leite uma cultura iniciadora composta de bactérias e leveduras e ocorre, simultaneamente, as fermentações láctica e alcoólica) e pelo método com culturas puras por fermentação sucessiva (primeiro o leite é submetido a uma fermentação láctica por bactérias ácido lácticas e, em seguida, a uma fermentação alcoólica por leveduras) (SARKAR, 2008).

MOTAGHI *et. al.* (1997) relataram várias razões de se utilizar culturas iniciadoras

contendo bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras isoladas de grãos de kefir e as usaram para a produção de kefir. Os produtos foram avaliados quanto sua qualidade sensorial (cor, aroma, sabor, acidez, efervescência e viscosidade) e considerados pelo painel de provadores como aceitáveis.

BESHKOVA *et. al.* (2002) produziram uma cultura iniciadora contendo duas bactérias (*Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) isoladas de grãos de kefir e combinou com duas cepas de iogurtes (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). O leite fermentado produzido a partir dessas culturas puras apresentou altos números de lactobacilos e cocos viáveis e propriedades organolépticas e químicas similares as do kefir tradicional.

Nos EUA, o kefir é produzido empregando apenas culturas iniciadoras contendo *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus diacetylactis*, *Leuconostoc cremoris* e *Saccharomyces florentinus* (HERTZLER & CLANCY, 2003).

4 MICROBIOTA NORMAL DO TRATO INTESTINAL HUMANO

O trato intestinal de um humano adulto abriga uma microbiota composta aproximadamente por 100 trilhões de micro-organismos, de 700 a 1000 espécies diferentes, com um peso em torno de 1,2Kg (NICOLI & VIEIRA, 2003), a qual exerce um grande impacto sobre a saúde e o estado nutricional do hospedeiro (LAPARRA & SANZ, 2010). SAVAGE (1977) definiu o termo microbiota como população de micro-organismos que habita superfícies mucosas de indivíduos saudios

Ao nascer, tanto seres humanos como animais apresentam um trato gastrointestinal estéril, contudo, logo após o parto, ocorre imediatamente a colonização do trato gastrointestinal com micro-organismos provenientes da mãe e do ambiente (BARBOSA *et. al.*, 2006). A maioria da microbiota intestinal saudável é derivada da mãe. Assim, fatores como dieta, ambiente e estresse durante a gravidez e o nascimento influenciam a composição da microbiota da mãe e, conseqüentemente, no inóculo transferido para a criança ao nascer. Portanto, o desenvolvimento da microbiota do recém-nascido é fortemente dependente das práticas de alimentação e da higiene do ambiente (SALMINEN & ISOLAURI, 2006).

Após completar essa colonização (um a dois anos, no ser humano), o trato gastrointestinal passa a abrigar uma comunidade microbiana que é extremamente densa e diversa, variando quantitativamente, qualitativamente e metabolicamente em função da espécie animal, da localização transversal e longitudinal no trato digestivo, e idade do hospedeiro (NICOLI, 1995). Esta comunidade é composta por 10^{14} UFC de micro-organismos, número dez vezes maior que o de células do hospedeiro (MARTINS *et. al.*, 2005). Os micro-organismos do intestino humano podem ser classificados em dois grupos: (1) microbiota residente, compõe-se de tipos relativamente fixos de micro-organismos encontrados com regularidade em determinada área, e ao ser perturbada, recompõe-se rapidamente; e (2) microbiota transitória, consiste de micro-organismos não ou potencialmente patogênicos que permanecem no local por horas, dias ou semanas, são provenientes do meio ambiente, mas não se estabelecem de forma permanente na superfície do intestino (ISOLAURI *et. al.*, 2004; BARBOSA *et. al.*, 2006).

O crescimento de micro-organismos em determinada área do trato gastrointestinal depende de fatores fisiológicos, como temperatura, umidade e presença de certos nutrientes e substâncias inibitórias (HOLZAPFEL *et. al.*, 1998). Assim, a distribuição da microbiota intestinal é desigual, com baixas concentrações de bactérias no estômago e no duodeno (10^3 - 10^6 UFC/g), médias no jejuno e íleo (10^4 - 10^8 UFC/g) e maiores concentrações de bactérias encontram-se no cólon (10^9 - 10^{11} UFC/g). A microbiota intestinal inclui 800 espécies diferentes de bactérias com mais 7000 cepas (MONTALTO *et. al.*, 2009)

Na porção superior do intestino, predominam os *Lactobacillus* e *Enterococcus* (BARBOSA *et. al.*, 2006). No cólon humano, três níveis distintos podem ser diferenciados: (1) a microbiota dominante (99% da população; 10^9 a 10^{11} UFC/g de conteúdo), constituída somente por bactérias anaeróbias obrigatórias (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*); (2) a microbiota subdominante (0,99% da população; 10^7 a 10^8 UFC/g de conteúdo), predominantemente anaeróbia facultativa (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*) e (3) a microbiota residual (0,01% da população; $< 10^7$ UFC/g de conteúdo), contendo uma grande variedade de micro-organismos procarióticos (outras espécies de enterobactérias, *Pseudomonas*) e eucarióticos (leveduras e protozoários) (NICOLI & VIEIRA, 2003).

A atividade total da microbiota intestinal é comparável à atividade metabólica do fígado, nosso órgão mais ativo metabolicamente (ISOLAURI *et. al.*, 2004). A atividade

metabólica desenvolvida pela microbiota do intestino contribui para digestão de componentes da dieta, fornecimento de energia e de micronutrientes, e na transformação de xenobióticos (LAPARRA & SANZ, 2010).

A fermentação de diferentes tipos de oligossacarídeos pela microbiota (como, por exemplo, fibras alimentares) produz ácidos graxos de cadeia curta (ácidos acético, propiônico e butírico), os quais podem ser absorvidos pela mucosa intestinal e servir de substrato energético e/ou de metabólito regulador para o hospedeiro. Alguns micro-organismos da microbiota são capazes de sintetizar vitaminas como vitamina B₁₂ e K (CANI, 2009) e isoprenóides. A atividade da microbiota ainda contribui para a desconjugação e desidroxilação de ácidos biliares, e metabolismo de aminoácidos (LAPARRA & SANZ, 2010).

Uma microbiota intestinal equilibrada confere benefícios ao hospedeiro, enquanto os desequilíbrios estão associados a doenças metabólicas e imunes (LAPARRA & SANZ, 2010). Essa microbiota também promove proteção contra micro-organismos patogênicos (ISOLAURI *et. al.*, 2004; SALMINEN & ISOLAURI, 2006). A presença da microbiota também estimula o peristaltismo, o sistema imune e a maturação e renovação das células epiteliais do cólon (MARTINS *et. al.*, 2005; SAAD, 2006). O metabolismo bacteriano de alguns medicamentos, como a sulfassalazina, dentro do lúmen intestinal é essencial para a liberação de seus princípios ativos (QUIGLEY, 2010).

Durante a vida adulta, a composição da microbiota intestinal em nível de espécie é relativamente estável. Ao nível de cepa, entretanto, pode ocorrer grande variação durante um curto período de tempo (TIIHONEN *et. al.*, 2010). A microbiota em adultos pode ser afetada em consequência de variações na dieta, condições patológicas (como infecções entéricas), terapia com antibióticos, tratamento antiácido ou imunossupressão (MONTALTO *et. al.*, 2009). A microbiota, quando perturbada, tem uma capacidade notável para se restaurar e voltar ao estado exatamente igual ao que era antes (QUIGLEY, 2010).

Esta estabilidade relativa é reduzida com o envelhecimento. O aumento da incidência de doenças e, conseqüentemente, o uso de medicação, associados à idade avançada, podem também modificar a composição da microbiota intestinal (TIIHONEN *et. al.*, 2010).

Além das mudanças na composição da microbiota intestinal, ocorrem também mudanças nas atividades dos micro-organismos, permanência prolongada de micro-

organismos no cólon, deslocando o equilíbrio para a putrefação. Como consequência das alterações na atividade microbiana, os indivíduos podem se tornar mais susceptíveis aos riscos de desnutrição, infecções sistêmicas e efeitos colaterais dos medicamentos. Além disso, o aumento dos substratos metabólicos formados pela putrefação pode aumentar o risco de câncer de cólon (HUGHES *et al.*, 2000; RASTALL *et al.*, 2005).

5 O GÊNERO *SALMONELLA*

As bactérias do gênero *Salmonella* são bastonetes Gram-negativos, não esporulados, com cerca de 0,5 a 0,7 por 1 a 3 µm. São móveis por meio de flagelos e, anaeróbicos facultativos (COBURN *et al.*, 2007; SANGALETTI, 2007). O *habitat* dos micro-organismos do gênero *Salmonella* é principalmente o trato digestivo de animais de sangue quente e do homem (WEILL, 2008).

A temperatura ótima de crescimento encontra-se na faixa de 35° a 37°C, podendo multiplicar-se em temperaturas que variam de 5° a 47°C e o pH ótimo de crescimento é próximo da neutralidade (6,6 a 8,2). Apresentam sensibilidade aos tratamentos térmicos e, se congeladas, ocorre uma redução significativa do número de células (SANGALETTI, 2007).

As *Salmonella* spp. geralmente são incapazes de fermentar lactose (alguns sorovares podem utilizar este açúcar), sacarose e salicina, contudo a glicose e outros monossacarídeos podem ser fermentados com produção de gás. Embora os aminoácidos sejam usados como fonte de nitrogênio, a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em alguns casos utiliza nitratos, nitritos e NH₃ como únicas fontes de nitrogênio (JAY, 2005).

O primeiro microrganismo desse gênero, *Salmonella choleraesuis*, foi isolado do intestino de um porco, em 1884, por um bacteriologista americano, D. E. Salmon. O gênero *Salmonella* pertence à família da *Enterobacteriaceae* e apresenta duas espécies, *S. enterica* (maioria) e *S. bongori* (espécie rara) (LIN-HUI SU *et al.*, 2007). A *S. enterica* divide-se em seis subespécies as quais são referidas por um número romano e um nome (I, *S. enterica* subsp. *enterica*; II, *S. enterica* subsp. *salamae*; IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV, *S. enterica* subsp. *houtenae*; and VI, *S. enterica* subsp. *indica*), e que são diferenciadas bioquimicamente e pelo genoma (BRENNER *et al.*, 2000).

Mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* foram identificados (WEILL, 2008). O gênero *Salmonella* compreende uma grande população de patógenos clinicamente importantes. E tem sido muito associado com amplo espectro de doenças infecciosas, incluindo febre tifoide e salmoneloses, causa de problemas mundiais de saúde pública (LIN-HUI SU *et. al.*, 2007). Embora as estimativas variem muito devido à falta de diagnósticos consistentes e relatórios, entre 200 milhões e 1,3 bilhões casos de doenças intestinais incluindo 3 milhões de mortes devido a salmoneloses são estimadas a cada ano no mundo inteiro. As espécies *S. enterica* são patógenos tipicamente adquiridos por via oral que causam de uma a quatro principais síndromes: febre tifoide, enterocolite/diarreia, bacteremia e o hospedeiro torna-se portador assintomático crônico (COBURN *et. al.*, 2007).

As principais síndromes clínicas associadas a infecção por *Salmonella* são a febre tifoide e as gastroenterites. A febre tifoide é uma doença sistêmica que resulta da infecção com patógenos exclusivamente humanos, *S. typhi* e *S. paratyphi*. As manifestações clínicas incluem febre, dor abdominal, diarreia ou constipação. A marca patológica da febre tifoide é a infiltração de células mononucleares e hipertrofia de sistema reticuloendotelial, incluindo as placas intestinais de Peyer, os gânglios linfáticos mesentéricos, baço e medula óssea. Em contrapartida, algumas cepas de *Salmonella* não tifoide, como *S. enteritidis* e *S. typhimurium* infectam uma grande variedade de hospedeiros animais, incluindo aves, bovinos e suínos, e geralmente causa gastroenterites autolimitada em humanos. A infecção por *S. typhimurium*, em certas linhagens de camundongos, produz uma doença semelhante à febre tifoide, funcionando, assim, como um modelo experimental para infecções sistêmicas por *Samonella* (OHL & MILLER, 2001).

As salmonelas são tipicamente adquiridas pelo consumo de alimentos e água contaminados. Após a passagem pelo estômago, a bactéria coloniza o intestino, interagindo e translocando através do epitélio intestinal via três meios: (1) invasão ativa dos enterócitos; (2) invasão das células M; e (3) através das células dendríticas (GRASSL & FINLAY, 2008).

Os sintomas da infecção alimentar por *Salmonella* surgem em torno de 12 a 14 horas após a ingestão dos alimentos (há relatos de períodos mais curtos e longos), e consistem de náuseas, vômitos, dores abdominais, dor de cabeça, calafrios e diarreia acompanhados, geralmente, por fraqueza, fadiga muscular, febre moderada, nervosismo

e sonolência (JAY, 2005).

6 VIDA-DE-PRATELEIRA DE LEITES FERMENTADOS

A vida-de-prateleira de um alimento pode ser definida como o intervalo de tempo necessário para que um produto armazenado sob condições adequadas alcance um ponto no qual o produto não atenda mais a certos critérios determinados por testes sensoriais (aceitação, descritivos, discriminação), microbiológicos e/ou físico-químicos (DE MARCHI, 2006). A vida-de-prateleira também pode ser conceituada como o tempo no qual o alimento pode ser estocado em determinadas condições de temperatura, umidade relativa, luz, etc., sofrendo pequenas, mas bem estabelecidas alterações que são, até certo ponto, consideradas aceitáveis pelo fabricante, consumidor e pela legislação alimentar vigente (VITALI & QUAST, 1996).

A identificação, em primeiro lugar, das características dos ingredientes, os processos e as condições de armazenamento do alimento que influenciam o tempo de vida útil do produto é necessária para avaliar a vida-de-prateleira (LEWIS & DALE, 2000). O critério empregado para determinar o fim da vida-de-prateleira de um produto é estabelecido a partir de requerimentos legais, critérios sensoriais, requerimentos de mercado e distribuição, e custos (FU & LABUZA, 1993).

A determinação da vida-de-prateleira de alimentos estocados é de fundamental relevância no estudo de pesquisa e desenvolvimento de novos produtos e na área de ciências de alimentos como um todo, não apenas para as indústrias de alimentos, mas também para os órgãos governamentais e para os consumidores (FU & LABUZA, 1993).

A vida-de-prateleira de produtos lácteos, de acordo com LEWIS & DALE (2000), é influenciada pelos seguintes aspectos:

- Matérias-primas;
- Formulação do produto;
- Parâmetros do processamento;
- Implementação de Boas Práticas de Fabricação (BPF);
- Acondicionamento e embalagem;
- Armazenamento e distribuição;

- Uso e manuseio pelo consumidor.

Os fatores críticos a serem considerados em relação aos leites fermentados são a temperatura de armazenamento e distribuição, contaminação por micro-organismos indesejáveis, sinérese, textura e degradação do aroma, sabor e cor. A microbiota dos leites fermentados permanece viável durante a vida-de-prateleira, embora sua taxa metabólica seja baixa a 7°C, ocorre alguma atividade, a qual pode ser determinada pelo acompanhamento da evolução do pH e da acidez titulável. O período de estudo de vida-de-prateleira de leites fermentados deve abranger 28 dias, as amostras devem ser armazenadas sob temperatura controlada e ser coletadas regularmente para análises específicas (MESQUIARA, 1999).

CAIS-SOKOLINSKA *et. al.* (2008) avaliaram as características físico-químicas e sensoriais de um kefir produzido de leite de ovelha inoculado com duas diferentes culturas iniciadoras comerciais, denominadas DA e DC, durante 21 dias de estocagem sob refrigeração. A acidez titulável inicial do kefir DA alcançou 48,4°SH (unidade de Soux-Henkel em 100mL de leite) e foi 14% maior que o kefir produzido com a cultura DC. Após o 21° dia de estocagem, a acidez titulável de ambas as amostras de kefir foi 6,5°SH maior que o valor inicial medido. A quantidade de ácidos graxos livres aumentou significativamente nas amostras de kefir durante os dias de armazenamento, sendo as maiores quantidades encontradas no kefir com a cultura DA. As quantidades de acetaldeído e diacetil sofreram alterações significativas durante o período de estocagem. As amostras de kefir elaboradas com a cultura DC foram mais aceitas sensorialmente que aquelas elaboradas com a cultura DA. Independente da cultura *starter* aplicada, as maiores notas de aceitação atribuídas às amostras de kefir foram até o 7° dia de estocagem.

IRIGOYEN *et. al.* (2005) avaliaram as alterações nos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e sensoriais de amostras de kefir, elaboradas com porcentagens distintas de grãos de kefir (1% e 5%), durante 28 dias de estocagem sob refrigeração. Após 24 horas de incubação, os níveis de *Lactobacillus* e *Lactococcus* encontrados foram 10⁸ UFC/mL e de leveduras e bactérias acéticas presentes foram de 10⁵ UFC/mL e 10⁶ UFC/mL, respectivamente. As contagens das bactérias acéticas e leveduras permaneceram constantes durante o período de estocagem, enquanto a contagem das bactérias lácticas diminuiu significativamente entre o 7° e o 14° dia de armazenamento. O total de gordura, lactose, matéria seca e pH permaneceram

constantes até o 14º dia de armazenamento. As amostras de kefir foram aceitáveis até a primeira semana de estocagem, sendo os níveis máximos de aceitabilidade alcançados no 2º dia do estudo.

7 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é uma metodologia científica utilizada para evocar, medir, analisar e interpretar reações às características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição (ABNT, 1993).

No início, antes dos anos quarenta, a qualidade sensorial dos alimentos era determinada pelo proprietário da indústria. Entre as décadas de 40 e 50, iniciou-se a utilização de métodos químicos e instrumentais devido à presença nas indústrias de alimentos de técnicos provenientes da indústria farmacêutica e química, mas não sensoriais. Entre as décadas de 50 e 70 o homem inclui-se como instrumento de medida das características sensoriais dos alimentos. Mas, apenas a partir de 1979 que a qualidade sensorial passou a ser considerada como resultado da interação entre o alimento e o homem (STONE & SIDEL, 2004).

A avaliação sensorial pode ser utilizada com diferentes finalidades:

- Otimização de formulações e processos;
- Controle de qualidade de matérias-primas e produtos;
- Comparação entre as características do produto e seus concorrentes;
- Estabelecimento de padrão de qualidade de produtos;
- Estudo de vida-de-prateleira;
- Estudo de consumidor;
- Seleção e treinamento de provadores;
- Correlação das medidas sensoriais com as físico-químicas (PONTES, 2008).

As condições fisiológicas, sociológicas e psicológicas dos provadores, assim como as condições ambientais podem afetar os resultados dos testes sensoriais. Para se realizar corretamente a avaliação sensorial de alimentos, muitas variáveis precisam ser rigorosamente controladas, dentre elas as mais importantes são: o ambiente dos testes, a

preparação e apresentação das amostras e a equipe de provadores (PIZARRO, 2003).

Os métodos sensoriais podem ser classificados em: discriminativos ou de diferença, de sensibilidade, descritivos e afetivos. Os métodos discriminativos determinam se existe ou não diferença perceptível entre as amostras e incluem Teste triangular, Teste duo-trio, Teste de comparação pareada, Teste de ordenação, Teste A ou não-A e Teste de comparação múltipla ou de diferença do controle. Os métodos de sensibilidade medem a habilidade de perceber, identificar e/ou diferenciar qualitativa e/ou quantitativamente um ou mais estímulos pelos órgãos dos sentidos. Entre eles, pode se citar: Teste de limite, Teste de estímulo constante e Teste de diluição. Os métodos descritivos são aplicados com o objetivo de identificar e quantificar os atributos sensoriais das amostras, proporcionando um completo perfil sensorial. Destacam-se a Análise Descritiva Quantitativa e o Perfil Livre. Os testes afetivos avaliam a preferência ou aceitação junto aos consumidores, aplicando-se diferentes metodologias, como testes de escala hedônica, escala do ideal e escala de atitude, testes de ordenação da preferência e preferência pareada (MEILGAARD *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a área Análise Sensorial sofreu um importante impulso como ferramenta utilizada para a melhoria da qualidade dos alimentos, especialmente, a Análise Sensorial Descritiva que tem sido cada vez mais aplicada em pesquisas acadêmicas e no setor produtivo (YOKOTO, 2006).

Análise descritiva quantitativa (ADQ)

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) utiliza equipe de provadores treinados para identificar e quantificar os atributos dos produtos através de termos e de escalas previamente por eles estabelecidas (STONE & SIDEL, 2004).

A ADQ é um dos métodos mais sofisticados para a avaliação de produtos, utilizando uma equipe de provadores que desenvolve descritores (qualitativo) e emprega escalas para medida de suas intensidades (quantitativa), caracterizando e descrevendo atributos sensoriais das amostras estudadas (STONE & SIDEL, 2004).

Essa análise requer um painel de seis a doze provadores treinados (YOKOTA, 2006). A quantificação das respostas sensoriais requer que a equipe de provadores utiliza o mesmo vocabulário, definições adequadas, referências padrões qualitativas e quantitativas, bem como uma mesma escala para unificar o critério de avaliação (STONE

et. al., 1974).

A ADQ pode ser aplicada no desenvolvimento de novos produtos, na interpretação da preferência do consumidor, comparação entre um produto e seus concorrentes, estudos de vida-de-prateleira e controle de qualidade de produtos industrializados. Permite também que os resultados sejam correlacionados com medidas experimentais (PONTES, 2008).

Segundo MEILGAARD *et. al.* (1999), a aplicação desta técnica envolve as seguintes etapas: recrutamento e pré-seleção de provadores, levantamento de atributos sensoriais e desenvolvimento de metodologia para descrever estes atributos, treinamento de provadores pré-selecionados, avaliação e seleção final da equipe de provadores, realização dos testes e análise estatística dos resultados.

Existem relatos na literatura de várias aplicações da ADQ adaptadas a objetivos específicos, tal como a análise descritiva quantitativa modificada aplicada para estudos de características específicas associadas à alteração do produto durante a estocagem. Nestas aplicações poucos atributos são considerados, sem a completa descrição de todas as características de aparência, aroma, sabor e textura. O analista sensorial precisa utilizar seus conhecimentos e sua criatividade para construir a melhor técnica para o desenvolvimento da equipe, preferencialmente com base em trabalho prévio com uma equipe totalmente treinada para ADQ da classe de produto de interesse (ITAL, 2008).

Os provadores pré-selecionados seguem para a etapa de desenvolvimento da linguagem e treinamento. O treinamento consiste na familiarização do indivíduo com os procedimentos do teste, em melhorar suas habilidades em identificar e reconhecer os atributos sensoriais relacionados ao alimento a serem testados e melhorar a sensibilidade e memória de modo a oferecer medidas sensoriais precisas, consistentes e padronizadas, ou seja, desenvolver uma equipe que produza resultados válidos e seguros e que funcione como um instrumento analítico. O treinamento requer sessões de grupo e/ou individuais, o uso de amostras referências, discussões e troca de informações. O tempo de duração do treinamento depende do tipo e número de amostras, dos atributos a serem avaliados, procedimento do teste e capacidade do provador (ASTM, 1981).

Os provadores são submetidos à seleção final, que consiste em verificar a habilidade em discriminar as amostras, em reproduzir resultados e em manter avaliações consensuais com a equipe como um todo. Para tanto um mínimo de três amostras

sabidamente diferentes são avaliadas individualmente por cada provador com um mínimo de três repetições e, então, é realizada uma análise de variância (ANOVA) com três fontes de variação (amostra, provador e interação amostra x provador) para cada atributo e outra ANOVA com duas fontes de variação (amostra e provador) para cada atributo e para cada provador (ITAL, 2008).

Para o critério repetibilidade é desejável que os provadores apresentem valores da estatística F não significativos ao nível de erro de 5% ($p(F) > 0,50$) e em relação ao poder de discriminação, os provadores devem apresentar valores da estatística F significativos ($p(F) < 0,50$), sendo permitido pelo menos um $p(F)_{amostra} \geq 0,50$ ou um $p(F)_{repetição} \leq 0,05$. Valores da estatística F para a interação amostra versus provador significativos ao nível de erro de 5% indicam que há pelo menos um provador avaliando as amostras de forma não consensual com a equipe (ITAL, 2008).

Os provadores que apresentarem poder de discriminação, repetibilidade e consenso com a equipe são aprovados para compor a equipe de provadores treinados para a análise descritiva.

OBJETIVOS

- Verificar as semelhanças e diferenças entre as características do kefir tradicional e kefir cultura iniciadora;
- Verificar se o método de produção de kefir utilizando a cultura iniciadora resulta num leite fermentado com padrão de qualidade constante;
- Determinar a vida de prateleira de ambas amostras de kefir pela avaliação da estabilidade de suas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante um período de 28 dias de estocagem a 4°C;
- Avaliar a taxa de mortalidade de camundongos convencionais em decorrência de infecção experimental com *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Typhimurium, tratados ou não com kefir tradicional ou kefir cultura iniciadora;
- Determinar e comparar a histologia do fígado, íleo e cólon de camundongos tratados ou não com kefir tradicional ou kefir cultura iniciadora e desafiados com *Salmonella* Typhimurium.

MATERIAL E MÉTODOS

1 ELABORAÇÃO E ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DO KEFIR

O estudo foi desenvolvido nos Laboratórios de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB), Tecnologia de Alimentos e Análise Sensorial e Estudo de Consumidor (LASEC) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

1.1 Matérias-primas

Para a elaboração do kefir foram utilizados grãos de kefir, cultura iniciadora isolada dos grãos de kefir, leite UHT integral de lotes diferentes e açúcar refinado adquiridos no comércio local (Belo Horizonte – MG).

Os grãos de kefir, de origem das montanhas dos Cárpatos, são provenientes do Laboratório de Fitofármacos da Universidade Federal de Lavras – UNIFENAS, Minas Gerais.

A cultura iniciadora utilizada era composta de quatro bactérias ácido lácticas: *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, e duas leveduras: *Kazachstania unispora* e *Torulaspota delbrueckii*, micro-organismos isolados dos grãos de kefir e identificados por CARNEIRO (2010).

1.2 Elaboração do kefir

Na obtenção do kefir foram empregados dois métodos de fermentação, em um dos métodos utilizou-se grãos de kefir e no outro a cultura iniciadora (item 2.1). Nas fermentações pela cultura iniciadora utilizou-se o processo de fermentação simultânea descrita por CARNEIRO (2010). O método com os grãos de kefir foi considerado no presente trabalho como padrão para comparação, enquanto o método de fermentação com cultura iniciadora foi escolhido por ter apresentado maior aceitabilidade em estudo com consumidores, conforme relatado por CARNEIRO, 2010.

1.2.1 Ativação dos grãos de kefir

Os grãos de kefir armazenados sob refrigeração (4°-8°C) em leite UHT integral foram ativados diariamente durante dois dias para a produção. A ativação dos grãos foi realizada da seguinte maneira: os grãos foram separados do leite utilizando uma peneira e lavados com água destilada, e o leite foi descartado. Em seguida, os grãos foram inoculados (10% m/v) em leite UHT integral e adicionado de 31 g/L de sacarose. Os grãos de kefir inoculados no leite foram mantidos a 22°C em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Demanda Bioquímica de Oxigênio, Tecnal, Piracicaba, Brasil). Após 24 horas na estufa, os grãos foram, novamente, separados do leite e lavados com água destilada, e o leite foi descartado. Os grãos foram inoculados (5% m/v) em leite e adicionado 31g/L de sacarose. Os grãos no leite foram mantidos por mais 24 horas a 22°C em estufa incubadora e depois utilizados para a produção do leite fermentado.

1.2.2 Ativação e padronização do inóculo da cultura iniciadora

As bactérias ácido lácticas foram ativadas e crescidas em caldo MRS (Man, Rogosa & Sharpe, Acumedia, Michigan, USA) ou M17 (Difco, Sparks, USA) adicionado de lactose a 10% m/V, e as leveduras em caldo YM (Yeast Malt, Himedia, Mumbai, Índia). Cada linhagem isolada foi descongelada e ativada em meio líquido apropriado a 22°C por 48 horas seguido de um novo repique por mais 24 horas. Em ambos repiques, transferiu-se 50 µL da cultura para 5 mL do caldo apropriado. Após a ativação das culturas, padronizou-se o número de células do inóculo. Para a obtenção do número de células adequado (bactérias – 10^9 a 10^{10} UFC/mL; leveduras – 10^7 UFC/mL), transferiu-se 1 mL da cultura de bactéria ácido láctica para 100 mL de caldo e 100 µL da cultura de levedura para 10 mL de caldo, para produção de um litro da bebida. Os meios foram incubados a 22°C em estufa incubadora durante 12 ou 24 horas, tempo necessário para os micro-organismos atingirem o final da fase logarítma. A fase logarítma foi definida pela determinação da curva de crescimento de cada micro-organismo, realizada no trabalho de CARNEIRO (2010). Em seguida, os meios foram centrifugados (15 minutos a 2638 ω g) e as células lavadas com 10 mL de água peptonada 0,1%, e novamente centrifugadas. O precipitado de células foi suspenso em 10 mL de água peptonada 0,1% para inoculação no leite.

1.2.3 Método tradicional

O kefir tradicional foi produzido pela fermentação do leite por grãos de kefir seguindo as etapas descritas no fluxograma apresentado na Figura 2.

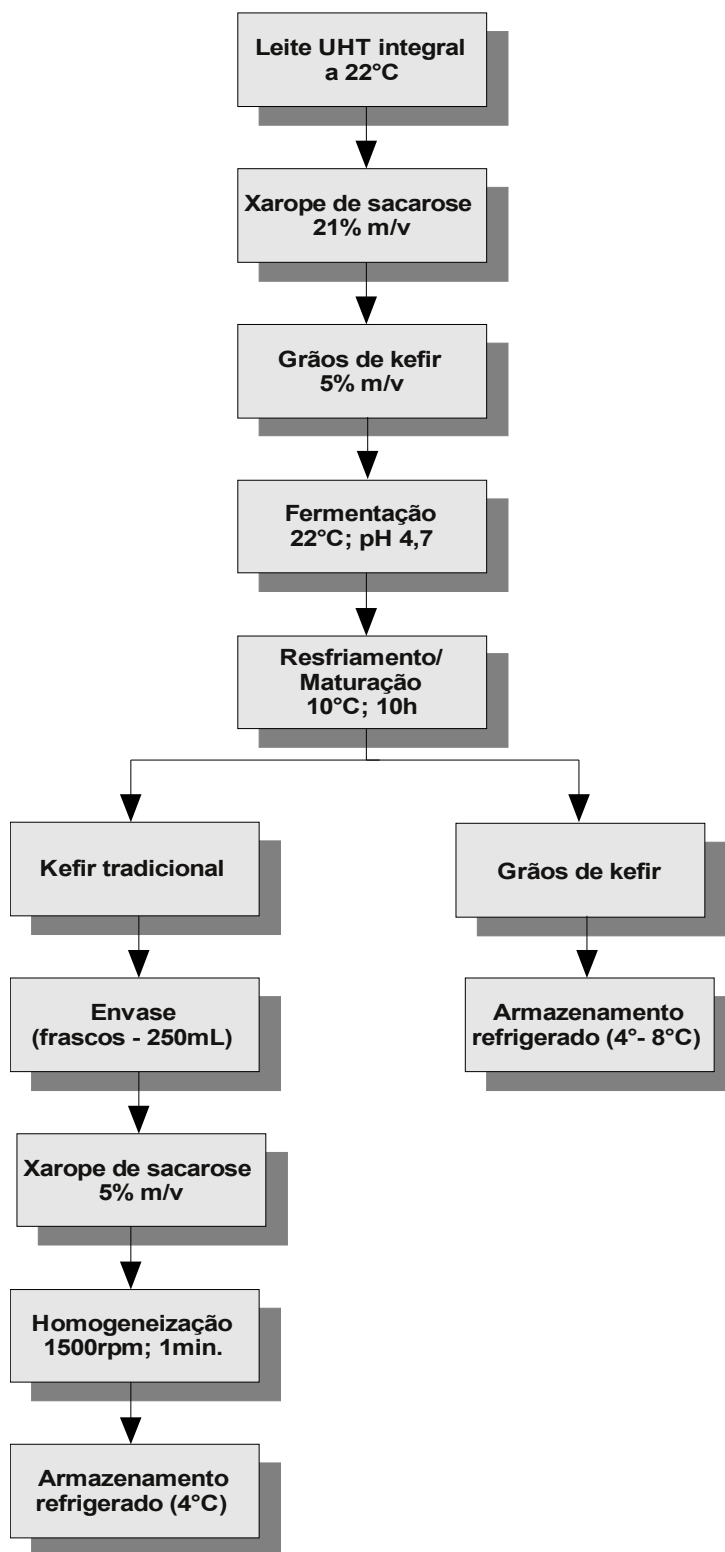


Figura 2: Fluxograma da elaboração de kefir pelo método tradicional.

O leite UHT integral a 22°C foi adicionado de xarope de sacarose (21% m/v) e inoculado com 5% m/v de grãos previamente ativados. A fermentação foi conduzida em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Tecnal) a 22°C durante 12 horas até atingir pH 4,7. O leite fermentado foi resfriado lentamente a 10°C por 12 horas. Os grãos de kefir foram separados do leite fermentado com auxílio de uma peneira de plástico e em seguida, lavados com água destilada e preservados em leite sob refrigeração (4°C) para uma próxima fermentação. O produto foi distribuído em frascos reagentes de vidro de 250 mL estéreis (Fracos reagentes, Uniglas) e adoçado com 5% m/v de xarope de sacarose, homogeneizados em homogeneizador T25 basic (Jkinka Laborkechnik, Rio de Janeiro, Brasil) e acondicionado sob refrigeração a 4°C em refrigerador (Bosch, Hortolândia, Brasil).

1.2.4 Método com cultura iniciadora por fermentação simultânea

O kefir produzido por este método foi obtido pela inoculação do leite com culturas puras de bactérias e leveduras submetido às fermentações láctica e alcoólica simultaneamente como descrito pelas etapas do fluxograma apresentado na Figura 3.

O leite UHT integral a 22°C foi adicionado de xarope de sacarose (21% m/v) e inoculado com a cultura iniciadora de bactérias ácido lácticas e leveduras a 4% v/v e 2% v/v, respectivamente. A fermentação foi conduzida em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Tecnal) a 22°C durante, aproximadamente, nove horas até atingir pH 4,7. O leite fermentado foi resfriado lentamente a 10°C por 10 horas. O produto foi distribuído em frascos reagentes de vidro de 250 mL estéreis (Fracos reagentes, Uniglas) e adoçado com 5% m/v de xarope de sacarose, homogeneizados em homogeneizador T25 basic (Jkinka Laborkechnik) e acondicionado sob refrigeração a 4°C em refrigerador (Bosch).

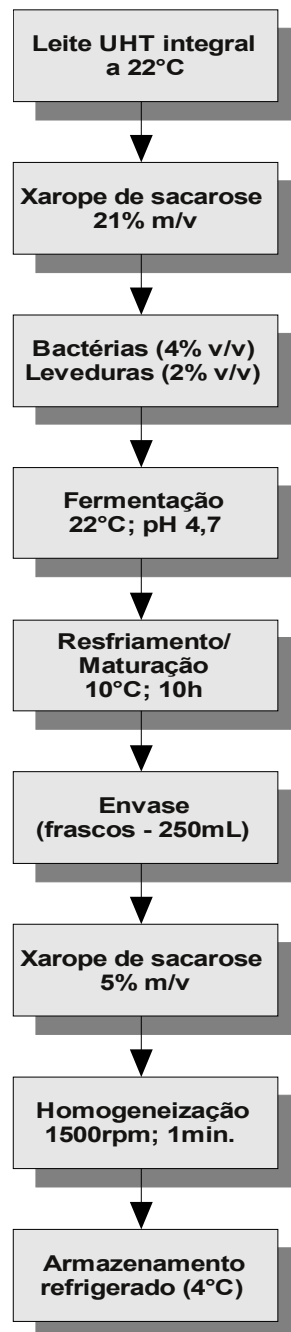


Figura 3: Fluxograma da elaboração de kefir cultura iniciadora por fermentação simultânea

1.3 Análises físico-químicas

As amostras de kefir foram avaliadas quanto a estabilidade de suas características físico-químicas: pH, acidez titulável, sinérese, viscosidade e etanol durante um período de 28 dias estocadas sob refrigeração a 4°C. Os tempos de análise foram após o término da produção (0 dia) e nos 2°, 7°, 14°, 21° e 28° dias de armazenamento. Foram analisados três lotes de cada método (método tradicional e método com cultura

iniciadora) e todas as análises foram realizadas em quatro replicatas.

1.3.1 pH

O pH das amostras foi medido em um potenciômetro modelo MPA210 (MS Técnico, Brasil) à temperatura ambiente, conforme método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005).

1.3.2 Acidez em ácido láctico

A acidez titulável foi determinada por titulação potenciométrica, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Pesou-se, aproximadamente, 10 gramas da amostra e diluiu-se em 10mL de água destilada isenta de gás carbônico. A amostra diluída foi titulada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, sob agitação contínua, até pH 8,3. A acidez titulável foi calculada utilizando a equação 1:

$$\frac{V \times f \times 0,9}{P} \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

V – volume, em mL, de solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação;

f – fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L;

0,9 – fator de conversão para ácido láctico;

P – massa, em gramas, da amostra.

O resultado para a acidez foi expresso em porcentagem de ácido láctico (g de ácido láctico/100g de produto).

1.3.3 Viscosidade

A viscosidade das amostras de kefir foi determinada usando um viscosímetro de rotina Cannon-Fenske modelo AVS 350 (Schott-Gerate, Hofheim, Alemanha), capilar número 300, tipo 520 23 de 1,26mm de diâmetro, com princípio de funcionamento baseado no tempo de escoamento.

Sendo N_2 a viscosidade do líquido de referência, a água, a viscosidade absoluta do líquido da amostra pode ser calculada pela equação 2:

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{d_1 \times t_1}{d_2 \times t_2} \text{ (Equação 2)}$$

Sendo:

N_1 – viscosidade da amostra;

N_2 – viscosidade do líquido de referência;

t_1 – tempo de escoamento da amostra no capilar de Ostwald;

t_2 – tempo de escoamento da água no capilar de Ostwald;

d_1 – densidade da amostra;

d_2 – densidade da água.

O tempo de escoamento, em segundos, no capilar de Ostwald foi determinado submergindo as amostras em banho de água a 25°C. Empregando a água como padrão, calculou-se a viscosidade da amostra utilizando a referência da viscosidade da água a 25°C que é $8,9 \times 10^{-4}$ N m⁻².s equivalente a 0,890 centipoise (cP).

A viscosidade das amostras foi expressa em centipoise (cP).

1.3.4 Sinérese

A susceptibilidade à sinérese foi medida pelo método descrito por Harwalkar & Kalab (1983). A amostra (25 a 35g) foi centrifugada (Centrífuga refrigerada SIGMA 2K15, Osterode, Alemanha) a 2638 \times g por 15 minutos. O sobrenadante límpido (o soro) foi descartado e se mediu a massa restante. A diferença entre as massas total e do precipitado corresponde à sinérese. A sinérese foi expressa em porcentagem de massa (% m/m) do leite fermentado.

1.3.5 Etanol

A análise do teor de etanol foi, gentilmente, realizada na Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC), em Belo Horizonte. Determinou-se a densidade relativa do etanol, obtido após separação do álcool das amostras de kefir por destilação simples, pelo densímetro digital a 20°C. O teor alcoólico foi obtido a partir da conversão do valor da densidade relativa da amostra destilada em porcentagem de etanol em volume (% v/v), utilizando tabela de conversão.

1.4 Análises microbiológicas

A estabilidade das características microbiológicas das amostras de kefir foi verificada durante um período de 28 dias de estocagem sob refrigeração a 4°C. A contagem de bactérias ácido lácticas e de leveduras foi realizada após o término da produção e nos tempos 2, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. A contagem de coliformes foi realizada após o término da produção e com 14 e 28 dias de estocagem.

1.4.1 Contagem de bactérias ácido lácticas totais

A contagem de bactérias lácticas totais foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais sucessivas das amostras. Na superfície de cada placa de Petri contendo 15 a 20 mL de ágar MRS (Man, Rogosa & Sharpe, Acumedia, Michigan, USA) suplementado com cicloheximida (100mg/L) inoculou-se 0,1 mL das diluições de 10^{-5} a 10^{-7} . As placas foram incubadas a 22°C em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Tecnal) durante 48 a 72 horas.

1.4.2 Contagem de leveduras totais

A contagem de leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície a partir de diluições decimais sucessivas das amostras. Na superfície de cada placa de Petri contendo 15 a 20 mL de ágar YM (Yeast Malt, Himedia, Mumbai, Índia) acrescido de cloranfenicol (200mg/L) inoculou-se 0,1 mL das diluições de 10^{-3} a 10^{-6} . As placas foram incubadas a 22°C em estufa incubadora tipo BOD modelo TE-391 (Tecnal) durante 3 a 5 dias.

1.4.3 Contagem de coliformes

Foram realizadas as análises de coliformes a 45°C e 35°C utilizando o método de Número Mais Provável (NMP mL⁻¹) descrito pelos Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, instrução normativa n° 62/2003 (BRASIL, 2003).

1.5 Análise estatística

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas foram submetidos a Análise de Variância Univariada (ANOVA) de dois fatores para avaliar a diferença entre

os lotes de cada amostra e durante o período de armazenamento, com interação lote x tempo de armazenamento para cada parâmetro. Foi seguida do teste de comparação de médias de Tukey, quando necessário. Os testes foram realizados utilizando as ferramentas de análise de dados disponíveis no Excel 2007 (MOS, 2007) ao nível de significância de 95%.

1.6 Análise descritiva quantitativa modificada

A caracterização das amostras de kefir foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial e Estudo do Consumidor (LASEC), localizado no Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia (FAFAR) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

A execução da análise sensorial do presente trabalho foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, parecer número ETIC 298/10.

1.6.1 Pré-seleção dos provadores

Foram convidados 13 provadores, levando-se em consideração requisitos como interesse, hábito de consumir leite fermentado, nenhuma restrição de saúde, disponibilidade e conhecimento prévio de análise sensorial. Os candidatos responderam a um questionário sociodemográfico (APÊNDICE B) para avaliação destes requisitos e caracterização da equipe.

1.6.2 Levantamento da terminologia descritiva

Antes da etapa de levantamento dos termos descritores, realizou-se uma reunião com todos os membros do grupo para apresentação do trabalho e das amostras de kefir. Foram dadas explicações sobre definição, características relevantes e os métodos de fabricação do kefir, essenciais para a compreensão do trabalho. Os provadores receberam então amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora em todos os tempos (0, 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem) as quais foram analisadas individualmente. Os provadores anotaram suas observações sobre as amostras apresentadas em relação à aparência, odor, aroma e sabor, livremente.

No segundo encontro com o grupo de provadores foram levantados os atributos que melhor caracterizaram as duas amostras, de acordo com as observações feitas pelos

provadores na primeira reunião, características já descritas na literatura e as normas da ABNT (1998). Após a definição e reconhecimento dos termos descritores sugeridos, montou-se uma ficha de avaliação (APÊNDICE C) com escalas não estruturadas de nove centímetros, com os pontos âncoras à esquerda representando ausente, fraco ou pouco e à direita forte ou muito para cada atributo.

1.6.3 Treinamento

A primeira sessão de treinamento foi realizada com todos os provadores a fim de apresentar a ficha de avaliação montada e esclarecer a maneira correta de marcar na escala não estruturada. Foi também apresentado a forma como as amostras seriam servidas e como deveriam ser avaliadas.

Cada atributo foi treinado em triplicata para que os provadores conhecessem as amostras referências (APÊNDICE D) dos extremos da escala de cada atributo e, assim, fossem capazes de discriminar os tratamentos e ter repetibilidade das suas respostas nas amostras.

1.6.4 Seleção dos provadores

A validação do treinamento dos provadores foi realizada com a utilização das fichas elaboradas com as escalas de intensidade para os termos definidos. Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) com três fontes de variação (amostra, provador e interação amostra x provador) para cada atributo e outra ANOVA com duas fontes de variação (amostra e provador) para cada atributo e para cada provador. As características que validaram o treinamento foram: o poder de discriminação entre as amostras ($p(F) < 0,50$) e repetibilidade ($p(F) > 0,05$), sendo permitido que houvesse pelo menos um $p(F)_{amostra} \geq 0,50$ ou um $p(F)_{repetição} \leq 0,05$.

1.6.5 Avaliação das amostras de kefir

Os provadores selecionados e treinados avaliaram amostras de kefir tradicional e de kefir cultura iniciadora logo após o término da sua produção e nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento. Foram avaliados atributos relacionados a aparência (fluidez, granulidade e presença de espuma), ao odor (odor característico de leite fermentado), a sabor (gosto ácido, sabor característico de leite fermentado, sabor alcoólico e *off-flavor*), a

textura (cremosidade) e sensações táteis bucais (efervescência), utilizando a escala não estruturada elaborada (APÊNDICE C).

Os testes foram conduzidos em cabines individuais sob luz branca e as amostras servidas em tubos de vidro com tampa (retiradas somente no momento da avaliação do atributo relacionado a odor) para avaliação dos atributos relacionados a aparência e odor e em copos de plástico (50mL) para avaliação dos atributos relacionados a sabor, textura e sensações táteis bucais. As amostras foram apresentadas em delineamento inteiramente casualizado, de forma monádica e sequencial, codificadas com algarismos aleatórios de três dígitos em três repetições.

1.6.6 Análise estatística sensorial

Os resultados da ADQ modificada foram submetidos à ANOVA de dois fatores para avaliar se houve diferença sensorial entre as amostras estudadas e durante o tempo de armazenamento, com interação amostra x tempo de armazenamento para cada atributo, ao nível de significância de 95%. Seguida pelo teste de comparação de médias de Tukey, quando necessário.

As médias dos escores dos atributos sensoriais fornecidas pelos provadores treinados foram utilizadas para a construção do gráfico radial, com objetivo de visualizar o perfil das amostras em diferentes tempos de estocagem, e também submetidas à Análise de Componentes Principais (ACP), a fim de visualizar a diferença entre as amostras relacionadas a cada atributo. Estes testes foram realizados utilizando o programa estatístico XLSTAT, versão 2011.

2 ESTUDO DO EFEITO DO KEFIR NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM CAMUNDONGOS

Esta parte do estudo foi realizado no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

O experimento com animais deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, parecer número 260/10.

2.1 Animais

Foram utilizados camundongos convencionais *swiss* da linhagem NIH (Taconic, Germantown, USA), com 21 a 23 dias de idade, de ambos os sexos, provenientes do biotério do ICB/UFMG. Os animais receberam ração sólida (Nuvilab, Nuvital, Curitiba) e água, *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gaiolas no biotério do Departamento de Microbiologia do ICB da UFMG. Um ciclo diurno/noturno de 12 horas foi mantido no biotério.

A manutenção, assim como o uso dos animais nos experimentos, foram conduzidos respeitando o “*Guide for the care and use of experimental animal*”, do *National Research Council* (1996).

2.2 Kefir

Para a realização do trabalho, foram utilizadas duas amostras de kefir produzidas pelo método tradicional e método com culturas iniciadoras, como descrito nos itens 1.2.3 e 1.2.4 deste trabalho.

2.3 Micro-organismo patogênico

A linhagem de *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Typhimurium, de origem humana, que foi utilizada nas infecções experimentais nos camundongos, pertence ao Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia (ICB) da UFMG.

Essa linhagem bacteriana estava conservada em 0,2 mL de glicerina, esterilizada por calor seco, adicionada de 1,0 mL da cultura de 18 horas, crescida em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Sparks, USA), a 37 °C e estocada a -24 °C. Para o experimento, a bactéria foi crescida em caldo BHI a 37 °C durante 18 horas.

2.4 Tratamento

Os animais dos grupos experimentais (10 animais) receberam um inóculo diário de 0,1 mL do kefir elaborado pelo método tradicional ou pelo método com culturas iniciadoras, e os animais do grupo controle (10 animais) receberam um inóculo diário de 0,1 mL de leite, por via intra-gástrica, 10 dias antes do desafio com a bactéria patogênica

e até o final do período experimental. As amostras de kefir foram utilizadas no tratamento no máximo durante 15 dias após sua produção, pois durante este período os leites fermentados apresentaram uma concentração de micro-organismos de acordo com os nível recomendado pela ANVISA (mínimo de 10^8 a 10^9 UFC) (BRASIL, 2007), segundo análises microbiológicas.

2.5 Desafio

Os inóculos da *S. Typhimurium* foram preparados a partir do crescimento da cultura pura congelada em caldo BHI a 37 °C por 18 horas. Em seguida, a cultura pura foi submetida a diluições decimais sucessivas em salina tamponada esterilizada, para obtenção das concentrações de células desejadas. A confirmação da viabilidade do inóculo e as contagens bacterianas foram feitas em ágar MacConkey (Difco) após 24 horas de incubação a 37 °C.

Os camundongos, dos grupos controle e experimentais, receberam inóculos de 0,1 mL da cultura de *Salmonella Typhimurium*, contendo 10^5 UFC/mL, por via intragástrica, após o 10º dia do tratamento.

2.6 Determinação da mortalidade e desenvolvimento ponderal em decorrência da infecção experimental por *Salmonella Typhimurium* em camundongos

As amostras de kefir elaboradas pelo método tradicional e pelo método com cultura iniciadora foram testados quanto a capacidade das mesmas de protegerem camundongos convencionais contra o desafio experimental por *Salmonella Typhimurium*. A mortalidade acumulada por inóculos intragástricos de *Salmonella Typhimurium* (10^5 UFC/mL) foi determinada em animais convencionais tratados ou não com o kefir até 28 dias após o desafio com *Salmonella Typhimurium* (SILVA *et al.*, 2004). Os camundongos também foram pesados em intervalos de 4 em 4 dias para o acompanhamento do desenvolvimento ponderal.

2.7 Exame histopatológico

Dois outros grupos experimentais e controle com 4 a 5 animais cada foram utilizados para histopatologia. Os animais foram sacrificados (deslocamento cervical) após 7 dias de infecção provocada por *Salmonella Typhimurium* e amostras de fígado e de

porções do trato digestivo (íleo e cólon) foram coletas e submetidas a um exame histopatológico. As amostras foram fixadas em formaldeído 4% e processadas para a inclusão e microtomia em parafina. Foram executados cortes de 3 a 5 micrômetros de espessura, que foram posteriormente corados pela hematoxilina-eosina (HE). Os fragmentos das amostras codificadas foram observados seqüencialmente pela patologista Prof^a Dr^a Denise Carmona Cara Machado (Departamento de Morfologia, ICB, UFMG) a qual não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista (SILVA *et al.*, 1999). As amostras foram analisadas em microscopia ótica.

2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos da mortalidade em camundongos foram avaliados utilizando teste Exato de Fisher e o LogRank com o nível de significância fixado a $p < 0,05$. Para essas análises foi utilizado o programa SigmaStat 3.5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 ESTUDO DA VIDA-DE-PRATELEIRA DO KEFIR

1.1 Análises físico-químicas

O tipo de inóculo (método tradicional – grãos de kefir ou método com cultura iniciadora) e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente os níveis de pH, acidez, viscosidade, sinérese e etanol das amostras, isto significa que as características físico-químicas variaram devido ao inóculo utilizado e durante o período de estocagem.

As Tabelas 5 e 6 apresentam o valor médio dos resultados das análises físico-químicas do kefir tradicional e do kefir cultura iniciadora durante o armazenamento.

Tabela 5: Características físico-químicas do kefir tradicional durante os 28 dias de estocagem

Parâmetros	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	2	7	14	21	28
pH	4,50 ± 0,03 ^A	4,35 ± 0,05 ^B	4,36 ± 0,05 ^B	4,35 ± 0,05 ^B	4,28 ± 0,04 ^C	4,30 ± 0,00 ^C
acidez (g/100g)	0,74 ± 0,04 ^A	0,78 ± 0,03 ^B	0,79 ± 0,03 ^C	0,83 ± 0,04 ^D	0,84 ± 0,05 ^D	0,89 ± 0,08 ^E
viscosidade (cP)	4,31 ± 0,96 ^A	4,47 ± 0,63 ^B	3,96 ± 1,00 ^C	2,81 ± 0,82 ^D	2,69 ± 0,74 ^E	3,54 ± 0,94 ^F
sinérese (%m/m)	59,3 ± 9,72 ^A	59,0 ± 10,91 ^A	56,6 ± 11,03 ^B	68,6 ± 4,83 ^C	69,1 ± 3,61 ^C	68,8 ± 2,24 ^C
etanol (%v/v)	1,8 ± 0,15 ^A	1,7 ± 0,16 ^A	2,0 ± 0,39 ^{A,B}	2,2 ± 0,25 ^{B,C}	2,5 ± 0,56 ^{C,D}	2,7 ± 0,33 ^D

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão.

^{A, B} Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 6: Características físico-químicas do kefir cultura iniciadora durante os 28 dias de estocagem

Parâmetros	Tempo de armazenamento (dias)					
	0	2	7	14	21	28
pH	4,37 ± 0,05 ^A	4,23 ± 0,12 ^B	4,16 ± 0,07 ^C	4,07 ± 0,05 ^D	3,97 ± 0,05 ^E	3,90 ± 0,15 ^F
acidez (g/100g)	0,82 ± 0,03 ^A	0,91 ± 0,02 ^B	1,00 ± 0,03 ^C	1,10 ± 0,07 ^D	1,14 ± 0,06 ^E	1,21 ± 0,03 ^F
viscosidade (cP)	6,85 ± 0,71 ^A	11,19 ± 1,09 ^B	13,34 ± 2,72 ^C	15,68 ± 1,10 ^D	17,54 ± 2,59 ^D	22,13 ± 1,17 ^E
sinérese (%m/m)	45,7 ± 8,96 ^A	35,4 ± 3,22 ^B	32,5 ± 1,93 ^C	33,6 ± 1,90 ^{B,C}	34,0 ± 2,11 ^{B,C}	34,6 ± 1,52 ^{B,C}
etanol (%v/v)	1,3 ± 0,08 ^A	1,4 ± 0,16 ^{A,B}	1,4 ± 0,06 ^{A,B}	1,5 ± 0,08 ^{B,C}	1,5 ± 0,05 ^{B,C}	1,6 ± 0,11 ^C

Dados representam o valor médio de três lotes e seu desvio padrão.

^{A, B} Médias seguidas pela mesma letra na mesma linha não diferem pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

O pH de ambos tipos de kefir sofreu uma redução estatisticamente significativa

($p < 0,05$) entre o 0 e 28° dia de estocagem. A redução de pH do kefir cultura iniciadora (kefir CI) foi mais acentuada (igual a 0,47) que do kefir tradicional (igual a 0,20).

A Figura 4 (Tabelas 12 e 13, APÊNDICE A) ilustra a evolução do pH em três lote de cada amostra de kefir. Os valores de pH dos três lotes de kefir tradicional (kefir TRAD) no mesmo dia não apresentaram diferença significativa entre si, exceto no caso do lote TRAD1 que diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais lotes no 7° e no 14° dia.

Entre os lotes de kefir cultura iniciadora também não houve diferença estatística em relação ao pH considerando o mesmo dia de estocagem, exceto para o lote CI 3 que teve valores de pH diferentes significativamente dos demais lotes no 2° e no 28° dia de estocagem.

Pode-se dizer que tanto os lotes de kefir tradicional quanto os de kefir cultura iniciadora foram semelhantes entre si em relação à evolução do pH, visto que as curvas dos respectivos gráficos seguem uma tendência semelhante.

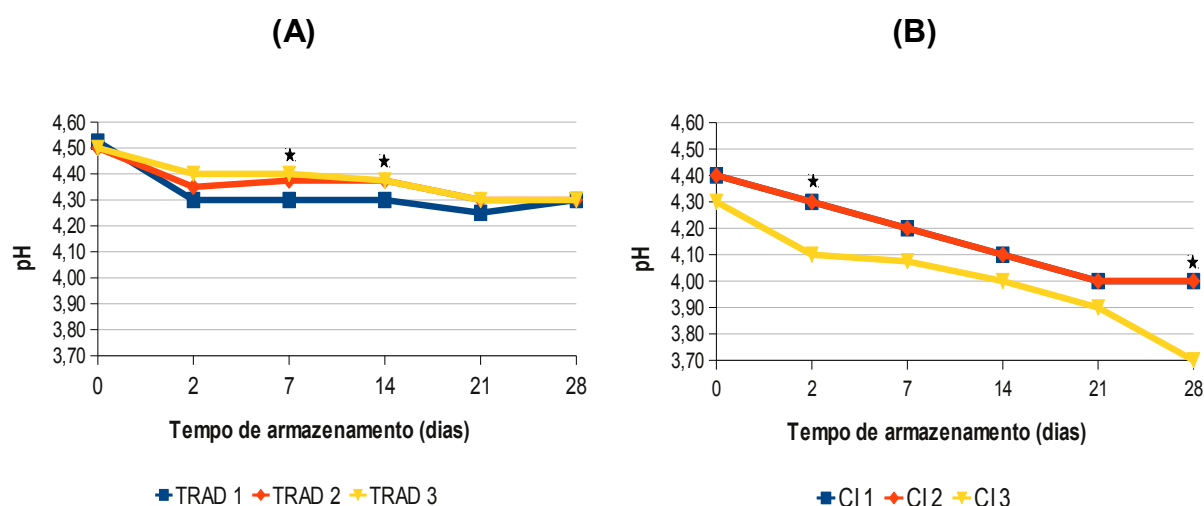


Figura 4: Alteração do pH no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.

* Indica que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre pelo menos duas médias.

A quantidade de ácido láctico no kefir tradicional e kefir cultura iniciadora aumentou significativamente ($p < 0,05$) durante a estocagem (Tabelas 5 e 6). O kefir cultura iniciadora apresentou um aumento de acidez 2,6 vezes maior que o kefir tradicional.

A Figura 5 (Tabelas 14 e 15, APÊNDICE A) mostra o comportamento da acidez nos lotes de ambas amostras de kefir. As curvas do gráfico da Figura 5B seguem uma

tendência bastante parecida, indicando que os lotes de kefir cultura iniciadora tiveram o mesmo comportamento em relação à acidez, ao contrário dos lotes de kefir tradicional (Figura 5A).

Dentre os lotes de kefir tradicional, considerando o mesmo tempo, houve sempre pelo menos um lote que diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos outros quanto à acidez durante o período de estocagem, exceto no 28º dia no qual a acidez dos lotes foi estatisticamente distintas entre si.

A acidez dos três lotes de kefir cultura iniciadora no mesmo tempo de análise, no geral, não diferiu estatisticamente ($p > 0,05$), exceto nos 14º e 21º dias, nos quais os valores de acidez dos lotes foram diferentes estatisticamente entre si.

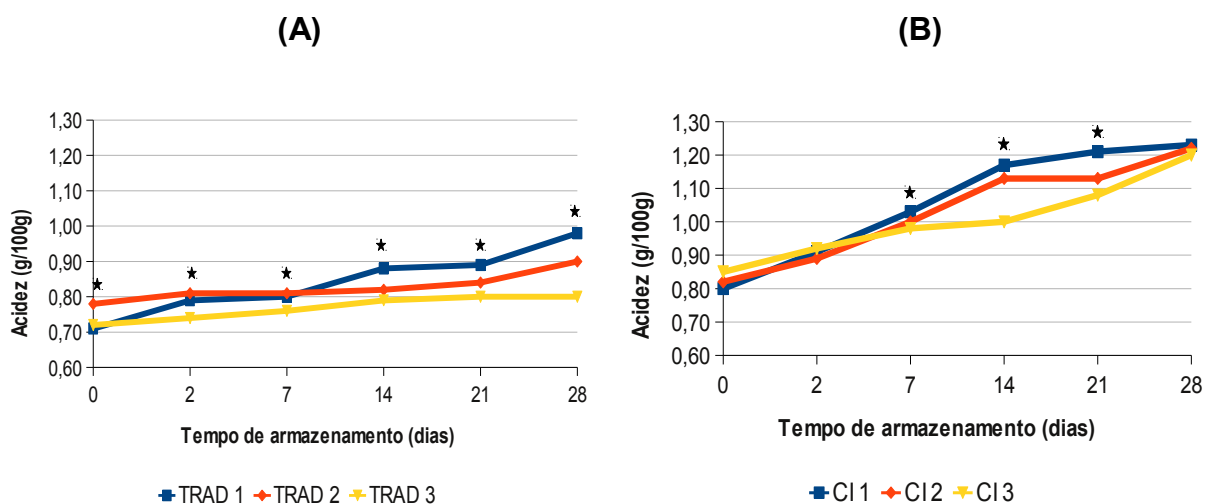


Figura 5: Alteração da acidez no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.

* Indica que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre pelo menos duas médias.

IRIGOYEN *et. al.* (2005) determinaram o pH em amostras de kefir elaboradas utilizando 1% e 5% de grãos no período de 28 dias de armazenamento e observaram que o pH (4,4 a 4,7) não apresentou diferença estatística significativa com o passar dos dias de estocagem.

CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.* (2008) avaliaram duas amostras de kefir fermentado por diferentes culturas iniciadoras comerciais e registraram uma redução do pH entre 0,16-0,22 e um aumento da acidez de 0,15% durante 21 dias de armazenamento, estes valores foram, portanto, semelhantes aos do kefir tradicional (redução de pH e aumento de acidez iguais a 0,22 e 0,10%, respectivamente) com 21 dias de estocagem.

ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM (2009) encontram valores de pH e acidez de 4,29-4,40 e 4,26-4,39 e de 0,70-0,82% e 0,72-0,92%, respectivamente, no 1° e no 7° dia de estocagem, resultados similares aos encontrados em ambos kefir deste trabalho no 0 e no 7° dia.

O kefir tradicional permaneceu até o fim do período de armazenamento de acordo com o padrão de acidez requerido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) de leites fermentados, instrução normativa nº46/2007 (BRASIL, 2007) que estabelece acidez menor que 1,0g de ácido láctico/100g do produto. Enquanto o kefir cultura iniciadora apresentou valores de acidez superiores ao estabelecido pela legislação após 14 dias de estocagem.

A viscosidade do kefir tradicional foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre o 0 e o 28° dia de estocagem, no entanto, não se observou um comportamento linear nos valores, isto é, ora a viscosidade aumentava ora diminuía (Tabela 5). A viscosidade do kefir cultura iniciadora aumentou significativamente ($p < 0,05$) ao longo do armazenamento (Tabela 6). A viscosidade média do kefir cultura iniciadora sofreu um aumento significativo de 15,28 cP de 0 ao 28° dia.

A Figura 6 (Tabelas 16 e 17, APÊNDICE A) mostra os resultados de viscosidade nas amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora. Através da Figura 6A é possível observar a ausência de homogeneidade entre os lotes de kefir tradicional pois as curvas não seguem uma tendência semelhante. Ao contrário do kefir tradicional, os lotes de kefir cultura iniciadora apresentaram homogeneidade entre si como mostra o gráfico da Figura 6B.

Observou-se que os lotes de kefir tradicional, considerando o mesmo dia de armazenamento, diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre si em relação a viscosidade, exceto no 21° dia no qual houve dois lotes que não diferiram estatisticamente entre si.

No 0, 21° e no 28° dia de armazenamento, a viscosidade dos três lotes de kefir cultura iniciadora não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) e nos demais dias, verificou-se que pelo menos um lote diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos outros dois quanto à viscosidade.

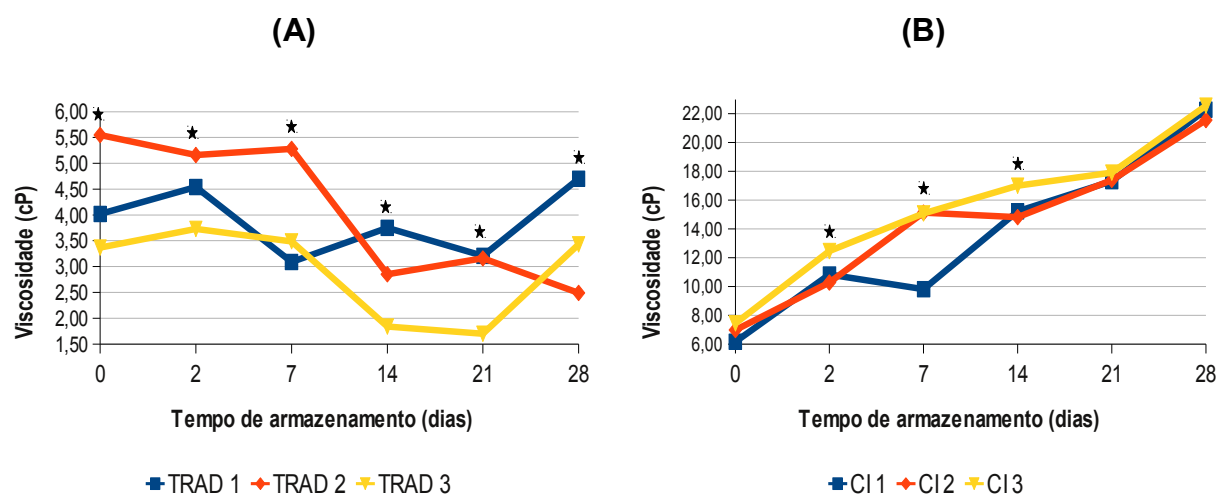


Figura 6: Alteração da viscosidade no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.

* Indica que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre pelo menos duas médias.

Os valores médios de viscosidade do kefir cultura iniciadora com 7 e 14 dias de armazenamento foram similares aos encontrados em duas amostras de kefir fermentadas com os grãos (13,94-15,27 cP) avaliadas por GARROTE *et. al.* (1997), e também àqueles encontrados por GARROTE *et. al.* (2001) em duas (13,8-15,4 cP) de suas quatro amostras de kefir fermentado por grãos de origens diferentes.

A viscosidade do kefir tradicional aproximou-se dos resultados obtidos por MOTHAGI *et. al.* (1997) que avaliaram a viscosidade de kefir elaborado pela adição de 5% de grãos de kefir.

TRATNIK *et. al.* (2006) e MITUNIEWZ-MALEK *et. al.* (2009) observaram que a duração do período de estocagem influenciou na variação da viscosidade em kefir e BESHKOVA *et. al.* (2002) observaram diferença na viscosidade entre kefir obtidos por diferentes tipos de inóculo.

A sinérese do kefir tradicional variou significativamente ($p < 0,05$) durante a estocagem, todavia não se observou uma tendência de aumento ou redução da sinérese neste kefir (Tabela 5). A sinérese do kefir cultura iniciadora não apresentou variação significativa ($p > 0,05$) do 2º dia até o final do período de armazenamento (Tabela 6).

A Figura 7 (Tabelas 18 e 19, APÊNDICE A) mostra a suscetibilidade à sinérese dos lotes de kefir tradicional e de kefir cultura iniciadora durante o período de estocagem. Observando o gráfico (Figura 7B) correspondente ao kefir cultura iniciadora verifica-se

que as curvas correspondentes a cada lote são bastante similares, indicando homogeneidade entre os lotes, ao contrário do que se observa no gráfico do kefir tradicional (Figura 7A).

Os lotes de kefir tradicional foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) em relação a sua sinérese no 0, 2°, 7° e 14° dias de armazenamento. Contudo, no 21° dia apenas o lote TRAD 1 apresentou dessoragem significativamente diferente ($p < 0,05$) dos demais e no 28° dia não se verificou diferença significativa entre os três lotes.

Os valores de sinérese dos lotes de kefir cultura iniciadora não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$) entre si durante o tempo de armazenamento, exceto no tempo zero e no 2° dia.

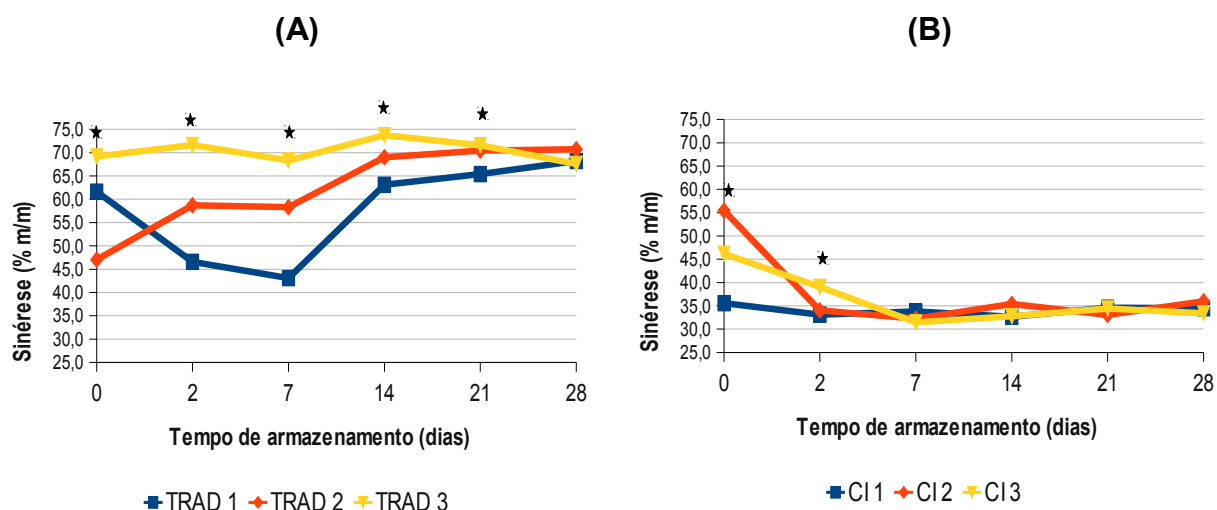


Figura 7: Alteração da sinérese no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento.

* Indica que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre pelo menos duas médias.

A Figura 8 apresenta a relação entre viscosidade e sinérese do kefir tradicional e do kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento. O kefir tradicional obteve a menor viscosidade média e a maior sinérese nos tempos analisados, podendo, assim, ser considerado como a amostra mais fluida (Figura 8A). A sinérese do kefir cultura iniciadora, no geral, manteve-se constante com o passar dos dias enquanto o valor médio de viscosidade aumentou durante o armazenamento (Figura 8B).

As amostras de kefir cultura iniciadora apresentaram os maiores valores de viscosidade e baixa susceptibilidade à sinérese quando comparadas às de kefir

tradicional, demonstrando que o kefir CI apresenta melhor estabilidade que o kefir TRAD. Esta diferença pode ser explicada por uma produção relevante de exopolissacarídeos pelas bactérias lácticas presentes na cultura iniciadora. Os polissacarídeos extracelulares produzidos pelas bactérias ácido lácticas contribuem para a textura e as características reológicas específicas dos leites fermentados e quando adicionados a alimentos, esses polissacarídeos funcionam como espessantes, emulsionantes, estabilizantes, gelificantes e agentes de ligação de água (GIRAFFA, 1994).

Os valores de viscosidade e sinérese das amostras de kefir também podem ter sido influenciados pelas cepas de micro-organismos e a proporção delas inoculadas no leite, pois as alterações na acidez do meio ocasionadas pela fermentação influenciam a formação do gel de caseína com uma estrutura de rede regular (SIMOVA *et. al.*, 2002, CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.*, 2008).

FRENGOVA *et. al.* (2002), avaliando a produção de exopolissacarídeo (o kefirano) por bactérias ácido lácticas isoladas de grãos de kefir, selecionaram uma cepa de *Lactobacillus bulgaricus* que sobressaiu dentre as 40 cepas de bactérias lácticas isoladas pela alta atividade exopolissacarídica e verificaram que na associação dessa cepa com outras bactérias lácticas e levedura (simulando uma cultura iniciadora de kefir) a produção de kefirano foi de 1,7 vezes maior que a do *L. bulgaricus* isolado.

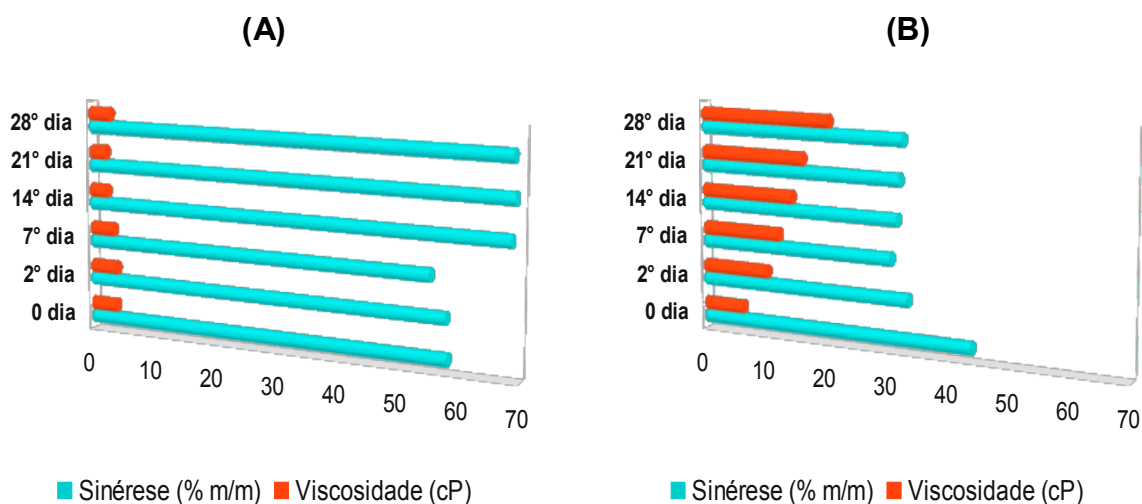


Figura 8: Valores médios de viscosidade e sinérese do (A): kefir tradicional e do (B): kefir cultura iniciadora ao longo do período de estocagem.

No kefir tradicional houve um aumento significativo de etanol durante a estocagem, de 1,8% a 2,7% v/v entre o 0 e o 28º dia (Tabela 5). Enquanto o teor de etanol

do kefir cultura iniciadora aumentou ligeiramente ao longo dos dias de armazenamento, apresentando, inicialmente, teor de etanol igual a 1,3% e de 1,6% v/v ao final (Tabela 6).

A Figura 9 (Tabelas 20 e 21, APÊNDICE A) apresenta os gráficos da evolução do teor alcoólico do kefir tradicional e do kefir cultura iniciadora durante a estocagem. As curvas do gráfico do kefir tradicional (Figura 9A), assim como as curvas do gráfico do kefir cultura iniciadora (Figura 9B), são paralelas entre si, indicando que os lotes têm o mesmo comportamento em relação ao grau alcoólico.

Os lotes de kefir tradicional, considerando o mesmo de dia de armazenamento, não foram estatisticamente diferentes ($p>0,05$) entre si em relação ao grau alcoólico. Os lotes de kefir cultura iniciadora também não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre si no mesmo tempo de estocagem quanto ao teor alcoólico.

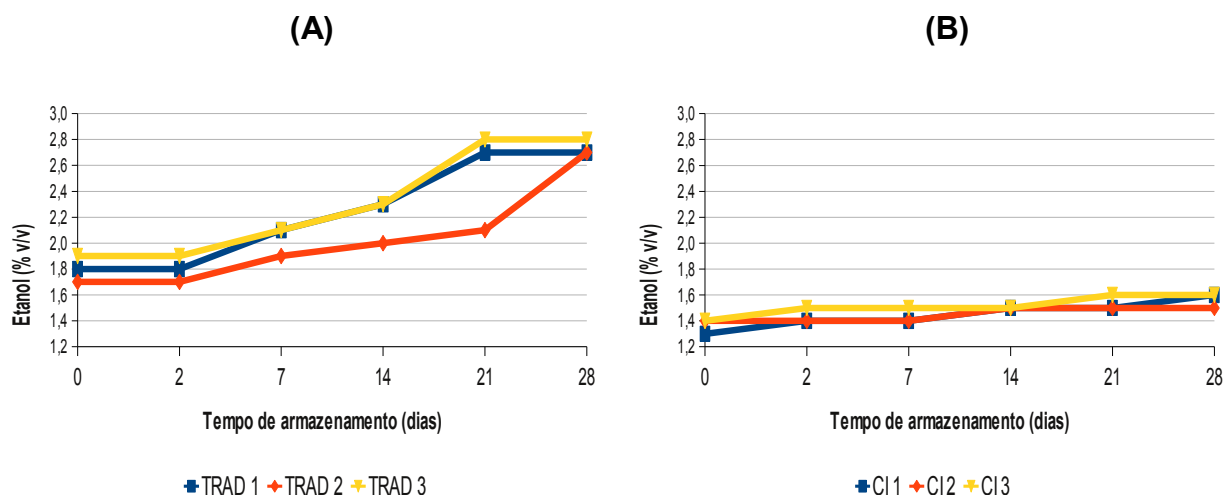


Figura 9: Alteração do etanol no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de armazenamento a 4°C.

Esses resultados demonstram que toda a sacarose adicionada, calculada para a produção de 1,5% v/v de etanol – levando-se em consideração a reação estequiométrica da fermentação alcoólica – foi consumida pelos micro-organismos confinados nos grãos e pela cultura iniciadora. Contudo, ocorreu uma produção de etanol acima do esperado, principalmente nas amostras de kefir tradicional, indicando que o volume de xarope, adicionado para adoçar as amostras ao fim do processamento, foi metabolizado pelas leveduras mesmo sob refrigeração a 4°C.

O etanol e CO₂ exercem um papel fundamental no desenvolvimento das características do kefir (ZAJSEK & GORSEK, 2010), portanto, a adição de sacarose na fermentação do leite foi necessária a fim de que ocorresse a produção de etanol e CO₂, pois na cultura iniciadora não havia leveduras lactose-positiva e como não foi realizada a identificação de todas as leveduras isoladas dos grãos de kefir, não havia certeza da presença de leveduras fermentadoras de lactose.

Os valores de etanol encontrados no kefir tradicional desde sua fabricação e no kefir cultura iniciadora após 28 dias ficaram acima dos valores definidos pela legislação vigente (BRASIL, 2007) que estabelece teor de etanol entre 0,5% e 1,5% v/v. Os padrões estabelecidos pela FAO/WHO (2003) para kefir, ao contrário da legislação brasileira, não menciona o teor de etanol ideal.

O teor alcoólico encontrado em kefir relatado na literatura varia amplamente. MOTAGHI *et. al.* (1997) registram valores de etanol entre 0,10-0,20% v/v em amostras de kefir obtidas por diferentes tempos de fermentação do leite pelos grãos. ASSADI *et. al.* (2000) encontraram concentrações de etanol iguais a 0,15% v/v em kefir obtido de grãos e entre 0,33-0,53% v/v em kefir produzidos usando culturas iniciadoras. Os valores de etanol destes trabalhos citados são inferiores aos encontrados nos kefir tradicional e cultura iniciadora.

Em um estudo com kefir polonês, LIBUDZISZ & PIATKIEWICZ (1990) encontraram valores de etanol entre 0,035% e 2,0% v/v. Enquanto KORELEVA (1988) relatou ter encontrado valores maiores do que 2,0% v/v de etanol em kefir produzidos numa fazenda russa, mas apenas 0,01% a 0,05% v/v de etanol em amostras de kefir obtidos da combinação de culturas iniciadoras. Estes valores são similares aos registrados em ambos kefir deste trabalho.

Avaliando o efeito da estocagem, KWAK *et. al.* (1996) armazenaram amostras de kefir adicionadas de diferentes teores de glicose (0,4, 0,5 e 1,0%) a 25°C por 7 dias e a 5°C por 14 dias e observaram que não ocorreu aumento de etanol na amostra adicionada de 0,4% de glicose, mas nas amostras com 0,5 e 1,0% de glicose houve um aumento na formação de etanol durante o armazenamento.

YILMAZ *et. al.* (2006) analisando kefir fermentado com grãos durante 10 dias de armazenamento, observaram que o teor de etanol do kefir aumentou com o passar dos dias, comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. Contudo, no estudo

citado foi registrado um aumento de 230% de etanol após 10 dias de estocagem, enquanto neste trabalho registrou-se um aumento de 50% e 23% de etanol nos kefir tradicional e kefir cultura iniciadora, respectivamente, após 28 dias estocados.

Ao contrário dos resultados deste trabalho, MITUNIEWZ-MALEK *et. al.* (2009) observaram uma redução da concentração de etanol em kefir fermentados por cultura iniciadora durante 14 dias de armazenamento. BESHKOVA *et. al.* (2002), assim como no nosso estudo, não encontraram diferença significativa no grau alcoólico das amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora após 7 dias de estocagem.

A variação no teor de etanol entre os kefir pode ser devido ao tipo e quantidade de culturas iniciadoras, tipos de recipientes utilizados, tempo e temperatura de fermentação (KORELEVA, 1988).

1.2 Análises microbiológicas

O comportamento das bactérias ácido lácticas (BAL) nas amostras de kefir tradicional e de kefir cultura iniciadora é mostrado na Figura 10 (Tabela 22, APÊNDICE A). A população de bactérias ácido lácticas dos lotes de kefir tradicional foi diferente estatisticamente entre si no 2° e 7° dia de estocagem, enquanto os lotes de kefir cultura iniciadora apresentaram concentrações de bactérias lácticas diferentes ($p < 0,05$) no 0, 7° e 21° dia de armazenamento.

A população de bactérias lácticas nos lotes de kefir tradicional diminuiu pouco durante o período de armazenamento, os lotes apresentaram uma redução de até 0,82 log UFC/mL entre o 0 e 28° dia (Figura 10A).

Nos lotes de kefir cultura iniciadora percebe-se que a contagem de bactérias ácido lácticas permaneceu alta durante todo o tempo, sofrendo pequenas variações na sua população ao longo dos dias de estocagem (Figura 10B). Observando as contagens de bactérias lácticas do kefir cultura iniciadora, verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o 0 e 28° dia.

Analisando a Figura 10B nota-se que as linhas do gráfico referente ao kefir cultura iniciadora seguem uma tendência semelhante, demonstrando a homogeneidade entre os três lotes.

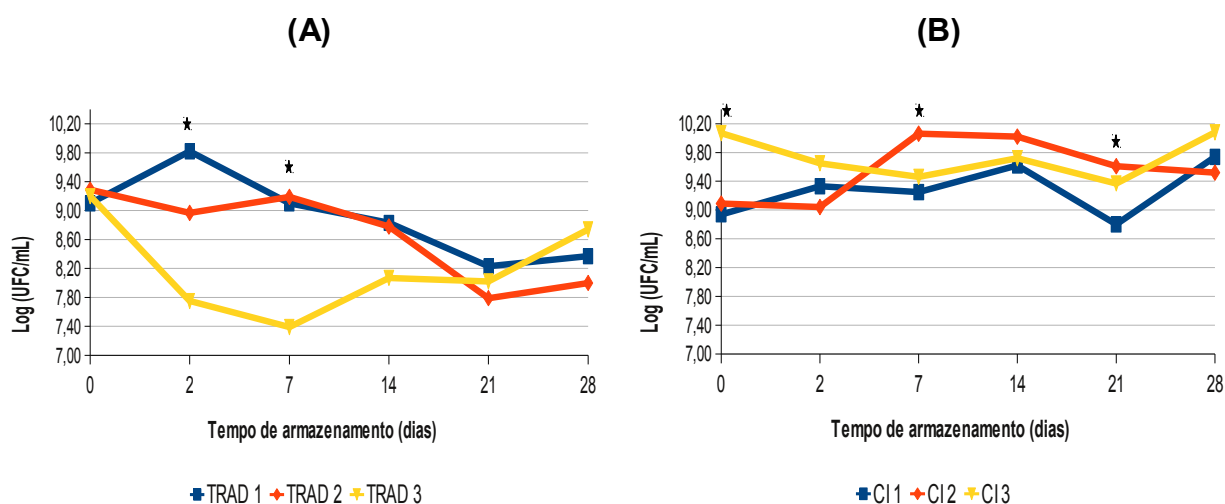


Figura 10: Evolução da população de bactérias ácido lácticas no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de 28 dias.

* Indica que há diferença estatística ($p < 0,05$) entre pelo menos duas médias.

A população de bactérias ácido lácticas durante o período de armazenamento pode produzir alterações físico-químicas e sensoriais no produto reduzindo sua vida útil.

GUZEL-SEYDIM *et. al.* (2005) obtiveram concentrações de BAL entre 8,00-9,00 log UFC/mL em kefir, durante os 21 dias de estocagem, concentrações similares aquelas encontradas no kefir TRAD e ligeiramente menores que as obtidas no kefir CI.

WRÓBLEWSKA *et. al.* (2009) encontram populações de BAL iguais a 8,64-8,74 e 8,20-8,22 log UFC/mL, respectivamente, nos 0 e 14º dias, concentrações similares as do kefir TRAD (9,19 e 8,56 log UFC/mL) nos mesmos dias, e ligeiramente inferiores a população de BAL do kefir CI, 9,37 e 9,79 log UFC/mL nos 0 e 14º dias, respectivamente.

A Figura 11 (Tabela 23, APÊNDICE A) mostra o comportamento da população de leveduras nas amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora durante a estocagem. Os três lotes analisados tanto de kefir tradicional quanto de kefir cultura iniciadora não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si. Ambas as amostras de kefir apresentaram homogeneidade entre seus lotes em relação a contagem de leveduras.

A concentração de leveduras do kefir tradicional e do kefir cultura iniciadora não variou significativamente durante a estocagem (Figura 11A e Figura 11B).

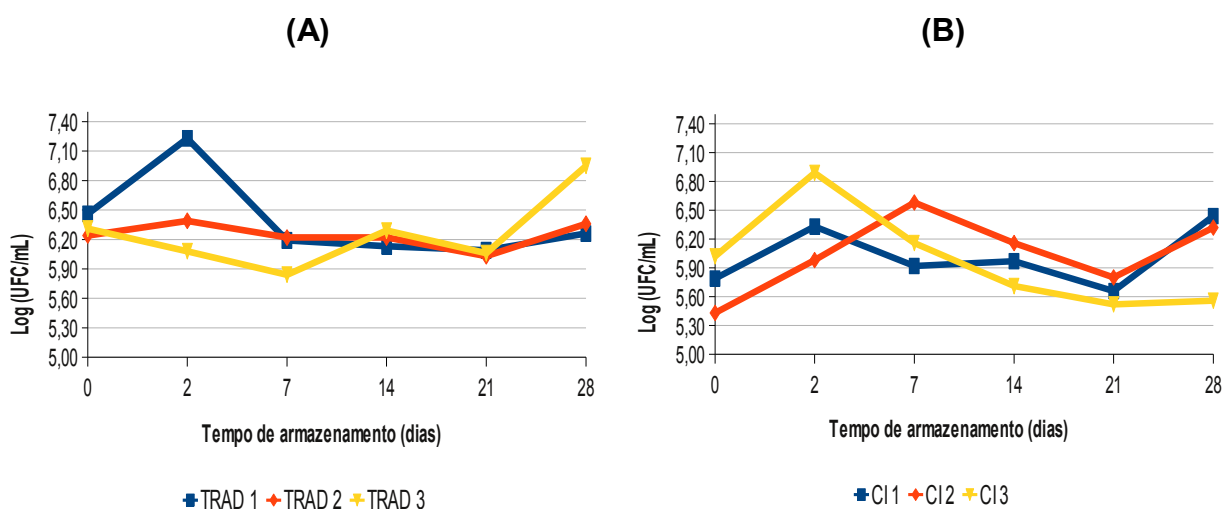


Figura 11: Evolução da população de leveduras no (A): kefir tradicional e no (B): kefir cultura iniciadora durante o período de 28 dias.

O alto teor de etanol do kefir TRAD comparado ao kefir CI pode ser atribuído ao maior número de leveduras que fermentam lactose produzindo etanol ou à presença de bactérias lácticas que produzem etanol presentes no kefir TRAD. A concentração de leveduras é um importante parâmetro que afeta a velocidade e extensão da formação de etanol no kefir (ZAJSEK & GORSEK, 2010a).

Na literatura encontram-se valores diferentes para a população de leveduras em kefir, 4,00 e 5,30 log UFC/mL (SIMOVA *et. al.*, 2002), 8,30 log UFC/mL (GARROTE *et. al.*, 1998) e entre 7,26-8,43 log UFC/mL (GARROTE *et. al.*, 2001). O comportamento da população de leveduras neste estudo foi similar ao encontrado por IRIGOYEN *et. al.* (2005), a contagem manteve-se praticamente constante ao longo dos 28 dias de armazenamento, sem diferença estatística significativa.

ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM (2009) encontram população de leveduras iguais a 5,3-5,6 e 5,2-5,5 log UFC/mL no 1° e no 7° dia de armazenamento, respectivamente, valores estes similares aos encontrados no kefir CI e inferiores àqueles do kefir TRAD nos 0 e 7° dias.

O kefir tradicional produzido por BESHKOVA *et. al.* (2002) apresentou contagem de leveduras (5,70 e 5,69 log UFC/mL no 0 e no 7° dia, respectivamente) inferiores às do kefir tradicional nos mesmos dias de estocagem, enquanto o kefir cultura iniciadora (BESHKOVA *et. al.*, 2002) obteve concentração de leveduras (6,88 e 6,87 log UFC/mL no 0 e no 7° dia, respectivamente) mais altas que aquela do kefir CI a deste trabalho.

YAMAN *et. al.* (2010) obtiveram concentrações de leveduras no 0, 2° e no 7° dia (5,72, 5,90 e 5,47 log UFC/mL, respectivamente) similares àquelas encontradas em ambas amostras deste trabalho. A população de leveduras do kefir tradicional foi bastante próxima àquela encontrada por GUZEL-SEYDIM *et. al.* (2005) no 0, 7°, 14° e no 21° dia de armazenamento (6,28, 5,77, 6,52 e 6,52 log UFC/mL, respectivamente).

A legislação (BRASIL, 2007) estabelece populações mínimas para toda a vida de prateleira do kefir iguais a 10^7 UFC/g de bactérias lácticas totais e a 10^4 UFC/g de leveduras específicas. A contagem de bactérias lácticas e de leveduras encontrada em ambas as amostras de kefir foi superior aos valores mínimos estabelecidos pela legislação brasileira em todos os dias analisados. Os kefir TRAD e CI apresentaram, em média, população de bactérias lácticas entre 10^8 - 10^{10} UFC/g e de leveduras entre 10^5 - 10^6 UFC/g ao longo da estocagem.

A Tabela 7 apresenta os resultados da contagem de coliformes nas amostras de kefir. Segundo o RTIQ de leites fermentados (BRASIL, 2007), os critérios microbiológicos aceitáveis para uma amostra de leite fermentado são: contagens máximas de 100 NMP. mL⁻¹ para coliformes a 35°C, e de 10 NMP.mL⁻¹ para coliformes a 45°C. A contagem de coliformes a 35°C e 45°C em kefir tradicional e kefir cultura iniciadora foi inferior àquela estabelecida pela legislação durante todo o armazenamento, portanto os produtos estão de acordo com os padrões legais vigentes.

Tabela 7: Contagem de coliformes a 35°C e a 45°C em kefir tradicional e kefir kefir cultura iniciadora durante o período de estocagem a 4°C.

	Coliformes a 35°C (NMP mL ⁻¹)			Coliformes a 45°C (NMP mL ⁻¹)		
	0 dia	14° dia	28° dia	0 dia	14° dia	28° dia
Kefir tradicional	2,1	<0,3	<0,3	2,1	<0,3	<0,3
Kefir simultâneo	0,6	<0,3	<0,3	0,6	<0,3	<0,3

Observa-se que a contagem de coliformes do kefir tradicional foi maior que no kefir cultura iniciadora no tempo inicial e em ambas amostras de kefir, a concentração de coliformes diminuiu com o passar dos dias de estocagem.

Esses resultados podem ser explicados pela acidez das amostras e pela atividade antimicrobiana do kefir, pois o ácido láctico possui efeito inibitório sobre os micro-organismos patogênicos e de deterioração (MAGALHÃES *et. al.*, 2010) e alguns compostos inibitórios presentes no kefir, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, e ácidos orgânicos, podem ser responsáveis pela morte de micro-organismos patogênicos

(PĂUCEAN & SOCACIU, 2008; SILVA *et. al.*, 2009).

1.3 Análise descritiva quantitativa modificada

1.3.1 Pré-seleção dos provadores e levantamento de atributos

Quatro provadores dos treze inicialmente convidados não participaram da análise descritiva devido a falta de disponibilidade para comparecer às sessões de treinamento. Dos nove provadores pré-selecionados, oito foram do gênero feminino e um do gênero masculino, com idades entre 18 e 55 anos, predominando a faixa etária de 18 a 25 anos de idade (55,6%). A escolaridade mínima entre os provadores pré-selecionados foi de curso graduação em andamento e todos possuíam formação relacionada à área de alimentos.

Todos os provadores pré-selecionados informaram consumir leites fermentados frequentemente. A Figura 12 apresenta as respostas dadas pelos provadores relacionadas à maneira de consumo de leites fermentados e ao kefir no questionário aplicado (APÊNDICE C, página 123).

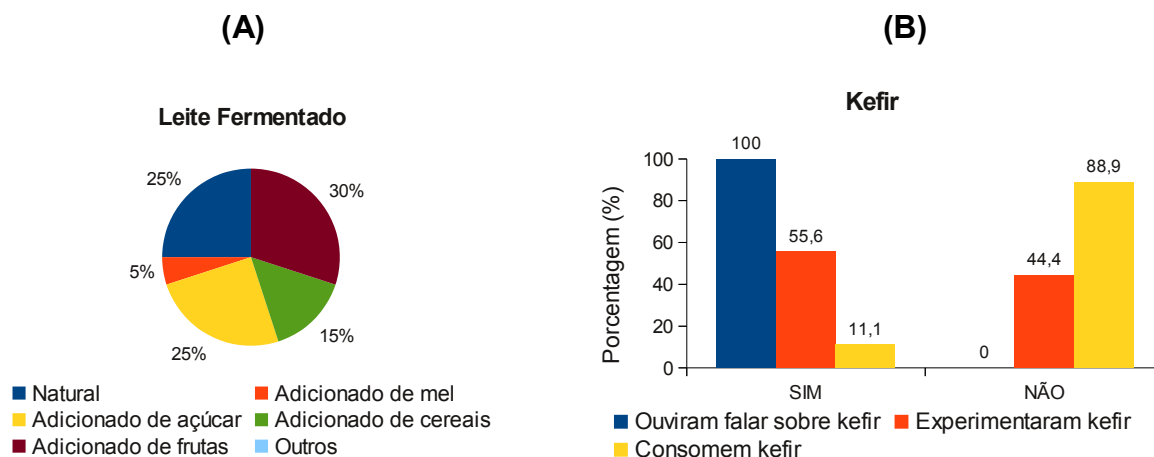


Figura 12: (A) Formas de consumo de leites fermentados pelos provadores; (B) Questões sobre o kefir.

Os provadores demonstraram maior consumo de leites fermentados adicionados de frutas (30%), seguido por leite fermentado natural (25%) e adicionado de açúcar (25%). Todos provadores já ouviram falar sobre kefir, sendo que 55,6% deles já

experimentaram esta bebida e apenas um (11,1%) tem o hábito de consumir.

Antes e durante a fase de treinamento foi levantada e organizada a lista dos termos descritores das amostras (atributos), além de definidas as amostras referências para cada atributo (APÊNDICE E). Os atributos foram definidos segundo referências da literatura e as normas da ABNT (1998). A definição das referências foi relativamente difícil, pois não há no mercado brasileiro kefir comercial e a produção de kefir em relação ao volume do produto é limitada no laboratório, além de demandar muito tempo para sua elaboração. Portanto, optou-se por utilizar como amostras referências produtos comerciais como leite UHT integral e desnatado, iogurte natural integral, leite acidófilo, coalhada integral, requeijão de copo e água mineral gasosa. Alguns destes produtos foram manipulados no laboratório para que se assemelhassem às amostras de kefir em cada atributo analisado, como mostra a tabela do APÊNDICE E.

1.3.2 Seleção dos provadores

Foram selecionados oito provadores (Tabelas 8 e 9) que apresentaram $p(F)_{amostra} < 0,50$ ou um $p(F)_{repetição} > 0,05$ com, no máximo, um valor para $p(F)_{amostra} \geq 0,50$ ou um $p(F)_{repetição} \leq 0,05$. Por motivos de saúde, um provador não realizou a última etapa do trabalho, sendo esta, portanto, realizada por somente sete provadores. Segundo STONE *et. al.* (1974), o número ideal de provadores para o teste final das amostras em uma ADQ está entre seis a 12 provadores, portanto este trabalho está com um número confiável de provadores treinados.

Tabela 8: Desempenho dos julgadores: níveis de probabilidade de F em todas as amostras derivados da análise de variância por julgador.

Provador	FLUI	GRAN	ESPU	ODLF	ACID	SALF	ALCO	OFF	CREM	EFER
1	<0,01	<0,01	<0,01	0,69*	0,05	0,16	<0,01	0,18	<0,01	<0,01
2	0,12	0,04	0,56*	0,58*	0,45	<0,01	0,01	0,73*	0,11	0,35
3	0,33	0,11	0,22	0,05	<0,01	<0,01	0,14	0,25	0,01	0,13
4	0,11	<0,01	<0,01	0,01	0,13	0,08	0,44	<0,01	0,28	<0,01
5	0,11	0,03	0,43	0,56*	0,20	0,19	0,44	0,17	0,09	0,14
6	<0,01	0,11	0,03	0,60*	0,01	0,02	0,44	0,44	0,03	0,03
7	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,07	<0,01	0,44	<0,01	0,05	0,11
8	<0,01	0,12	0,44	0,29	0,02	0,05	0,03	0,44	1,00*	0,44
9	<0,01	0,21	<0,01	0,42	0,47	0,38	0,94*	<0,01	<0,01	0,01

* $p \geq 0,50$ (Probabilidade igual ou superior a 0,50 indica que o julgador não está contribuindo para a discriminação entre os tratamentos).

Legenda: FLUI – fluidez; GRAN – granulidade; ESPU – presença de espuma; ODLF – odor característico de leite fermentado; ACID – gosto ácido; SALF – sabor característico de leite fermentado; ALCO – sabor alcoólico; OFF – off-flavor; CREM – cremosidade; EFER – efervescência.

Tabela 9: Desempenho dos julgadores: níveis de probabilidade de F relacionados ao poder de repetibilidade das respostas.

Provedor	Atributos									
	FLUI	GRAN	ESPU	ODLF	ACID	SALF	ALCO	OFF	CREM	EFER
1	0,44	0,69	0,44	0,69	0,13	0,18	0,44	0,44	0,28	0,44
2	0,44	0,39	0,95	0,81	0,73	0,17	0,69	0,71	0,54	0,81
3	0,32	0,43	0,44	0,67	0,53	0,24	0,44	0,17	0,21	0,44
4	0,51	0,64	0,44	0,02*	0,95	0,58	0,44	0,44	0,59	0,44
5	0,48	0,23	0,44	0,81	0,58	0,46	0,44	0,44	0,26	0,44
6	0,86	0,44	0,44	0,89	0,35	0,72	0,44	0,44	0,25	0,44
7	0,52	0,45	0,44	0,78	0,26	0,29	0,44	0,44	0,49	0,44
8	0,30	0,66	0,56	0,37	0,25	0,25	0,10	0,44	0,75	0,50
9	0,44	0,51	0,44	0,66	0,17	0,57	0,31	0,44	0,50	0,44

* $p \leq 0,05$ (Probabilidade igual ou inferior a 0,05 indica que o julgador não está contribuindo para a discriminação entre os tratamentos).

Legenda: FLUI – fluidez; GRAN – granulidade; ESPU – presença de espuma; ODLF – odor característico de leite fermentado; ACID – gosto ácido; SALF – sabor característico de leite fermentado; ALCO – sabor alcoólico; OFF – off-flavor; CREM – cremosidade; EFER – efervescência.

1.3.3 Análise quantitativa descritiva

A Tabela 10 apresenta as alterações na intensidade dos atributos sensoriais das amostras de kefir durante 28 dias de estocagem.

O tipo de inóculo utilizado e o tempo de armazenamento exerceram um impacto significativo em relação aos atributos de aparência (fluidez, granulidade e presença de espuma), sabor ácido, sabor alcoólico, *off-flavor*, cremosidade e efervescência. Isto significa que a intensidade dos atributos foram influenciados pelo tipo de inóculo e/ou o tempo de estocagem.

se tratam dos atributos fluidez, granulidade, sabor alcoólico e cremosidade, sendo que kefir tradicional apresentou valores de fluidez, granulidade e sabor alcoólico mais altos que o kefir cultura iniciadora durante os 28 dias. O kefir cultura iniciadora foi mais cremoso.

O tempo de armazenamento influenciou nos resultados de presença de espuma, sabor ácido, sabor alcoólico e *off-flavor*, em ambas amostras de kefir observou-se uma redução significativa na quantidade de espuma e aumento, também significativo, nos valores de sabor ácido, sabor alcoólico e *off-flavor* ao longo do período de estocagem. O kefir cultura iniciadora apresentou um aumento significativo no atributo granulidade entre os 0 e 28 dias.

O tipo de inóculo e tempo de estocagem não exerceram uma influência significativa sobre os resultados da avaliação dos atributos relacionados ao odor e sabor característicos de leite fermentado, ou seja, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre os tipos de kefir, nem durante o armazenamento relacionada a estes atributos. Não houve alteração estatisticamente significativa da intensidade do atributo efervescência ao longo da estocagem.

IRIGOYEN *et. al.* (2005) e CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.* (2008) observaram aumento significativo dos valores médios do sabor ácido em amostras de kefir tradicional e cultura iniciadora durante o armazenamento como observado nos kefir TRAD e CI. Estes autores relataram ainda alterações significativas nos valores dos atributos de odor de leite fermentado e viscosidade, enquanto no presente estudo não se observou alterações significativas na intensidade deste atributos.

Analisando uma amostra de kefir fermentada com grãos, YILMAZ *et. al.* (2006) relataram redução da efervescência durante 10 dias de estocagem, enquanto não foi observado alteração nos valores de efervescência do kefir TRAD e CI.

A avaliação das características sensoriais de duas amostras de kefir obtidas pela utilização de culturas iniciadoras comerciais durante a estocagem (CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.*, 2008) demonstrou redução significativa dos escores médios dos atributos de odor de leite fermentado e viscosidade, ao contrário do observado nas amostras de kefir deste estudo. Os valores médios de sabor de leite fermentado praticamente não variaram em uma das amostras como observado neste trabalho.

Diferente dos resultados encontrados neste trabalho, WRÓBLEWSKA *et. al.*

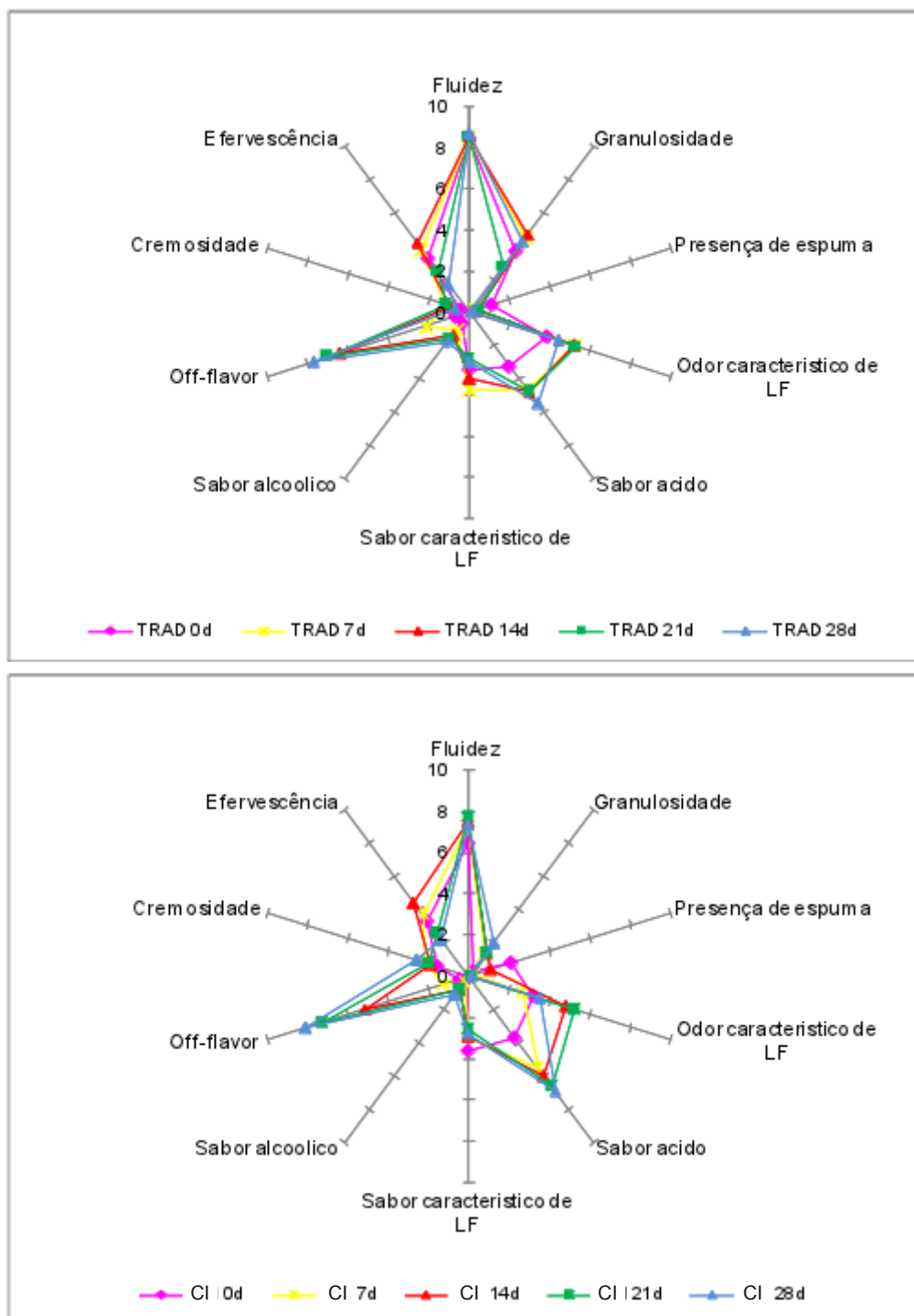
(2009) não observaram alterações significativas nos valores dos atributos de sabor ácido, sabor de “passado” e cremosidade nas amostras de kefir tradicional durante os 14 dias de estocagem.

Alterações nos parâmetros físico-químicos avaliados foram acompanhadas por mudanças nas características sensoriais avaliadas. O aumento nos níveis de acidez, viscosidade e etanol registrados pelas análises físico-químicas com o passar dos dias foi percebido pelos provadores treinados (Tabela 10). O kefir tradicional foi considerado, pelas análises de viscosidade e sinérese (Figura 8), a amostra com mais fluidez e menor cremosidade, e este kefir também obteve o maior e o menor escores médios, respectivamente, relacionados aos atributos de fluidez e cremosidade fornecidos pelos provadores.

O perfil sensorial das duas amostras de kefir, baseado nas médias dos atributos fornecidas pelos provadores, durante o período de armazenamento foi mostrado pelo gráfico radial (ou gráfico aranha) na Figura 13.

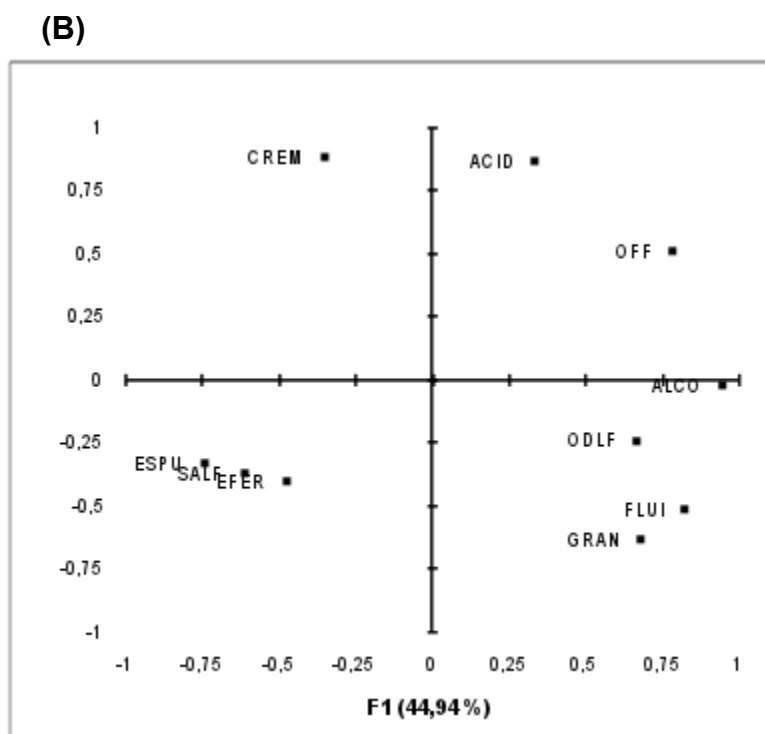
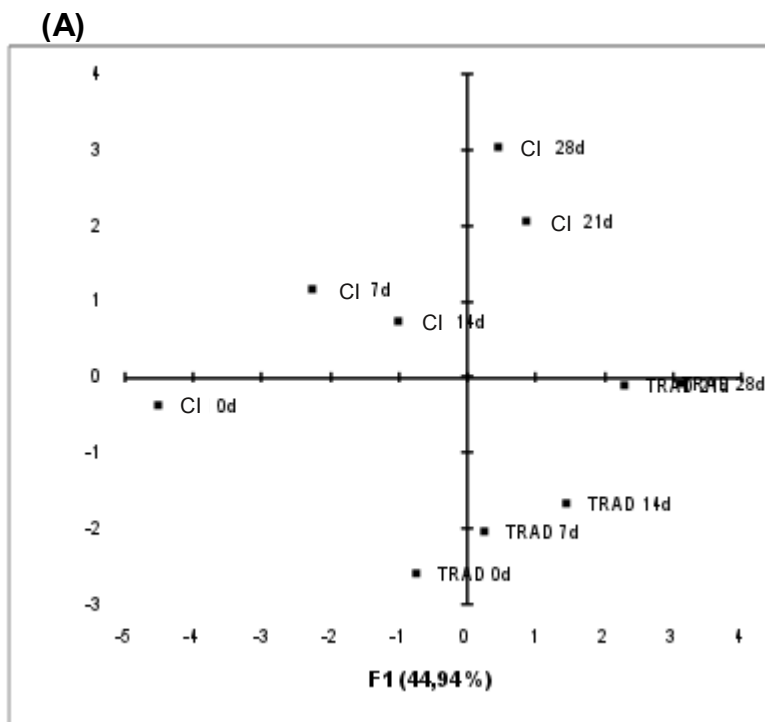
A Figura 13 sugere que houve diferença entre os perfis sensoriais das amostras de kefir, pois os gráficos apresentaram desenhos diferentes. Observou-se que a granulidade, sabor ácido e cremosidade foram os atributos que, aparentemente, mais diferenciaram o kefir tradicional do kefir cultura iniciadora, pois as linhas que passam pelos vetores que representam estes atributos tiveram comportamentos distintos entre os dois gráficos. Enquanto o sabor ácido e *off-flavor* foram os atributos que, aparentemente, mais diferenciaram tanto o kefir tradicional quanto o kefir cultura iniciadora em diferentes tempos de armazenamento. Isto é demonstrado pela distância entre as linhas que passam vetores que representam estes atributos, quanto maior a distância entre as linhas mais diferentes são as amostras.

A Figura 14 apresenta a Análise de Componentes Principais (ACP) das médias dos escores aos atributos sensoriais e a correlação entre os valores médios dos atributos e os dois componentes principais (CP), além da projeção dos resultados dos componentes principais para as amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora com diferentes tempos de armazenamento. A ACP apresenta a vantagem de conseguir mostrar diferenças não observadas pela análise estatística univariada (ANOVA). Os valores para correlação de Pearson são apresentados na Tabela 11.



Legenda: TRAD 0d, TRAD 7d, TRAD 14d, TRAD 21d, TRAD 28d – kefir tradicional com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente; CI 0d, CI 7d, CI 14d, CI 21d, CI 28d - kefir cultura iniciadora com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente.

Figura 13: Perfil sensorial de amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora durante um período de 28 dias de armazenamento.



Legenda:

TRAD 0d, TRAD 7d, TRAD 14d, TRAD 21d, TRAD 28d – kefir tradicional com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente; CI 0d, CI 7d, CI 14d, CI 21d, CI 28d - kefir cultura iniciadora com 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento, respectivamente.

FLUI – fluidez; GRAN – granulidade; ESPU – presença de espuma; ODLF – odor característico de leite fermentado; ACID – gosto ácido; SALF – sabor característico de leite fermentado; ALCO – sabor alcoólico; OFF – off-flavor; CREM – cremosidade; EFER – efervescência.

Figura 14: (A): Dispersão das amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora em relação aos dois primeiros componentes principais; (B) Loadings (cargas) – Correlação entre aos atributos sensoriais para as amostras de kefir durante o armazenamento.

Tabela 11: Loadings (cargas) - Correlações (Coeficiente de correlação de Pearson) entre os atributos sensoriais e os três primeiros componentes principais.

	CP 1	CP 2	CP 3
Atributos de aparência			
Fluidez	0,827	-0,514	0,023
Granulosidade	0,682	-0,635	0,136
Presença de espuma	-0,739	-0,330	-0,285
Atributo de odor			
Odor característico de LF	0,670	-0,243	0,418
Atributos de sabor			
Sabor ácido	0,339	0,862	0,339
Sabor característico de LF	-0,608	-0,374	0,516
Sabor alcoólico	0,947	-0,028	-0,029
Off-flavor	0,787	0,510	0,055
Atributo de textura			
Creiosidade	-0,351	0,880	0,282
At. Sensações táteis bucais			
Efervescência	-0,475	-0,402	0,673

* números em negrito significativo, $p < 0,05$.

Na representação gráfica por ACP (Figura 14), cada eixo explica uma porcentagem da variação total que existe entre as amostras. O primeiro eixo explica a maior parte da variabilidade entre as amostras, seguido pelo segundo eixo, e assim por diante. Os dois componentes principais juntos explicaram 74,09% da variabilidade entre as duas amostras de kefir em diferentes tempos de estocagem, demonstrando que os descritores utilizados discriminam satisfatoriamente as amostras analisadas.

O primeiro componente principal explicou 44,49% da variabilidade entre as amostras e está associado aos atributos fluidez, granulosidade, presença de espuma, odor e sabor característico de leite fermentado (LF), sabor alcoólico e *off-flavor*. Enquanto o segundo componente principal explicou 29,14% da variabilidade entre as amostras, e está relacionado aos atributos sabor ácido e cremosidade.

MUIR *et. al.* (1999) avaliaram as características sensoriais de três amostras comerciais de kefir tradicional e de kefir “modificado” (obtido utilizando cultura iniciadora) e WRÓBLEWSKA *et. al.* (2009) os atributos sensoriais de kefir tradicional. Ambos

estudos verificaram que os dois primeiros CP juntos explicaram mais de 60% da variância (82 e 88,6%, respectivamente), indicando que os atributos utilizados também discriminaram satisfatoriamente as amostras analisadas. E assim como neste trabalho, dentre outros descritores, os dois primeiros componentes principais estavam associados aos atributos de *off-flavor* e cremosidades.

As amostras de kefir em diferentes tempos de armazenamento encontraram-se bem distintas no gráfico da ACP (Figura 14A). Amostras similares ocupam regiões próximas no gráfico e as amostras distantes uma das outras apresentam altas dissimilaridades entre elas. Assim, a Figura 14A sugere que as amostras TRAD 0d, TRAD 7d e TRAD 14d, as amostras CI 0d, CI 7d e CI 14d, as amostras TRAD 21d e TRAD 28d e as amostras CI 21d e CI 28d são similares em relação aos atributos avaliados.

Cada amostra localiza-se próxima ao vetor (descriptor) que a caracteriza, ou seja, ao descriptor que se apresenta em maior intensidade naquela amostra. Dessa forma, a Figura 14B indica que as amostras CI 0d, CI 7d e CI 14d apresentam maior intensidade dos atributos presença de espuma, sabor característico de leite fermentado (LF) e efervescência. As amostras TRAD 0d, TRAD 7d e TRAD 14d apresentam maior intensidade dos atributos fluidez, granulosidade e odor característico de LF. Enquanto as amostras TRAD 21d e TRAD 28d se caracterizam mais pelos atributos sabor alcoólico e odor característico de LF e as amostras CI 21d e CI 28d apresentam maior intensidade dos atributos sabor ácido, *off-flavor* e cremosidade.

As amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora com até 14 dias de armazenamento encontraram-se bem distantes das amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora com 21 e 28 dias de estocagem, respectivamente, e as amostras de kefir tradicional em diferentes tempos ficaram separados das amostras de kefir cultura iniciadora, sugerindo que as diferenças foram influenciadas pelo tipo de inóculo utilizado na fermentação do leite e tempo de armazenamento (Figura 14A).

Num gráfico que representa a ACP, segundo MUÑOZ *et. al.* (1992), os vetores com medidas mais distantes do zero correspondem a variações com maior influência sobre o valor do componente principal, enquanto os vetores mais próximos de zero indicam variável com pequena influência, isso significa, portanto, que a maioria dos descritores atribuídos às amostras deste trabalho correspondem a variáveis com importante influência.

Alguns autores (MUIR *et. al.*, 1999; IRIGOYEN *et. al.*, 2005; YILMAZ *et. al.*, 2006; CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.*, 2008) observaram a correlação entre os diferentes atributos sensoriais e aceitação global e indicaram que os provadores foram influenciados positivamente pelos atributos de odor e sabor característico de leite fermentado, viscosidade, cremosidade e adstringência, e de forma negativa pelo odor ácido/amargo e fermentado, sabor ácido, amargo e azedo e separação de soro. Baseado nestes resultados relatados na literatura e nas observações escritas pela equipe sensorial deste trabalho (APÊNDICE E), o aumento da intensidade dos atributos granuloso, sabor ácido e *off-flavor* pode ter influenciado negativamente na avaliação das amostras e, por outro lado, a persistência dos atributos de odor e sabor característicos de LF e o aumento cremosidade podem influenciar positivamente.

Na avaliação sensorial das amostras de kefir com 14 dias de armazenamento a 4°C, surgiram os primeiros comentários feitos pelos provadores nas fichas de avaliação (APÊNDICE D) em relação ao aumento da intensidade do *off-flavor* nas amostras, coincidindo com aumento significativo dos escores médios atribuídos a este atributo (Tabela 10). Nos 21° e 28° dias de estocagem das amostras de kefir, a frequência de relatos pelos provadores sobre o aumento da intensidade do *off-flavor* aumentou consideravelmente, juntamente com as médias dos escores relacionadas ao atributo. Os provadores apresentaram baixa aceitação em relação amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora com 21 e 28 dias de armazenamento, demonstrada pelos comentários negativos escritos na fichas de avaliação, como: “sabor desagradável”; “sabor muito ruim”, “acidez e granuloso excessivos”, “*off-flavor* muito forte, mascarando os outros atributos” e “presença de sabor amargo”.

Baseado nestes comentários da equipe de provadores pode-se dizer que os kefir TRAD e CI foram aceitáveis até as duas primeiras semanas após sua fabricação. IRIGOYEN *et. al.* (2005), analisando duas amostras de kefir tradicional, relataram que as bebidas foram consideradas aceitáveis até a primeira semana. E YILMAZ *et. al.* (2006) verificaram diminuição significativa da aceitação global de amostras de kefir do 4° até o 10° dia de estocagem. Estes autores obtiveram, portanto, leites fermentados com menor tempo de vida útil comparados às bebidas deste trabalho.

Enquanto CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.* (2008) obtiveram kefir com maior tempo de vida útil comparado a nossas amostras. Os autores relataram baixa aceitação global para as amostras de kefir elaboradas com culturas iniciadoras após 21 dias de

armazenamento.

A microbiota diversificada da cultura do kefir, as concentrações dos compostos metabólicos bem como a proporção entre eles, e a acidez do produto afetam significativamente as características organolépticas da bebida durante o armazenamento (CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.*, 2008).

O ácido láctico, principal metabólito resultante da fermentação do leite, contribui para a formação do sabor ácido/azedo e refrescante, no entanto, sua concentração excessiva suprime o sabor agradável da bebida (CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.*, 2002). Isto pode ser observado pelos resultados das análises físico-química e sensorial deste trabalho, o aumento da intensidade do atributo *off-flavor* coincidiu com o aumento da acidez e do sabor ácido.

O odor e sabor refrescante dos leites fermentados derivam do acetaldeído. Quantidades insuficientes deste metabólito não conseguem suavizar o sabor de “passado” (*off-flavor*) e adstringente do diacetil (GUZEL-SEYDIM *et. al.*, 2005). Durante o armazenamento das bebidas fermentadas, a concentração de acetaldeído diminui consideravelmente, após seu aumento significativo durante as duas primeiras semanas, pois é degradado a etanol pela enzima álcool desidrogenase produzida pelas bactérias ácido lácticas (OTT *et. al.*, 1999; GUZEL-SEYDIM *et. al.*, 2005).

Os ácidos graxos livres (AGL) também influenciam significativamente o odor e sabor dos leites fermentados. Os AGL resultam da atividade lipolítica dos micro-organismos inoculados no leite, bem como da degradação da lactose, desaminação oxidativa, transaminação e descarboxilação dos aminoácidos (IRIGOYEN *et. al.*, 2005). Essas alterações podem melhorar ou piorar a qualidade do produto. A elevada concentração, por exemplo, de peptídeos resultantes da decomposição da β -caseína pode contribuir para o sabor amargo da bebida, assim como dipeptídeos de glutamina e asparagina intensificam o sabor amargo (CAIS-SOKOLIŃSKA *et. al.*, 2008).

Portanto, o aumento da intensidade do *off-flavor* nos kefir TRAD e CI e, conseqüentemente, a baixa aceitação das amostras com o passar dos dias de armazenamento podem estar relacionados à degradação dos componentes do leite e metabólitos pelas bactérias ácido lácticas durante a estocagem que resultam na produção destes compostos responsáveis pela redução da qualidade do produto.

2 ESTUDO DO EFEITO DO KEFIR NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL COM *SALMONELLA* TYPHIMURIUM EM CAMUNDONGOS

2.1 Avaliação da mortalidade e morbidade em decorrência da infecção experimental por *Salmonella* Typhimurim em camundongos

A mortalidade por *Salmonella* Typhimurium em camundongos foi determinada a fim de avaliar o efeito que os micro-organismos presentes no kefir provocariam no hospedeiro cujo ecossistema intestinal fosse desafiado. Também se acompanhou a evolução ponderal dos animais dos grupos controle e experimentais.

A Figura 15 ilustra a mortalidade acumulada dos camundongos, tratados ou não com kefir, durante o período de 28 dias após o desafio com *Salmonella* Typhimurium. Observou-se que a sobrevivência dos animais tratados com kefir tradicional foi maior (30%) ao final dos 28 dias quando comparado com os animais controles (21,1%), e aqueles tratados com kefir cultura iniciadora tiveram uma sobrevivência pouco menor que a do grupo controle (20%). Contudo, essas diferenças não foram estatisticamente significativas segundo o Teste Exato de Fischer (Kefir tradicional: $p= 0,53$; kefir cultura iniciadora: $p= 0,35$).

Os resultados foram submetidos à análise pelo Teste Log Rank Survival (Figura 16) para avaliar se houve diferença ao longo da curva de sobrevivência entre os grupos controle e experimentais. Não ocorreu diferença significativa entre o grupo controle e os experimentais ($p=0,95$) quanto ao tempo de morte dos animais.

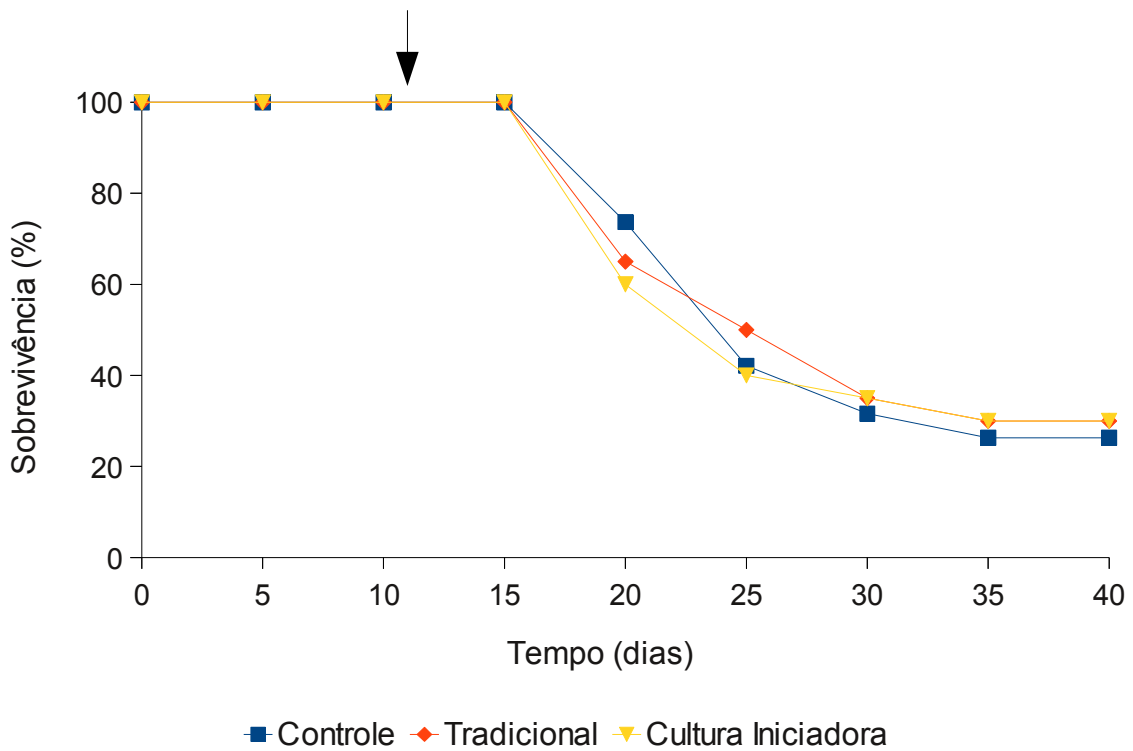


Figura 15: Sobrevivência dos camundongos CV não tratados (19 animais) ou tratados durante 10 dias com kefir tradicional (20 animais) ou com kefir cultura iniciadora (20 animais) antes do desafio experimental com *Salmonella Typhimurium* (↓).

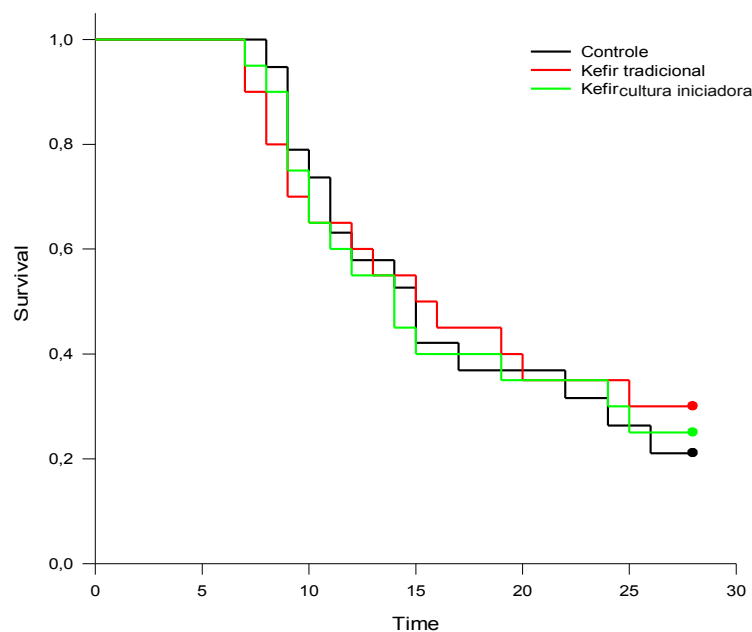


Figura 16: Análise comparativa entre as curvas de sobrevivência dos camundongos CV controle não tratados (curva preta, n=19) e dos camundongos CV tratados com kefir tradicional (curva vermelha, n= 20) e kefir cultura iniciadora (curva verde, n= 20).

O desenvolvimento ponderal dos camundongos CV dos grupos controle e experimentais é apresentada na Figura 17. Os resultados foram expressos como a média do ganho de peso dos animais sobreviventes.

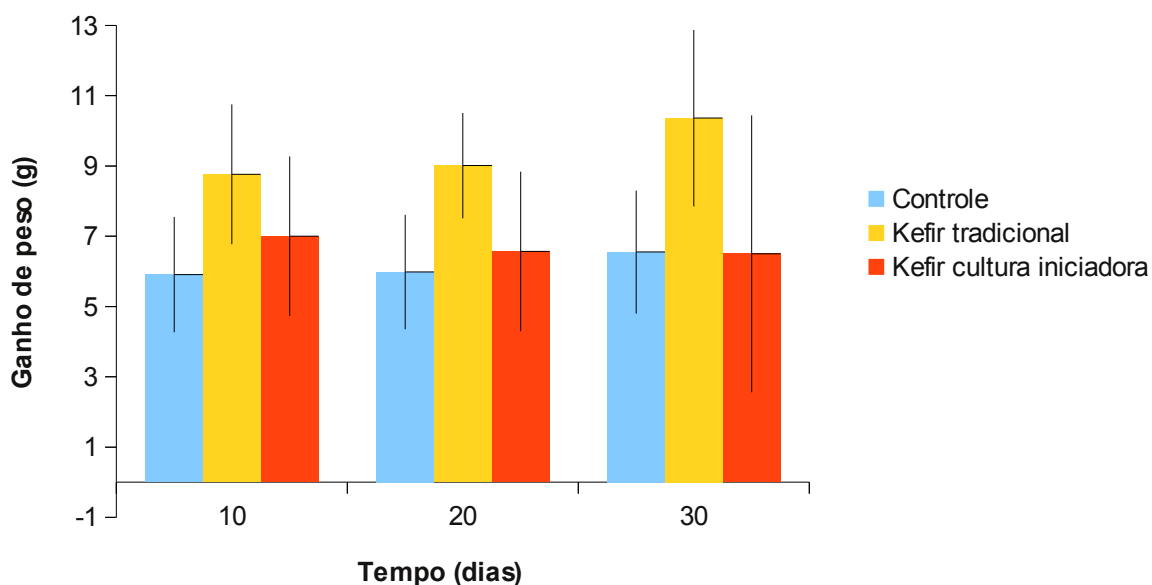


Figura 17: Ganho de peso dos camundongos CV não tratados ou tratados com kefir e desafiados com *Salmonella Typhimurium*.

Quanto à morbidade observa-se que houve diferença no ganho de peso entre os animais do grupo controle e os animais dos grupos experimentais (Figura 17). Os animais tratados com kefir tradicional tiveram maior ganho de peso que os animais controle e tratados com kefir cultura iniciadora. Em todos os grupos, os animais manifestaram a doença entre cinco a sete dias após o desafio, apresentando pelos arrepiados e apatia, e as mortes começaram no 7º dia após o desafio.

VINDEROLA *et. al.* (2007) avaliaram a capacidade protetora de um leite fermentado por *Lactobacillus helveticus* R389 em camundongos convencionais contra um desafio oral com *S. Typhimurium* (10^7 UFC) e observaram que o grupo tratado com o leite fermentado por 7 dias teve a maior taxa de sobrevivência (80%) à infecção.

Uma taxa de sobrevivência significativamente maior ($p < 0,05$) foi observada por MOURA *et. al.* (2001) em camundongos tratados com *L. delbruekii* UFV-H₂b₂₀ (34,6%) no dia 22 após o desafio com *S. Typhimurium* (10^4 UFC), quando comparados ao grupo controle (0%). Neste trabalho, foi também observado perda de peso em ambos grupos,

controle e experimental, entre cinco e 10 dias após o desafio, ocorrendo um ganho de peso para os animais sobreviventes do grupo experimental, posteriormente. VIEIRA *et. al.* (2008) também relataram que o tratamento oral de camundongos convencionais com *L. delbruekii* UFV-H₂b₂₀ os protegeram contra a infecção com *S. Typhimurium*.

LeBLANC *et. al.* (2010) demonstraram que camundongos tratados com *Lactobacillus casei* CRL 431 antes ou após o desafio com *S. Typhimurium* (10⁷ UFC) apresentaram uma diminuição nas taxas de mortalidade e perda de peso.

Uma maior taxa de sobrevivência foi observada por MARTINS *et. al.* (2009) em camundongos tratados com um produto comercial A contendo *Saccharomyces boulardii* (70%) quando comparados com o grupo controle (40%). Enquanto a taxa de sobrevivência dos animais tratados com produtos comerciais B (60%), C (60%), D (50%) contendo *Saccharomyces boulardii* e E (20%) contendo *Saccharomyces cerevisiae* não foi diferente estatisticamente em relação ao grupo controle.

2.2 Análise histológica de órgãos dos animais convencionais

Os órgãos analisados foram o fígado, íleo e cólon, e os resultados foram:

Fígado: No grupo controle (Figura 18A), observaram-se vários focos de infiltrado inflamatório decorrentes da infecção experimental com *Salmonella Typhimurium*. Esses focos localizaram-se preferencialmente próximos ao espaço porta. Ao redor do infiltrado ocorreu leve necrose e áreas de degeneração. O infiltrado caracterizou-se, principalmente, por neutrófilos e macrófagos. Na avaliação qualitativa, atribui-se o valor de 2 de lesão para o fígado desse grupo considerando todos os aspectos. A escala utilizada foi:

0 – Sem lesão.

1 – Lesão leve.

2 – Lesão moderada.

3 – Lesão grave.

Observou-se que, nos camundongos tratados com kefir tradicional, 3 dos 5 animais do grupo apresentaram melhora significativa, 1 apresentou melhora leve e 1 não apresentou diferença comparado ao grupo controle. Considerando a maioria dos animais, foi observado ausência de lesão, conforme ilustrado na Figura 18B.

Quanto aos camundongos tratados com kefir cultura iniciadora, observou-se uma diferença muito leve com relação ao grupo controle, sendo atribuído grau 1 de lesão para o fígado desse grupo.

Íleo: Conforme ilustrado na Figura 19, todos os animais apresentaram arquitetura do íleo alterada, com destruição do vilo, e em certas regiões destruição das glândulas de Lieberkuhn. Presença de infiltrado inflamatório intenso foi observada na mucosa e submucosa. Todas as amostras foram consideradas de grau 3 de lesão (grave), sem diferença entre os grupos.

Cólon: O grupo controle (Figura 20A) apresentou grau de lesão de leve a moderada (1-2), variando entre os animais do mesmo grupo. Nos casos considerados moderados, observou-se infiltrado inflamatório na glândula, ausência de células caliciformes em algumas regiões e alteração brusca da espessura da camada muscular. Em ambos os grupos tratados com kefir (Figura 20B e 20C) houve mais animais com cólon de aspecto normal, nos quais foi notado apenas algum infiltrado na região da submucosa.

O primeiro contato direto das espécies de *Salmonella* com o hospedeiro é a aderência à superfície das células epiteliais no intestino. Este evento constitui um pré-requisito para as etapas seguintes da patogênese que levam a infecção da mucosa, disseminação sistêmica e a doença. A inibição da invasão da *Salmonella* em células epiteliais é o primeiro passo na prevenção da infecção (GOLOWCZYC *et. al.*, 2007).

Nos últimos anos, a atividade antagonista de bactérias ácido lácticas contra a infecção por *Salmonella* tem sido extensivamente estudada (SILVA *et. al.*, 1999; SILVA *et. al.*, 2004; MOURA *et. al.*, 2001; VINDEROLA *et. al.*, 2007; LeBLANC *et. al.*, 2010). ZACCONI *et. al.* (1994) mencionaram o efeito antagonista do kefir contra *Salmonella* em frangos e SANTOS *et. al.* (2003) demonstraram que duas cepas de *Lactobacillus* isoladas do kefir inibiram a aderência da *Salmonella* às células epiteliais. GOLOWCZYC *et. al.* (2007) também demonstraram que algumas cepas de *Lactobacillus kefir* e suas proteínas da camada S foram capazes de inibir a adesão ou/e invasão de *Salmonella* Enteritidis *in vitro*.

A infecção por *Salmonella* tem um efeito local, no intestino, mas seu efeito maior é sistêmico, atingindo particularmente o fígado. Quando a infecção atinge o fígado, o hospedeiro torna-se mais susceptível podendo levar a morte. O hospedeiro, o qual a

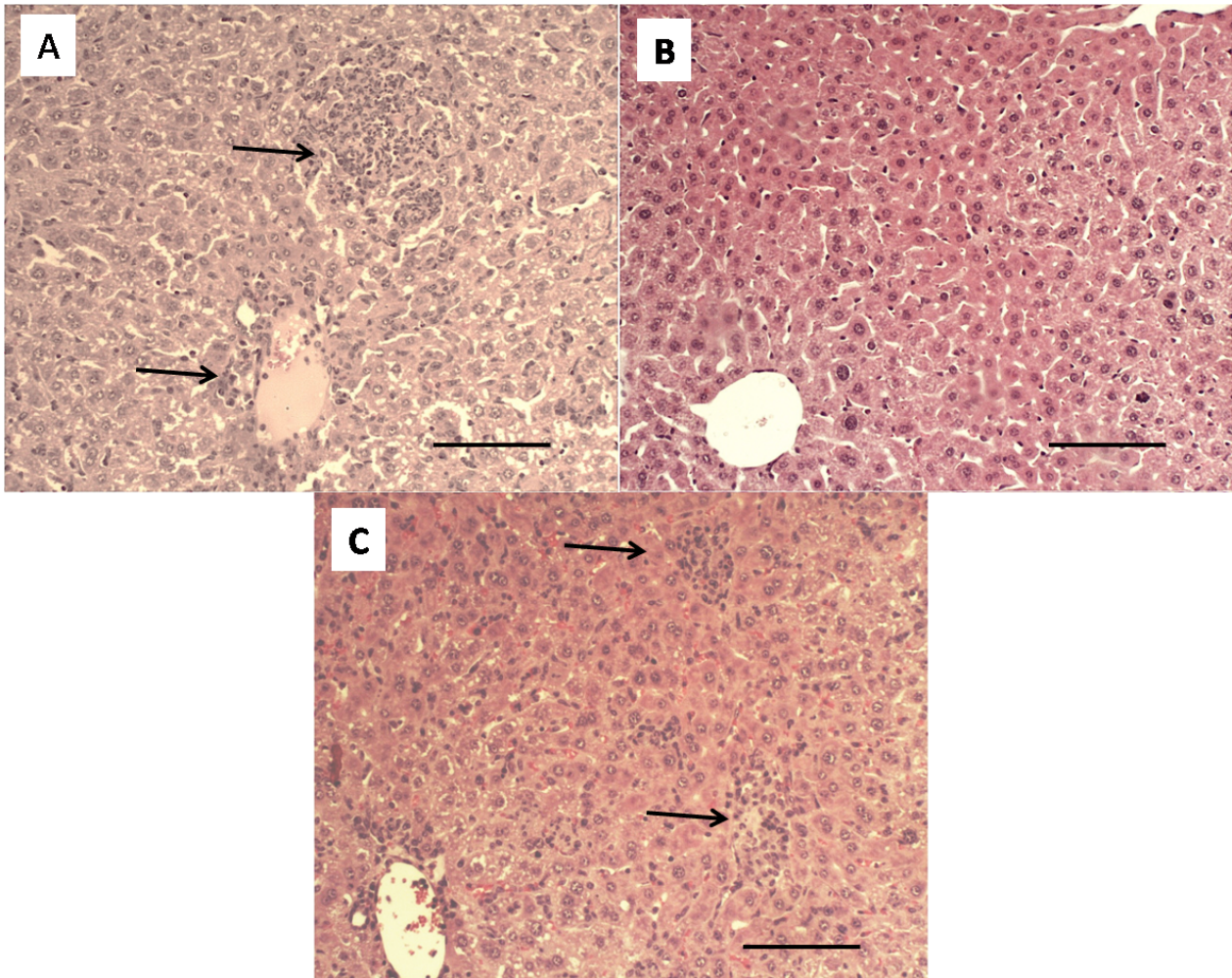


Figura 18: Histologia de fígado de camundongo após 7 dias de infecção com Salmonella Typhimurium, sem tratamento (A) ou tratado com kefir tradicional (B) ou kefir cultura iniciadora (C). A seta indica focos de infiltrado inflamatório no parênquima e próximos ao espaço porta, especialmente na Figura 18A e 18C. H&E. Escala da barra de 100 micrometros.

infecção limita-se ao intestino, fica debilitado, podendo se reabilitar. Apesar de não ter havido diferença significativa na taxa de sobrevivência entre os grupos controle e experimentais neste trabalho, não observamos lesão no fígado da maioria dos camundongos tratados com kefir tradicional sugerindo que este kefir possa ter um efeito imunomodulatório sistêmico. VINDEROLA *et. al.* (2006b) demonstraram que o exopolissacarídeo produzido pelo *Lactobacillus kefirifaciens* ATCC 43761 pode influenciar a imunidade sistêmica pela liberação de citocinas no sangue.

A translocação em baixo nível das bactérias ácido lácticas do intestino para os tecidos extra-intestinais (linfonodos mesentéricos, baço e fígado) foi sugerida como um

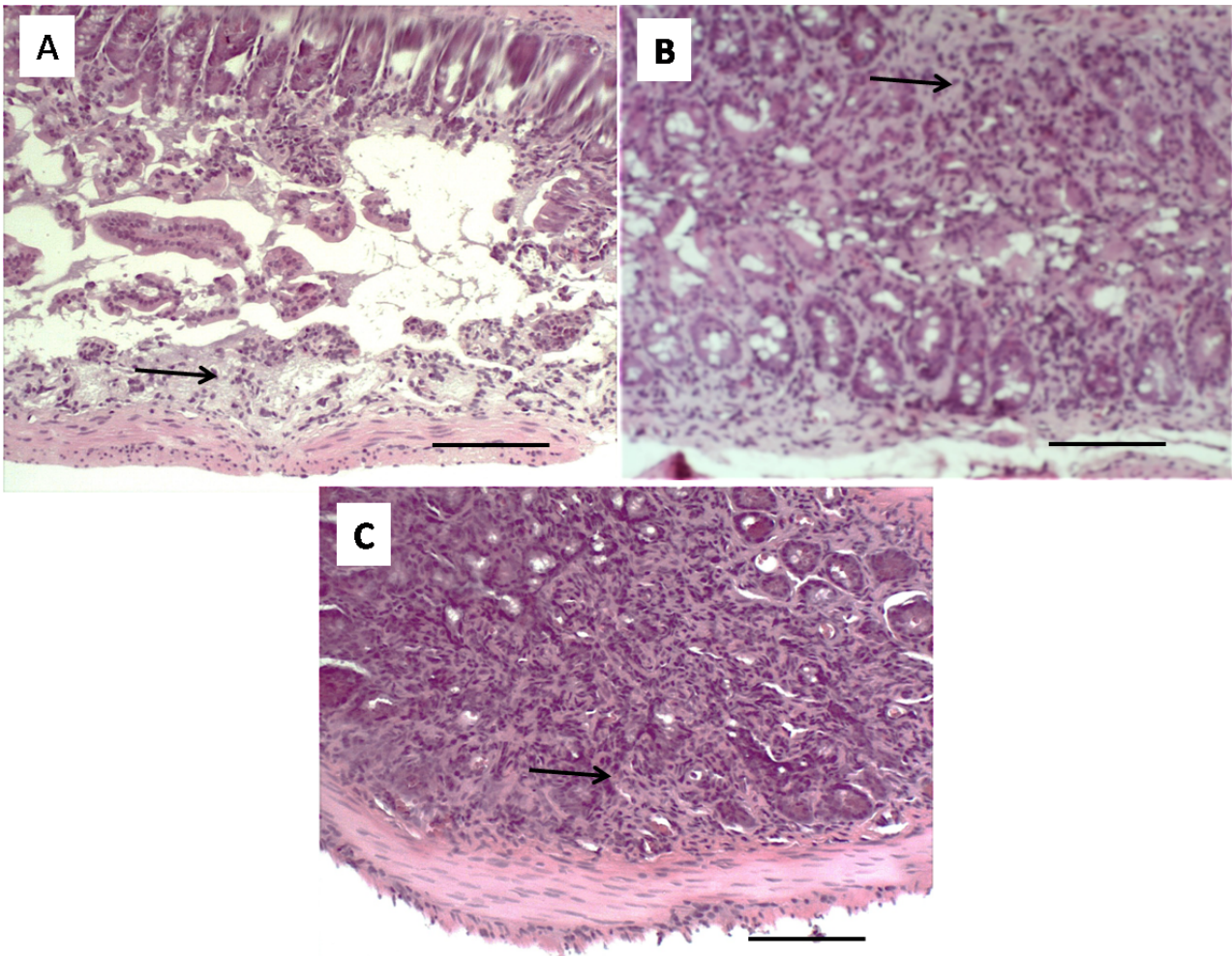


Figura 19: Histologia do íleo de camundongos após 7 dias de infecção com *Salmonella Typhimurium*, sem tratamento (A) ou tratado com kefir tradicional (B) ou tratado com kefir cultura iniciadora (C). A seta indica infiltrado inflamatório difuso na mucosa. Nota-se, também, destruição da arquitetura do vilão com áreas de degeneração. H&E. Escala da barra de 100 micrometros.

processo fisiológico normal e benéfico associado à estimulação imunológica (ZHOU *et. al.*, 2000). Segundo TAKAGASHI *et. al.* (1991), os *Lactobacillus* probióticos podem ser facilmente internalizados no interior das células M do intestino. Um estudo (GALDEANO & PERDIGÓN, 2004) mostrou, no entanto, que os enterócitos não internalizam as bactérias inteiras, mas sim seus fragmentos (partículas antigênicas bacterianas). Esse estudo indica, portanto, que a translocação de bactérias viáveis não é necessária para a imunomodulação.

Estudos confirmaram (THOREUX & SCHMUCKER, 2001; VINDEROLA *et. al.*, 2006b) uma estimulação da imunidade intestinal devido à ingestão de kefir em camundongos. VINDEROLA *et. al.* (2006b) indicaram que o exopolissacarídeo (EPS)

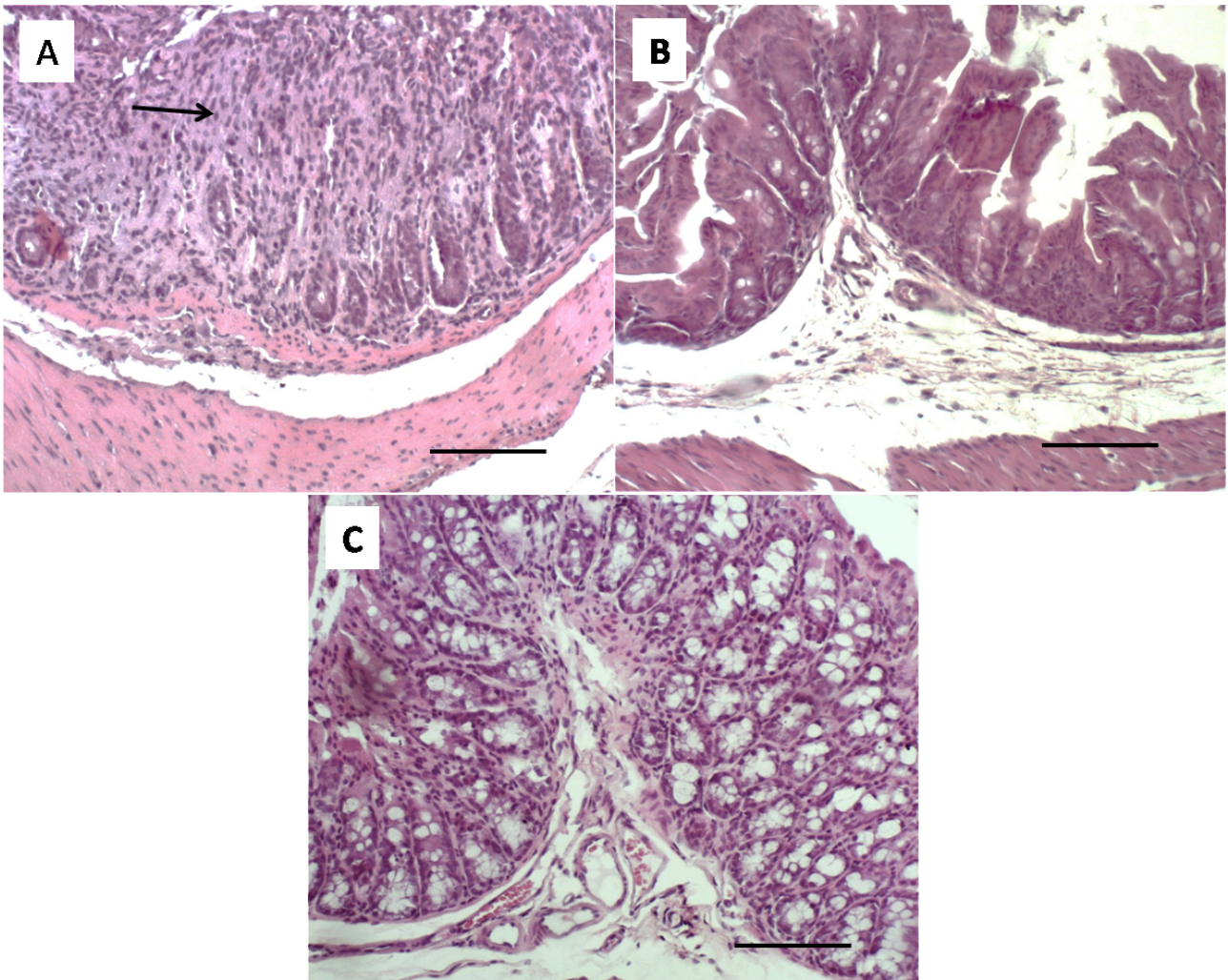


Figura 20: Histologia do cólon dos camundongos após 7 dias de infecção com *Salmonella Typhimurium*, sem tratamento (A) ou tratados com kefir tradicional (B) ou tratados com kefir cultura iniciadora (C). A seta indica infiltrado inflamatório difuso na mucosa. Nota-se, também, ausência de células caliciformes e mudança de espessura brusca da camada muscular. H&E. Escala da barra de 100 micrometros.

produzido pelo *Lactobacillus kefirifaciens* ATCC 43761 pode melhorar a produção de IgA tanto no intestino quanto no cólon. Um estudo *in vivo* (VINDEROLA *et. al.*, 2005) mostrou que kefir pasteurizado ou não foi capaz de modular o sistema imune da mucosa. No nosso trabalho, verificamos que nenhum dos kefir conferiram proteção ao intestino delgado, no entanto, o cólon dos animais tratados com kefir tradicional e kefir cultura iniciadora apresentou-se mais preservado que do grupo controle.

Assim como existem variações entre cepas probióticas e seus benefícios, há variações entre kefir de diferentes origens e, possivelmente, seus efeitos no hospedeiro. Seria necessário avaliar outros aspectos como, por exemplo, a concentração no trato digestivo e translocação da microbiota do kefir e do micro-organismo patogênico, os

níveis de citocinas e de imunoglobulinas durante a infecção experimental. Isto poderia levar a obter dados que permitiriam explicar a ausência de lesão no fígado e cólon da maior parte dos animais tratados com o kefir tradicional.

CONCLUSÕES

O tipo de inóculo (grãos de kefir e cultura iniciadora) e o tempo de armazenamento influenciaram significativamente as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais do kefir.

A acidez do kefir cultura iniciadora ultrapassou o valor limite estabelecido pela legislação após duas semanas de estocagem. O kefir tradicional obteve os menores valores de viscosidade e maior susceptibilidade à sinérese, características que influenciam negativamente a aceitação de leites fermentados. O kefir tradicional apresentou teor de etanol superior àquele estabelecido pela legislação brasileira.

O kefir tradicional e kefir cultura iniciadora podem ser diferenciados apenas em relação aos atributos de fluidez, granulidade, sabor alcoólico e cremosidade. Os provadores demonstraram avaliação negativa em relação às amostras de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora após duas semanas de armazenamento.

As populações de bactérias ácido lácticas e leveduras encontradas nos lotes de kefir tradicional e kefir cultura iniciadora foram superiores às contagens mínimas estabelecidas pela legislação brasileira durante todo o armazenamento.

A fabricação de kefir por fermentação com cultura iniciadora seria o mais indicado para a fabricação da bebida, uma vez que o emprego deste método resultou em uma bebida com uma melhor padronização quanto a suas características e com atributos sensoriais similares aos do kefir tradicional, além de apresentar maior tempo de vida útil.

O kefir cultura iniciadora apresentou-se bom para o consumo até as duas primeiras semanas após sua fabricação, de acordo com os resultados das análises físico-químicas, microbiológica e sensorial, ao contrário do kefir tradicional. Este último apresentou teor alcoólico superior ao limite estabelecido desde sua fabricação.

O tratamento com os dois kefir não foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade dos animais em decorrência da infecção por *Salmonella* Typhimurium, portanto, nenhuma das amostras de kefir foram capazes proteger contra o desafio patogênico. Apesar do grupo tratado com kefir tradicional ter apresentado maior ganho de peso e melhor aspecto histopatológico do fígado e cólon em comparação aos demais grupos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 1998. *NBR 14141*: escalas utilizadas em análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro.
- ABRAHAM, A. G.; RIMADA, P. S. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 33-39, 2006.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 83-90, 2007.
- ASSADI, M. M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 16, p. 541-543, 2000.
- BARBOSA, F. H. F.; BAMBIRRA, F. H. S.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. R. Efeito antagonista de um *Peptostreptococcus* sp. da microbiota fecal humana frente a *Clostridium difficile* – avaliação *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em camundongos gnotoxênicos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, p. 1-8, 2006.
- BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; DIMITROV, Zh. P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, v.13, p. 529-535, 2003.
- BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; SIMOV, Z. I.; FRENGOVA, G. I.; SPASOV, Z. N. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, v. 19, p. 537-544, 2002.
- BISTRÖM, M.; NORDSTRÖM, K. Identification of key success factors of functional dairy foods product development. *Trends in Food Science & Technology*, v. 13, p. 372-379, 2002.
- BORIVANT, M.; STROBER, W. The mechanism of action of probiotics. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 23, p. 679-692, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 05 de 13 de novembro de 200. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. *Diário Oficial*, Brasília, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n. 278 de 22 de setembro de 2005. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Anexo II. *Diário Oficial da União*, Brasília, 23 setembro 2005, Atualizado em julho/2008.

- BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ANGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 2465-2467, 2000.
- CARNEIRO, R. P. *Estudo de quefir produzido por diferentes métodos*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 2010. 142p. (Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos).
- CAIS-SOKOLIŃSKA, D.; DANKÓW, R.; PIKUL, J. Physicochemical and sensory characteristics of sheep kefir during storage. *Acta Scientiarum Polonorum, Technol. Aliment.*, v. 7, p. 63-73, 2008.
- CANI, P. D. Modulation nutritionelle du microbiote intestinal: impact sur la perméabilité intestinale et les désordres métaboliques. *Médecine des Maladies Métaboliques*, v. 3, n. 3, p. 280-284, 2009.
- CARPUSO, L.; FAVE, G. D.; MORELLI, L. Probiotics, prebiotics, and new foods. *Journal of Clinical Gastroenterology*, v. 42, suppl. 3, part 2, p. S155, 2008.
- CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by cultured-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, v. 25, p. 492-501, 2008.
- CHEN, H. T., WANG, S. Y., CHEN, K. N., LIU, J. R., CHEN, M. J. Microbiological and chemical properties of kefir manufacture by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Science*, v. 92, p. 3002-3013, 2009.
- COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*, v. 85, p. 112-118, 2007.
- COPPOLA, M. M.; TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, p. 1297-1303, 2004.
- CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; VAN DENDER, A. G. F. Packaging system and probiotic dairy foods. *Food Research International*, v. 40, p. 951-956, 2007.
- CRUZ A. G.; BURITI F. C.A.; SOUZA C. H. B., FARIA J. A.F.; SAAD S.M.I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends Food Science Technology*, v. 20, p. 344-354, 2009.
- CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 29, p. 103-116, 2008.
- DE MARCHI, R. *Bebida de maracujá natural "light" pronta para beber: formulação, produção e estudo de vida-de-prateleira*. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP. 2006. 206p. (Tese, Doutorado em Alimentos e Nutrição).

- DE VRESE, M.; STEGELMANN, A.; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics – compensation for lactase insufficiency. *America Journal Clinical Nutrition*. v. 73, p. S421-S429, 2001.
- DOGAN, M. Rheological behaviour and physicochemical properties of kefir with honey. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. v.5, 2010.
- DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 108, p. 510-521, 2008.
- ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Effect of fat replacer on kefir quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 90, p. 543-548, 2009.
- EUROMONITOR. 2009. Functional foods: a world survey. Euromonitor international, London. Functional Times, Food Business, February, 35. 6 p.
- FARIA, E. V.; YOTSUYANAGI, K. *Técnicas de análise sensorial*. 2. ed. Campinas: ITAL, 2008, 120p.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). *Codex Standard for Fermented Milks*, n°. 243. Washington, DC: FAO/WHO, 2003. 8p.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). *Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Londres, Ontário, Canadá: FAO/WHO, 2002. 11p.
- FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. *Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods*, v. 2, p. 1-17, 2005.
- FEDORAK, R. N.; MADSEN, K. L. Probiotics and prebiotics in gastrointestinal disorders. *Current Opinion Gastroenterology*, v. 20, p. 146-155, 2004.
- FELLEY, C. P.; CORTHESEY-THEULAZ, I.; RIVERO, J. L.; SIPPONEN, P.; KAUFMANN, M.; BAUERFEIND, P. Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori* gastritis in man. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*. v. 13, p. 25-29, 2001.
- FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; MONTEIRO, D.; FARIA, S.; CRUZ, S.; FERREIRA, A.; ROQUE, A. C.; TAVARES, P. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science*. v. 93, p. 27-31, 2010.
- FLOCH, M. H.; MONTROSE, D. C. Use of probiotics in humans: an analysis of the literature. *Gastroenterology Clinics of North America*. v. 34, p. 547-570, 2005.
- FONTÁN, M. C. G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALHO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 762-767, 2006.

- Food Processing. 2009. Modest growth for global probiotic market, 2009. Available from: <http://www.foodprocessing.com/articles/2008/383.html>. Accessed Jul 20, 2009.
- FOOKS, L. J.; GIBSON, G. R. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, v. 88, p. S39-S49, 2002.
- FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHOKA, D. M.; SIMOV, Z. I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Zeitschrift für Naturforsch.* v. 57, p. 805-810, 2002.
- FU, B.; LABUZA, T. P. Growth kinetics for shelf-life prediction: theory and practice. *Journal of Industrial Microbiology*, v. 12, p. 209-323, 1993.
- FURRIE, E. Probiotics and allergy. *Proceedings of the Nutrition Society*. v. 65, p. 465-469, 2005.
- GALDEANO, M. C.; PERDIGÓN, G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *Journal of Applied Microbiology*. v. 97, p. 673-681, 2004.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 68, p. 639-652, 2001.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *Journal of Dairy Research*. v. 65, p. 149-154, 1998.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. D. Preservation of kefir grains, comparative study. *Lebensm. -Wiss. u.-Technology*, v. 30, p. 77-84, 1997.
- GEIER, M. S.; BUTLER, R. N.; HOWARTH, G. S. Inflammatory bowel disease: Current insights into pathogenesis and new therapeutic options; probiotics, prebiotics and synbiotics. *International Journal of Food Microbiology*. v. 115, p. 1-11, 2007.
- GILL, H. S.; GUARNER, F. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, v. 7, p. 1-12, 2004.
- GIRAFFA, G. Microbial polysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry. *Industrie Alimentari*. v. 33, p. 295-298, 1994.
- GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *International Journal of Food Microbiology*. v. 118, p. 264-273, 2007.
- GRAJEK, W.; OLEJNIK, A.; SIP, A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods. *Acta Biochimica Polonica*, v. 52, p. 1-7, 2004.
- GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. *Current Opinion Gastroenterology*, v. 24, p. 22-26, 2008.

- GUEIMONDE, M.; SAKATA, S.; KALLIOMAKI, M.; ISOLAURI, E.; BENNO, Y.; SALMINEN, S. Effect of maternal consumption of *Lactobacillus* GG on transfer and establishment of fecal bifidobacterial microbiota in neonates. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutrition*. v. 42, p. 166-170, 2006.
- GUZEL-SEYDIM, Z.; WYFFELS, J.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. *International Journal of Dairy Technology*. v. 58, p. 25-29, 2005.
- HASLER, C. M. The cardiovascular effects of soy products. *Journal of Cardiovascular Nursing*. v. 16, p. 50 –63, 2002.
- HE, T.; PRIEBE, M. G.; ZHONG, Y.; HUANG, C.; HARMSSEN, H. J. M.; RAANGS, G. C.; ANTOINE, J.-M.; WELLING, G. W.; VONK, R. J. Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*. v. 104, p. 595-604, 2008.
- HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal American Dietetic Association*, v. 103, p. 582-587, 2003.
- HICKSON, M.; D'SOUZA A. L.; MUTHU, N.; ROGERS, T. R.; WANT, S.; RAJKUMAR, C. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *British Medical Journal*. v. 335, p. 80-83, 2007.
- HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; SNEL, J.; SCHILLINGER, U.; HUIS in't VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, v. 41, p. 85-101, 1998.
- HONG, W. S.; CHEN, H. C.; CHEN, Y. P.; CHEN, M. J. Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated of kefir grain on cytokine production by macrophage. *International Dairy Journal*. v. 19, p. 244-251, 2009.
- HUANG, J. S.; BOUSVAROS, A.; LEE, J. W.; DIAZ, A.; DAVIDSON, E. J. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. v. 47, p. 2625-2634, 2002.
- HUGHES, R.; MAGEE, E.A.; BINGHAM, S. Protein degradation in the large intestine: relevance to colorectal cancer. *Current Issues Intestinal Microbiology*. v. 1, p. 51–58, 2000.
- IDF (International Dairy Federation). *General standard of identity for fermented milks*. Standard 163. Bruxelles: IDF, 1992.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. *Métodos Químicos e Físicos para análise de Alimentos*. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1018p.

- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBANEZ, F.C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, v. 90, p. 613-620, 2005.
- ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; OUWEHAND, A. C. Probiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 18, p. 299-313, 2004.
- JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.
- JIANZHONG, Z.; XIAOLI, L.; HANHU, J.; MINGSHENG, D. Analysis of the microbiota in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, v. 26, p. 770-775, 2009.
- KATARIA, J.; LI, N.; WYNN, J. L., NEU J. "Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial?". *Nutrition Reviews*, v. 67, n. 9, p. 546-550, 2009.
- KAUR, I. P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 15, p. 1-9, 2002.
- KEMPKA, A. P.; KRÜGER, R. L.; VALDUGA, E.; Di LUCCIO, M.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R.; OLIVEIRA, D. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 170-177, 2008.
- KHURANA, H. K.; KANAWJIA, S. K. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, v. 3, p. 91-108, 2007.
- KOTOWSKA, M.; ALBRECHT, P.; SZAJEWSKA, H. *Saccharomyces boulardii* in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. v. 21, p. 583-590, 2005.
- KOROLEVA, N. S. Technology of kefir and kumys. *Bulletin of the International Dairy Federation*. v. 277, p. 96-100, 1988.
- KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, p. 329-347, 2008.
- KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on currently regulatory terminology. *Food Control*, v. 12, p. 109-117, 2001.
- KWAK, H. S.; PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of kefir a nonlactose-fermenting yeast. *Journal of Dairy Science*. v. 79, p. 937-942, 1996.
- LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. *Pharmacological Research*. v. 61, p. 219-225, 2010.

- LeBLANC, A. M.; CASTILLO, N. A.; PERDIGON, G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *International Journal of Food Microbiology*. v. 138, p. 223-231, 2010.
- LEE, M. Y.; AHN, K. S.; KWON, O. K.; KIM, M. J.; KIM, M. K.; LEE, I. Y.; OH, S. R.; LEE, H. K. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*, v. 212, p. 647-654, 2007.
- LEWIS, M.; DALE, R.H. Chilled yogurt and other dairy desserts. In: MAN, D.; JONES, A. (Ed.) *Shelf life evaluation of foods*, Aspen Publishers, Maryland, 2000, p. 89–109.
- LIN-HUI SU, M. S.; CHIU, C. H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Medical Journal*, v. 30, p. 210-219, 2007.
- LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Antimutagenic and antioxidant properties of milk-kefir and soymilk-kefir. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 53, p. 2467-2474, 2005.
- LIU, J. R.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J.; CHEN, H. L.; YUEH, P. Y.; LIN, C. W. Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soymilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British Journal of Nutrition*, v. 95, p. 939-946, 2006.
- LIU, J. R.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J.; YUEH, P. Y.; LIN, C. W. The anti-allergenic properties of milk kefir and soymilk kefir and their beneficial effects on the intestinal microbiota. *Journal of the Science of Food Agriculture*, v. 86, p. 2527-2533, 2006a.
- LIU, J. R.; WANG, S. Y.; LIN, Y. Y.; LIN, C. W. Antitumor activity of milk-kefir and soymilk-kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*. v. 44, p. 182-187, 2002.
- LIUT KEVICIUS, A.; SARKINAS, A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. *Dairy Science Abstracts*, v. 66, p. 903, 2004.
- LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. v. 27, p. 93-103, 2008.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 23, p. 67-74, 2006.
- MAGALHÃES, K. T.; DRAGONE, G.; PEREIRA, G. V. M.; OLIVEIRA, J. M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. *Food Chemistry*. v. 126, p. 249-253, 2010.
- MARQUINA, D.; SANTOS, A.; CORPAS, I.; MUÑOZ, J.; ZAZO, J.; PEINADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 136-140, 2002.

- MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; BROOKER, B. E. Observations on the structure of kefir grains and the distribution of the microbiota. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 57, p. 491-497, 1984.
- MARTINS, F. S.; TIAGO, F. C. P.; BARBOSA, F. H. F.; PENNA, F. J.; NARDI, R. M. D.; NEVES, M. J.; NICOLI, J. R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciência da Terra*, v. 5, p. 1-13, 2005.
- MARTINS, F. S.; VELOSO, L. C.; ARANTES, R. E. M.; NICOLI, J. R. Effects of yeast probiotic formulation on viability, revival and protection against infection with *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovar Typhimurium in mice. *Letters in Applied Microbiology*. v. 49, p. 738-744, 2009.
- MARTINS, L. S. P. *Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostra de leite fermentado pelos grãos de kefir do Tibet utilizando técnicas voltamétricas e HPLC*. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos da USP. 2006. 176p. (Tese, Doutorado em Ciências – Química Analítica).
- MESQUIARA, M. *Desenvolvimento tecnológico de um sucedâneo de kefir – Iofir*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG. 1999. 71p. (Dissertação, Mestre em Ciência de Alimentos).
- McFARLAND, L. V. Meta-analysis of probiotics for prevention of antibiotic associated diarrhea and treatment of *Clostridium difficile* disease. *American Journal of Gastroenterology*, v. 101, p. 812–22, 2006.
- McFARLAND, L. V. Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Medicine and Infectious Disease*. v. 5, p. 97-105, 2007.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. 3. ed. Boca Rotan, FL: CRC Press, 1999, 387p.
- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory Evaluation Techniques*. 4. ed. Boca Rotan, FL: CRC Press, 2007, p.
- MITUNIEWZ-MALEK, A.; DMYTRÓW, I.; JASIŃSKA, M. Quality of kefir produced using activeflora probiotic. *Eletronic Journal of Polish Agricultural Universities*. v. 12, 2009.
- MOMBELLI, B.; GISMONDO, M. R. The use of probiotics in medical practice. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 16, p. 531-536, 2000.
- MONTALTO, M.; D'ONOFRIO, F.; GALLO, A.; GAZZATO, A.; GASBARRINI, G. Intestinal microbiota and its functions. *Digestive and Liver Disease Supplements*, v. 3, p. 30-34, 2009.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, p. 109-122, 2006.

- MOTAGHI, M.; MAZAHERI, M.; MOAZAMI, N.; FARKHONDEH, A.; FOOLADI, M. H.; GOLTAPEH, E. M. Short communication: kefir production in Iran. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 13, p. 579-581, 1997.
- MOURA, L. N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R. Protection of *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral infection with *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium in gnotobiotic and conventional mice. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 32, p. 66-69, 2001.
- MUTLU, E. A.; FARHADI, A.; KESHAVARZIAN, A. New developments in the treatment of inflammatory bowel disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. v. 11, p. 365-385, 2002.
- MUIR, D; D.; TAMIME, A. Y.; WSZOLEK, M. Comparison of the sensory profiles kefir, buttermilk and yogurt. *International Journal of Dairy Technology*. v. 52, p. 129-134, 1999.
- MUÑOZ, A. M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. *Sensory Evaluation in Quality Control*. . New York: Van Nostrand Reinhold, 1992,
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, 1996.
- NICOLI, J. R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, v. 15, p. 183-190, 1995.
- NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Probióticos, prebióticos y simbióticos: Moduladores del sistema digestivo. *Ciencia Hoy*, v. 13, n. 75, p. 39-43, 2003.
- NINANE, V.; MUKANDAYAMBAGE, R.; BERBEN, G. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir: le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, v. 13, p. 459-466, 2009.
- NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 100, p. 583-592, 2005.
- OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annual Review of Medicine*, v. 52, p. 252-259, 2001.
- OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, p. 1-21, 2002.
- OTLES, S.; CADINGI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, p. 54-59, 2003.
- OTT, A.; GERMOND, J.-E.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Aroma comparisons of traditional and mild yogurts: Headspace gas chromatography quantification of

volatiles and origin of α -diketones. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 47, p. 2379-2385, 1999.

OTT, A.; GERMOND, J.-E.; BAUMGARTNER, M.; CHAINTREAU, A. Sensory investigation of yogurt flavorperception: Mutual influence of volatiles and acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. v. 48, p. 441-450, 2000.

PANTOFlickOVA, D.; CORTHÉSY-THEULAZ, I.; DORTA, G.; STOLTE, M.; ISLER, P.; ROCHAT, F.; ENSLEN, M.; BLUM, A. L. Favourable effect of regular intake of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* on *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. v. 18, p. 805-813, 2003.

PIERMARIA, J. A.; DE LA CANAL, M. L.; ABRAHAM, A. G. Gelling properties of kefiran, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*. v. 22, p. 1520-1527, 2008.

PIZARRO, C. A. C. *Avaliação de melão minimamente processado armazenado em diferentes temperaturas e embalagens*. Campinas: Faculdade de Engenharia Agrícola da UNICAMP. 2003. 81p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Agrícola – Tecnologia pós-colheita).

PONTES, M. M. M. *Polpa de manga processada por alta pressão hidrostática: aspectos microbiológicos, nutricionais, sensoriais e percepção do consumidor*. Seropédica: Instituto de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ. 2008. 136p. (Dissertação, Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

QUIGLEY, E. M. M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacological Research*. v. 61, p. 213-218, 2010.

RASTALL, R. A.; GIBSON, G. R.; GILL, H. S.; GUARNER, F.; KLAENHAMMER, T. R.; POT, B.; REID, G.; ROWLAND, I. R.; SANDERS, M. E. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: An overview of enabling science and potential applications. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 52, p. 145-152, 2005.

REA, M. C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, T. M. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 81, p. 83-94, 1996.

REIF, C.; KELLY, D. Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *International Journal of Medical Microbiology*. v. 300, p. 25-33, 2010.

RIZKALLA, S. W.; LUO, J.; KABIR, M. Chronic consumption of fresh but not heated yoghurt improves breath-hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: a controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *American Journal Clinical Nutrition*. v. 72, p. 1474-1479, 2000.

ROBINSON, R. *Therapeutics properties of fermented milks*. Essex (England):Elsevier, p. 185, 1991.

- RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 25, p. 404-408, 2005.
- ROSADO, J. L.; SOLOMONS, N. W.; ALLEN L. H. Lactose digestion from unmodified, low-fat and lactose-hydrolyzed yogurt in adult lactose-maldigesters. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 46, p. 61-67, 1992.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, p. 1-16, 2006.
- SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. *The Journal of Pediatrics*, v. 149, p. S115-S120, 2006.
- SANGALETTI, N. *Estudo da vida útil do queijo minas frescal disponível no mercado*. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da USP. 2007. 81p. (Dissertação, Mestre em Ciências).
- SANTOS, A.; SAN MOURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 26, p. 434-437, 2003.
- SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*, v. 110, p. 283-295, 2008.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Journal of Nutrition*, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SAVAGE, D. C. Microbial Ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review Microbiology*, v. 31, p. 107-133, 1977.
- SAXELIN, M. probiotic formulations and applications, the current probiotics market, and changes in the marketplace: a european perspective. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. S76-S79, 2008.
- SCHREZENMEIR, J.; DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotics – approaching a definition. *American Journal Clinical Nutritional*, v. 73, p. S1-S4, 2001.
- SILVA, A. M.; BAMBIRRA, E. A.; OLIVEIRA, A. L.; SOUZA, P. P.; GOMES, D. A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J. R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella* Typhimurium in conventional and gnotobiotic mice. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 331-336, 1999.
- SILVA, A. M.; BARBOSA, F. H. F.; DUARTE, R.; VIEIRA, L. Q.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R. Effect of Bifidobacterium longum ingestion on experimental salmonellosis in mice. *Journal of Applied Microbiology*, v. 97, p. 29-37, 2004.
- SILVA, K. R.; RODRIGUES, S. A.; XAVIER FILHO, L.; LIMA, A. S. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. *Applied Biochemical and Biotechnological*. v. 152, p. 316-325, 2009.

- SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. v. 28, p. 1-6, 2002.
- SIMOVA, E. D.; SIMOV, Z. I.; BESHKOVA, D. M.; FRENGOVA, G. I.; DIMITROV, Z. P.; SPASOV, Z. Amino acid profiles of lactic acid bacteria, isolated from kefir grains and kefir starter made from them. *International Journal of Food Microbiology*, v. 107, p. 112-123, 2006.
- SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*, v. 51, p. 456-467, 2008.
- SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers” (Litesse e Dairy-Lo). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 22, p. 24-31, 2002.
- SNELLING, A. M. Effects of probiotics on the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 18, p. 420-426, 2005.
- SPIES, L. A. Traveler's diarrhea: An update on prevention and treatment. *Journal of Midwifery & Women's Health*. v. 53, p. 251-254, 2008.
- STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos – Artigo de revisão. *Saúde e Ambiente em Revista*, v. 3, p. 16-33, 2008.
- STONE, H.; SIDEL, J. *Sensory Evaluation Practices*. 3. ed. New York/London: Academic Press, 2004, 311p.
- STONE, H.; SIDEL, J.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R. C. Sensory evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technology*. v. 28, p. 24, 1974.
- SULLIVAN, A.; NORD, C. E. The place of probiotics in human intestinal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 20, p. 313-319, 2002.
- TAKAGASHI, M.; IWATA, S.; YAMAKASI, N.; FUJIWARA, H. Phagocytosis of lactic acid bacteria by M cells rabbit Peyer's patches. *Journal of Clinical Electron Microscopy*. v. 24, p. 5-6, 1991.
- TAMIME, A. Y.; WSZOLEK, M.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 34, p. 251-261, 2001.
- TAMIME, A. Y. Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, p. S2-S15, 2002.
- TEITELBAUM, J. E.; WALKER, W. A. Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Reviews Nutrition*, v. 22, p. 107-138, 2002.

- THOREUX, K.; SCHUMUCKER, D. L. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but no old rats. *Nutrition and Aging*. v. 131, p. 807-812, 2001.
- TIIHONEN, K.; OUWEHAND, A. C.; RAUTONEN, N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Research Reviews*. v. 9, p. 107-116, 2010.
- TRATNIK, L.; BOZAŃIC, R.; HERCEG, Z.; DRGALIC, I. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *International Journal of Dairy Technology*. v. 59, p. 40-46, 2006.
- ULUSOY, B. H.; ÇOLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ERKAN, M. E. An *in vitro* study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. v.37, p. 103-107, 2007.
- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v. 18, p. 714-728, 2008.
- VIEGAS, R. P. *Leites fermentados probióticos produzidos a partir de bactérias ácido-lácticas e adicionados de concentrado protéico de soro lácteo: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais*. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG. 2008. 70p. (Dissertação, Mestrado em Ciência Animal).
- VIEIRA, L. Q.; SANTOS, L. M.; NEUMANN, E.; SILVA, A. P.; MOURA, L. N.; NICOLI, J. R. Probiotics protect mice against experimental infections. *Journal of Clinical Gastroenterology*. v. 42, p. S168-S169, 2008.
- VILJANEN, M.; SAVILAHTI, E.; HAAHTELA, T.; JUNTUNEN-BACKMAN, K.; KORPELA, R.; POUSSA, T. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: A double-blind placebo-controlled trial. *Allergy*. v. 60, p. 494-500, 2005.
- VINDEROLA, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; FARNWORTH, E.; PERDIGON, G.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*. v. 75, p. 175-202, 2005.
- VINDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*. v. 211, p. 149-156, 2006a.
- VINDEROLA, G.; MATAR, C.; PERDIGON, G. Milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 and its non-bacterial fraction confer enhanced protection against *Salmonella enteritidis* serovar Typhimurium infection in mice. *Immunobiology*. v. 212, p. 107-118, 2007.
- VINDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research*. v. 73, p. 472-479, 2006.

- VITALI, A. A.; QUAST, D. G. Vida-de-prateleira de alimentos. In: MOURA, S. C. S. R.; GERMER, S. P. M. (Ed.) *Reações de Transformação e Vida-de-Prateleira de Alimentos Processados*. Campinas: ITAL, 2004. p. 49-57.
- WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 283-288, 2008.
- WEILL, F. X. Salmonella: épidémiologie, typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*, v. 400, p. 37-47, 2008.
- WITTHUHN, R. C.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. J. Evaluation of different preservation techniques on the storage potential kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v. 72, p. 125-128, 2005a.
- WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, v. 15, p. 383-389, 2005.
- WRÓBLEWSKA, B.; KOLAKOWSKI, P.; PAWLIKOWSKA, K.; TROSZYŃSKA, A.; KALISZEWSKA, A. Influence of the addition of transglutaminase on the immunoreactivity of milk proteins and sensory quality of kefir. v. 23, p. 2434-2445, 2009.
- WHO/FAO/OIE. (World Health Organization/Food and Agricultural Organization) Background document for the Joint WHO / FAO / OIE expert. *Workshop on Non-Human Antimicrobials Usage and Antimicrobials Resistance Scientific Assessment*. Geneva, Switzerland: WHO/FAO/OIE, 2003.
- WSZOLEK, M., TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. v. 34, p. 251-261, 2001.
- XIAO, J. Z.; KONDO, S.; TAKAHASHI, N.; MIYAJI, K.; OSHIDA, K.; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; HOSONO, A. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*. v. 86, p. 2452–2461, 2003.
- YAMAN, H.; ELMALI, M.; KAMBER, U. Observation of lactic acid bacteria and yeast populations during fermentation and cold storage in cow's, ewe's and goat's milk kefir. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. v. 16 (suppl.A), p. S113-S118, 2010.
- YILMAZ, L.; YILSAY, T. O.; BAYIZIT, A. The sensory characteristics of berry-flavoured kefir. *Czech Journal of Food Science*. v. 24, p. 26-32, 2006.
- ZAJSEK, K.; GORSEK, A. Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. *Food and Bioproducts Processing*. v. 88, p. 55-60, 2010a.

ZAJSEK, K.; GORSEK, A. Mathematical modelling of ethanol production by mixed kefir grains yeast population as a function of temperature variations. *Biochemical Engineering Journal*. v. 49, p. 7-12, 2010.

ZHOU, J. S.; SHUN, Q.; RUTHERFURD, K. J.; PRASAD, J.; GOPAL, P. K.; GILL, H. S. Acute oral toxicity and bacterial translocation studies on potentially probiotic strains of lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*. v. 38, p. 153-151, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TABELAS COM OS RESULTADOS DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DAS AMOSTRAS DE KEFIR

Tabela 12: Perfil do pH (, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.*

Amostra	pH					
	0 dia	2° dia	7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
TRAD 1	4,53 ± 0,05 ^{A,a}	4,30 ± 0,00 ^{B,a}	4,30 ± 0,00 ^{B,a}	4,30 ± 0,00 ^{B,a}	4,25 ± 0,06 ^{B,a}	4,30 ± 0,00 ^{B,a}
TRAD 2	4,50 ± 0,00 ^{A,a}	4,40 ± 0,06 ^{B,a}	4,38 ± 0,05 ^{B, b}	4,38 ± 0,05 ^{B,b}	4,30 ± 0,00 ^{C,a}	4,30 ± 0,00 ^{C,a}
TRAD 3	4,50 ± 0,00 ^{A,a}	4,35 ± 0,00 ^{B,a}	4,40 ± 0,00 ^{B,b}	4,38 ± 0,05 ^{B,b}	4,30 ± 0,00 ^{C,a}	4,30 ± 0,00 ^{C,a}
Média	4,50 ± 0,03 ^A	4,35 ± 0,05 ^B	4,36 ± 0,05 ^B	4,35 ± 0,05 ^B	4,28 ± 0,04 ^C	4,30 ± 0,00 ^C

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

Tabela 13: Perfil do pH (, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.*

Amostra	pH					
	0 dia	2° dia	7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
CI 1	4,40 ± 0,00 ^{A,a}	4,30 ± 0,00 ^{A,B,a}	4,20 ± 0,00 ^{B,C,a}	4,10 ± 0,00 ^{C,D,a}	4,00 ± 0,00 ^{D,a}	4,00 ± 0,00 ^{D,a}
CI 2	4,40 ± 0,00 ^{A,a}	4,30 ± 0,14 ^{A,B,a}	4,20 ± 0,00 ^{B,C,a}	4,10 ± 0,00 ^{C,D,a}	4,00 ± 0,00 ^{D,a}	4,00 ± 0,00 ^{D,a}
CI 3	4,30 ± 0,00 ^{A,a}	4,10 ± 0,00 ^{B,b}	4,08 ± 0,05 ^{B,a}	4,00 ± 0,00 ^{B,C,a}	3,90 ± 0,00 ^{C,a}	3,70 ± 0,00 ^{D,b}
Média	4,37 ± 0,05 ^A	4,23 ± 0,12 ^B	4,16 ± 0,07 ^C	4,07 ± 0,05 ^D	3,97 ± 0,05 ^E	3,90 ± 0,15 ^F

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

Tabela 14: Perfil da acidez (, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.*

Lote	Acidez (% de ácido láctico)					
	0 dia	2° dia	7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
TRAD 1	0,71 ± 0,02 ^{A,a}	0,79 ± 0,01 ^{B,a}	0,80 ± 0,04 ^{B,a}	0,88 ± 0,01 ^{C,a}	0,89 ± 0,02 ^{C,a}	0,98 ± 0,02 ^{D,a}
TRAD 2	0,78 ± 0,02 ^{A,b}	0,81 ± 0,01 ^{A,B,a}	0,81 ± 0,02 ^{A,B,a}	0,82 ± 0,03 ^{A,B,b}	0,84 ± 0,04 ^{B,b}	0,90 ± 0,03 ^{C,b}
TRAD 3	0,72 ± 0,01 ^{A,a}	0,74 ± 0,01 ^{A,b}	0,76 ± 0,02 ^{A,B,b}	0,79 ± 0,02 ^{B,b}	0,80 ± 0,01 ^{B,b}	0,80 ± 0,02 ^{B,c}
Média	0,74 ± 0,04 ^A	0,78 ± 0,03 ^B	0,79 ± 0,03 ^C	0,83 ± 0,04 ^D	0,84 ± 0,05 ^D	0,89 ± 0,08 ^E

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

Tabela 15: Perfil da acidez (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Acidez (% de ácido láctico)					
	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
CI 1	0,80 ± 0,02 A,a	0,91 ± 0,01 B,a	1,03 ± 0,02 B,a	1,17 ± 0,02 C,a	1,21 ± 0,03 D,a	1,23 ± 0,01 D,a
CI 2	0,82 ± 0,02 A,ab	0,89 ± 0,01 B,a	1,00 ± 0,02 C,ab	1,13 ± 0,01 D,b	1,13 ± 0,01 D,b	1,22 ± 0,03 E,a
CI 3	0,85 ± 0,02 A,b	0,92 ± 0,01 B,a	0,98 ± 0,01 C,b	1,00 ± 0,01 C,c	1,08 ± 0,02 D,c	1,20 ± 0,03 E,a
Média	0,82 ± 0,03 A	0,91 ± 0,02 B	1,00 ± 0,03 C	1,10 ± 0,07 D	1,14 ± 0,06 E	1,21 ± 0,03 F

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

Tabela 16: Perfil da viscosidade (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Viscosidade (centipoise – cP)					
	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
TRAD 1	4,02 ± 0,08 A,a	4,54 ± 0,09 B,a	3,09 ± 0,06 C,a	3,75 ± 0,04 D,a	3,21 ± 0,19 C,a	4,70 ± 0,04 E,a
TRAD 2	5,55 ± 0,26 A,b	5,16 ± 0,14 B,b	5,28 ± 0,12 B,b	2,85 ± 0,01 C,b	3,16 ± 0,03 D,a	2,49 ± 0,02 E,b
TRAD 3	3,43 ± 0,03 A,c	3,73 ± 0,25 B,c	3,49 ± 0,15 A,c	1,84 ± 0,01 C,c	1,70 ± 0,00 C,b	3,43 ± 0,06 A,c
Média	4,31 ± 0,96 A	4,47 ± 0,63 B	3,96 ± 1,00 C	2,81 ± 0,82 D	2,69 ± 0,74 E	3,54 ± 0,94 F

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

Tabela 17: Perfil da viscosidade (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Viscosidade (centipoise – cP)					
	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
CI 1	6,16 ± 0,14 A,a	10,83 ± 0,25 B,a	9,82 ± 0,11 B,a	15,22 ± 0,29 C,a	17,32 ± 0,27 D,a	22,28 ± 1,70 E,a
CI 2	6,97 ± 0,06 A,a	10,27 ± 0,48 B,a	15,13 ± 0,67 C,b	14,82 ± 0,65 D,a	17,40 ± 0,16 E,a	21,56 ± 0,49 F,a
CI 3	7,44 ± 0,85 A,a	12,46 ± 0,77 B,b	15,08 ± 1,37 C,b	17,00 ± 0,62 D,b	17,91 ± 0,23 D,a	22,56 ± 1,10 E,a
Média	6,85 ± 0,71 A	11,19 ± 1,09 B	13,34 ± 2,72 C	15,68 ± 1,10 D	17,54 ± 2,59 D	22,13 ± 1,17 E

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

Tabela 18: Perfil da sinérese (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Sinérese (% m/m)					
	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
TRAD 1	61,6 ± 1,40 A,a	46,6 ± 2,72 D,a	43,1 ± 1,76 D,a	63,1 ± 1,17 A,B,a	65,4 ± 3,73 B,C,a	68,2 ± 0,93 C,a
TRAD 2	47,0 ± 2,61 A,b	58,7 ± 3,12 B,b	58,3 ± 3,32 B,b	69,0 ± 2,78 C,b	70,5 ± 1,78 C,b	70,7 ± 3,02 C,a
TRAD 3	69,2 ± 0,30 A,c	71,6 ± 0,67 A,B,c	68,3 ± 0,90 A,C,c	73,8 ± 0,85 B,c	71,6 ± 1,39 A,B,b	67,6 ± 0,98 C,a
Média	59,3 ± 9,72 A	59,0 ± 10,91 A	56,6 ± 11,03 B	68,6 ± 4,83 C	69,1 ± 3,61 C	68,8 ± 2,24 C

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

Tabela 19: Perfil da sinérese (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Sinérese (% m/m)					
	0 dia	2° dia	7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
CI 1	35,6 ± 1,81 ^{A,a}	33,1 ± 1,50 ^{A,a}	33,8 ± 1,6 ^{A,a}	32,6 ± 1,64 ^{A,a}	34,6 ± 3,03 ^{A,a}	34,5 ± 1,11 ^{A,a}
CI 2	55,5 ± 1,91 ^{A,b}	34,1 ± 2,53 ^{B,a}	32,3 ± 2,37 ^{B,a}	35,4 ± 0,09 ^{B,a}	33,0 ± 1,91 ^{B,a}	36,0 ± 1,35 ^{B,a}
CI 3	46,2 ± 4,92 ^{A,c}	39,1 ± 1,42 ^{B,b}	31,5 ± 1,30 ^{B,a}	32,8 ± 1,80 ^{B,a}	34,4 ± 1,27 ^{B,a}	33,4 ± 1,01 ^{B,a}
Média	45,7 ± 8,96 ^A	35,4 ± 3,22 ^B	32,5 ± 1,93 ^C	33,6 ± 1,90 ^{B,C}	34,0 ± 2,11 ^{B,C}	34,6 ± 1,52 ^{B,C}

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

Tabela 20: Perfil de etanol (*, **) em kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Etanol (% v/v)					
	0 dia	2° dia	7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
TRAD 1	1,8 ± 0,00 ^{A,a}	1,8 ± 0,06 ^{A,a}	2,1 ± 0,48 ^{A,B,a}	2,3 ± 0,34 ^{A,B,a}	2,7 ± 0,10 ^{B,a}	2,7 ± 0,12 ^{B,a}
TRAD 2	1,7 ± 0,06 ^{A,a}	1,7 ± 0,06 ^{A,a}	1,9 ± 0,50 ^{A,a}	2,0 ± 0,15 ^{A,a}	2,1 ± 0,44 ^{A,B,a}	2,7 ± 0,51 ^{B,a}
TRAD 3	1,9 ± 0,24 ^{A,a}	1,9 ± 0,00 ^{A,a}	2,1 ± 0,22 ^{A,a}	2,3 ± 0,21 ^{A,B,a}	2,8 ± 0,72 ^{B,a}	2,8 ± 0,35 ^{B,a}
Média	1,8 ± 0,15 ^A	1,7 ± 0,16 ^A	2,0 ± 0,39 ^{A,B}	2,2 ± 0,25 ^{B,C}	2,5 ± 0,56 ^{C,D}	2,7 ± 0,33 ^D

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

Tabela 21: Perfil de etanol (*, **) em kefir cultura iniciadora durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

Lote	Etanol (% v/v)					
	0 dia	2° dia	7° dia	14° dia	21° dia	28° dia
CI 1	1,3 ± 0,06 ^{A,a}	1,4 ± 0,01 ^{A,a}	1,4 ± 0,05 ^{A,B,a}	1,5 ± 0,05 ^{A,B,a}	1,5 ± 0,05 ^{A,B,a}	1,6 ± 0,10 ^{B,a}
CI 2	1,4 ± 0,06 ^{A,a}	1,4 ± 0,26 ^{A,a}	1,4 ± 0,05 ^{A,a}	1,5 ± 0,08 ^{A,a}	1,5 ± 0,06 ^{A,a}	1,6 ± 0,10 ^{A,a}
CI 3	1,4 ± 0,05 ^{A,a}	1,5 ± 0,00 ^{A,a}	1,5 ± 0,05 ^{A,a}	1,5 ± 0,00 ^{A,a}	1,6 ± 0,00 ^{A,a}	1,6 ± 0,10 ^{A,a}
Média	1,3 ± 0,08 ^A	1,4 ± 0,16 ^{A,B}	1,4 ± 0,06 ^{A,B}	1,5 ± 0,08 ^{B,C}	1,5 ± 0,05 ^{B,C}	1,6 ± 0,11 ^C

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

Tabela 22: Evolução da população de bactérias ácido lácticas (*, **) em kefir tradicional¹ e kefir cultura iniciadora² durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

¹ Bactérias ácido lácticas (Log UFC/mL)						
Lote	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
TRAD 1	9,10 ± 0,02 ^{AB,a}	9,82 ± 0,09 ^{Aa}	9,10 ± 0,28 ^{AB,a}	8,83 ± 0,17 ^{Ba}	8,23 ± 0,54 ^{Ba}	8,37 ± 0,11 ^{Ba}
TRAD 2	9,29 ± 0,08 ^{Aa}	8,97 ± 0,10 ^{Aa}	9,19 ± 0,02 ^{Aa}	8,78 ± 0,11 ^{A,C,a}	7,79 ± 0,27 ^{B,C,a}	8,00 ± 0,33 ^{C,a}
TRAD 3	9,20 ± 0,17 ^{Aa}	7,75 ± 0,55 ^{B,b}	7,39 ± 0,44 ^{B,b}	8,07 ± 0,23 ^{B,C,a}	8,02 ± 0,03 ^{B,C,a}	8,74 ± 0,57 ^{C,a}
Média	9,19 ± 0,12 ^A	8,85 ± 0,96 ^A	8,56 ± 0,94 ^{AB}	8,56 ± 0,41 ^{AB}	8,01 ± 0,33 ^B	8,37 ± 0,45 ^B

² Bactérias ácido lácticas (Log UFC/mL)						
Lote	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
CI 1	8,34 ± 0,14 ^{Aa}	9,33 ± 0,04 ^{AB,a}	9,25 ± 0,15 ^{AB,a}	9,62 ± 0,20 ^{Ba}	8,80 ± 0,45 ^{Aa}	9,74 ± 0,16 ^{Ba}
CI 2	9,09 ± 0,07 ^{A,C,a}	9,04 ± 0,00 ^{Aa}	10,06 ± 0,08 ^{B,b}	10,02 ± 0,03 ^{Ba}	9,61 ± 0,21 ^{B,C,b}	9,52 ± 0,17 ^{C,a}
CI 3	10,07 ± 0,10 ^{Ab}	9,65 ± 0,25 ^{AB,a}	9,46 ± 0,65 ^{B,a,b}	9,72 ± 0,20 ^{AB,a}	8,02 ± 0,52 ^{B,C,a}	10,08 ± 0,83 ^{Aa}
Média	9,37 ± 0,56 ^{AB}	9,34 ± 0,30 ^{AB}	9,59 ± 0,48 ^{AB}	9,79 ± 0,23 ^A	9,26 ± 0,49 ^B	9,78 ± 0,43 ^A

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

Tabela 23: Evolução da população de leveduras (*, **) em kefir tradicional¹ e kefir cultura iniciadora² durante 28 dias de armazenamento a 4°C entre três lotes diferentes.

¹ Leveduras (Log UFC/mL)						
Lote	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
TRAD 1	6,46 ± 0,22 ^{Aa}	7,23 ± 0,04 ^{Aa}	6,19 ± 0,69 ^{Aa}	6,13 ± 0,18 ^{Aa}	6,09 ± 0,12 ^{Aa}	6,26 ± 0,42 ^{Aa}
TRAD 2	6,24 ± 0,05 ^{Aa}	6,39 ± 0,07 ^{Aa}	6,22 ± 0,02 ^{Aa}	6,22 ± 0,06 ^{Aa}	6,03 ± 0,11 ^{Aa}	6,36 ± 0,11 ^{Aa}
TRAD 3	6,31 ± 0,68 ^{Aa}	6,08 ± 0,05 ^{Aa}	5,84 ± 0,08 ^{Aa}	6,29 ± 0,12 ^{Aa}	6,06 ± 0,03 ^{Aa}	6,95 ± 0,07 ^{Aa}
Média	6,34 ± 0,11 ^A	6,57 ± 0,53 ^A	6,08 ± 0,36 ^A	6,21 ± 0,13 ^A	6,06 ± 0,08 ^A	6,52 ± 0,37 ^A

² Leveduras (Log UFC/mL)						
Lote	0 dia	2º dia	7º dia	14º dia	21º dia	28º dia
CI 1	5,79 ± 0,27 ^{Aa}	6,33 ± 0,04 ^{Aa}	5,92 ± 0,32 ^{Aa}	5,97 ± 0,10 ^{Aa}	5,66 ± 0,54 ^{Aa}	6,44 ± 0,03 ^{Aa}
CI 2	5,43 ± 0,70 ^{Aa}	5,98 ± 0,09 ^{AB,a}	6,58 ± 0,03 ^{Ba}	6,16 ± 0,17 ^{AB,a}	5,80 ± 0,14 ^{AB,a}	6,32 ± 0,67 ^{Ba}
CI 3	6,02 ± 0,17 ^{Aa}	6,89 ± 0,01 ^{Ba}	6,16 ± 0,31 ^{AB,a}	5,71 ± 0,10 ^{Aa}	5,52 ± 0,06 ^{Aa}	5,56 ± 0,78 ^{Aa}
Média	5,75 ± 0,41 ^{A,C}	6,40 ± 0,41 ^B	6,22 ± 0,36 ^{AB}	5,95 ± 0,22 ^{AB,C}	5,66 ± 0,28 ^C	6,10 ± 0,63 ^{AB,C}

* Médias com letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

** Médias com letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

TRAD 1, TRAD 2 e TRAD 3 – os três lotes de kefir tradicional analisados.

CI 1, CI 2 e CI 3 – os três lotes de kefir cultura iniciadora analisados.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS PROVADORES

Orientador: Profa Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes (DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS/ FACULDADE DE FARMÁCIA/ UFMG)

Co-orientador: Prof Dr. Jacques Robert Nicoli (DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA/ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS/ UFMG)

Colaborador: Profa Dra. Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière (DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS/ FACULDADE DE FARMÁCIA/ UFMG)

Alunas de Pós-graduação: Raphaella Puccetti Carneiro/ Natália Caldeira de Carvalho (Mestrado em Ciência de Alimentos/PPGCA/Faculdade de Farmácia/UFMG)

O kefir é um leite fermentado de sabor ácido suave, efervescente e de baixo teor alcoólico. O objetivo deste trabalho é avaliar as alterações dos atributos sensoriais de duas amostras de kefir produzidas por diferentes métodos e tipos de inóculos durante o período de armazenamento sob refrigeração. Você será solicitado a responder a um questionário e uma ficha a cada sessão e a avaliar amostras de kefir em 5 (cinco) sessões de teste sensorial.

Podem participar pessoas que tenham hábito de consumir kefir e/ou iogurte natural e/ou leites fermentados, que não apresentem nenhuma restrição à ingestão de açúcares, já que o kefir será adicionado de sacarose, interesse, disponibilidade de tempo e conhecimentos básicos de análise sensorial.

Todos os dados fornecidos são considerados confidenciais, sendo totalmente garantidos o sigilo das informações e a sua privacidade.

A sua participação no projeto tem caráter voluntário e não lhe trará nenhum tipo de ônus ou remuneração.

Desde já agradecemos sua colaboração.

Assinatura dos responsáveis:

1. Profa. Evelyn de Souza Oliveira Lopes Fones: (31) 3409-6914

2. Prof. Jacques Robert Nicoli Fones: (31) 3409-2737

3. Profa.Lúcia Helena Esteves dos Santos Laboissière Fones: (31) 3409-6908 ou (31) 3409-6923

4. Raphaella Puccetti Carneiro Fones: (31) 3409-6925 ou (31) 3409-6931

5. Natália Caldeira de Carvalho Fones: (31) 3409-6925 ou (31) 3409-6931

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP/UFMG): Avenida Antônio Carlos, 6627
Unidade Administrativa II 2º andar sala 2005, Campus Pampulha – CEP: 31270-901 Belo
Horizonte, MG - Brasil
Telefax: (31) 3499-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Compreendi e concordo com as informações que me foram transmitidas e, portanto,
aceito participar como voluntário neste projeto de pesquisa.

Belo Horizonte, ____ de _____ de _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Telefone de contato: _____

E-mail: _____

APÊNDICE C - QUESTIONÁRIO SOCIODEMOGRÁFICO

Estudo sobre Kefir

Caso tenha concordado em participar deste projeto, por favor, complete o questionário com todas as informações solicitadas, as quais serão mantidas confidenciais. Desde já agradecemos sua colaboração.

Nome: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

1. Gênero masculino feminino

2. Idade 15–25 26–35 36–45 46–55 56–65 acima de 66 anos

3. Escolaridade

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental incompleto | <input type="checkbox"/> Superior incompleto |
| <input type="checkbox"/> Ensino Fundamental completo | <input type="checkbox"/> Superior completo |
| <input type="checkbox"/> Ensino Médio incompleto | <input type="checkbox"/> Pós-graduação: Especialização |
| <input type="checkbox"/> Ensino Médio completo | <input type="checkbox"/> Pós-graduação: Mestrado/Doutorado |

4. Profissão: _____

5. Renda familiar mensal

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> 01 a 05 salários mínimos | <input type="checkbox"/> > 10 a 20 salários mínimos |
| <input type="checkbox"/> > 05 a 10 salários mínimos | <input type="checkbox"/> > 20 a 30 salários mínimos |
| | <input type="checkbox"/> > 30 salários mínimos |

6. Você tem alguma restrição de saúde que impossibilite ou torne não recomendado o consumo de produtos adoçados com sacarose (açúcar comercial)?

1. Sim Qual (is)? _____
2. Não

7. Com qual frequência você consome leites fermentados (iogurte, bebida láctea e outros)?

diariamente freqüentemente eventualmente raramente nunca

8. Como você costuma consumir leites fermentados? (Obs: você pode marcar mais de uma opção)

Natural Adicionado Adicionado de Adicionado de Adicionado de Outros:
de açúcar frutas mel cereais

9. Você já tinha ouvido falar sobre kefir?

sim não

10. Alguma vez você já tinha experimentado kefir?

sim não **Quando?**

11. Você tem o hábito de consumir kefir? (se a resposta é sim, responda também a próxima questão)

sim não

12. Como você costuma consumir kefir? (Obs: você pode marcar mais de uma opção)

Natural Adicionado Adicionado de Adicionado de Adicionado de Outros:
de açúcar frutas mel cereais

13. Qual a sua disponibilidade de horário para participar?

segunda-feira	terça-feira	quarta-feira	quinta-feira	sexta-feira

APÊNDICE D - FICHA DE AVALIAÇÃO UTILIZADA NA ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA (ADQ) DO KEFIR

Análise Descritiva Quantitativa – Kefir

Sessão:

Prorador:

Amostra:

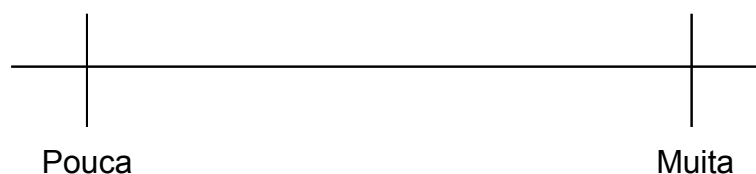
Nome:

Data:

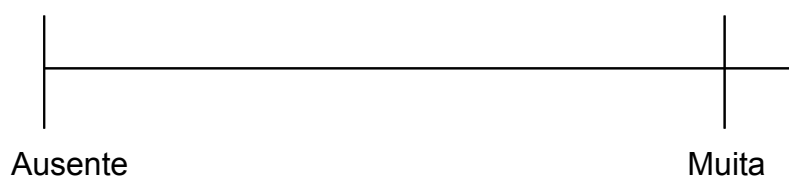
Você está recebendo uma amostra de kefir. Por favor, observe a amostra, cheire-a e coloque-a na boca, avaliando cada atributo de aparência, odor, sabor e textura nesta sequência. Em seguida, marque na escala correspondente a intensidade percebida para cada atributo avaliado.

APARÊNCIA

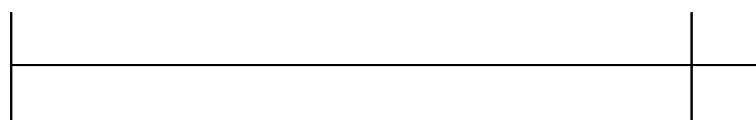
Fluidez



Granulosidade



Presença de espuma

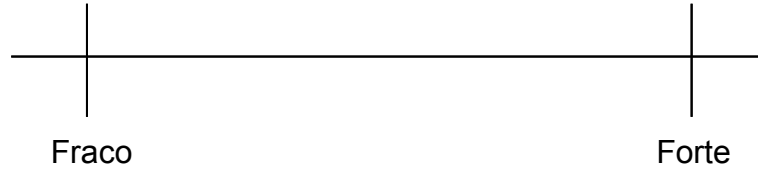


Ausente

Muita

ODOR

Odor característico de leite fermentado

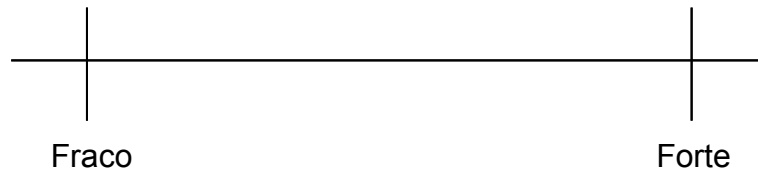


SABOR

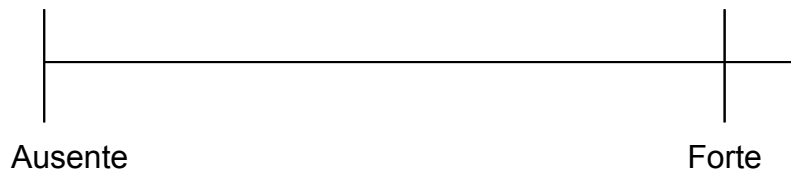
Gosto ácido



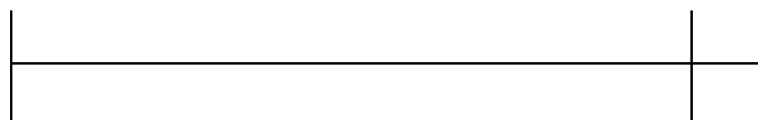
Sabor característico de leite fermentado



Sabor alcoólico



Off-flavor



Ausente

Forte

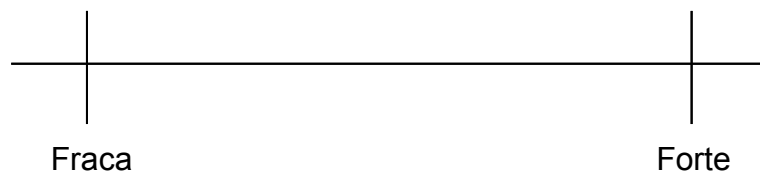
TEXTURA

Cremosidade



SENSAÇÕES TÁTEIS ORAIS

Efervescência



Comentários: _____

APÊNDICE E - ATRIBUTOS, DEFINIÇÕES E AMOSTRAS REFERÊNCIAS UTILIZADAS NA ADQ MODIFICADA DAS AMOSTRAS DE KEFIR

Atributos	Definições	Amostras referências
APARÊNCIA		
1. Fluidez	Resistência que um líquido oferece ao escoamento.	Pouca – coalhada integral. Muita – leite UHT desnatado.
2. Granulosidade	Presença de grânulos ou pequena partículas ou grãos.	Ausente – leite UHT integral. Muita - leite UHT integral adicionado de 1,5% de ácido láctico.
3. Presença de espuma	Formação de pequenas bolhas de ar na superfície de um líquido quando este é agitado ou movimentado.	Ausente – leite UHT integral. Muita – leite UHT integral batido com mixer durante dois minutos.
ODOR		
4. Odor característico de leite fermentado	Sensação olfatória característica resultante da fermentação do leite por micro-organismos específicos.	Fraco – leite diluído em água destilada (1:10). Forte – iogurte natural integral.
SABOR		
5. Gosto ácido	Gosto estimulado pela presença de ácidos orgânicos formados durante a fermentação do leite por micro-organismos específicos.	Fraco – leite UHT integral adicionado de 0,5% de ácido láctico. Forte – leite UHT integral adicionado de 1,5% de ácido láctico.
6. Sabor característico de leite fermentado	Sabor característico proveniente da fermentação láctica do leite por micro-organismos específicos.	Fraco – iogurte natural integral adicionado 0,4% de essência de baunilha. Forte – leite acidófilo.
7. Sabor alcoólico	Sabor resultante da presença de etanol proveniente da fermentação alcoólica.	Ausente – leite UHT integral. Forte – leite UHT integral adicionado de 2,0% de etanol.
8. Off-flavor	Sabor estranho ou atípico associado à deterioração.	Ausente – leite UHT integral. Forte – kefir cultura iniciadora “passado”.
TEXTURA		
9. Cremosidade	Percepção de textura macia ou aveludada na cavidade bucal (não gordurosa).	Ausente – leite UHT desnatado. Muita – requeijão de copo.
SENSAÇÃO TATÉIS BUCAIS		
10. Efervescência	Sensação de formigamento na língua resultante do desprendimento de bolhas de gás carbônico.	Fraca – leite UHT integral adicionado de água mineral gasosa (1:1). Forte – kefir tradicional entre 0 e 2 dias de armazenamento.

APÊNDICE F - COMENTÁRIOS REALIZADOS PELOS PROVADORES DURANTE A ANÁLISE SENSORIAL DAS AMOSTRAS DE KEFIR EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO.

Kefir tradicional	Comentários dos provadores
14 dias	<p>O <i>off-flavor</i> está mascarando o sabor ácido e sabor característico de LF. Amostra muito ruim. Sabor muito desagradável. Excesso de granulosidade dificulta a percepção, sensação de algo talhado.</p>
21 dias	<p>O <i>off-flavor</i> está mascarando os outros atributos. O <i>off-flavor</i> está muito forte, intenso. Não consumiria este produto. Amostra com sabor muito desagradável. <i>Off-flavor</i> acentuado. Amostra chegou ao fim da sua vida-de-prateleira. Amostra muito ruim. O excesso de granulosidade incomoda.</p>
28 dias	<p>O <i>off-flavor</i> está mascarando o odor e sabor característico de LF. Presença de forte sabor amargo. O <i>off-flavor</i> está muito forte, dificultando a avaliação dos demais atributos. Aparência está boa, mas o sabor está muito desagradável. Excesso de grânulos.</p>
Kefir Simultâneo	Comentários dos provadores
14 dias	<p>O <i>off-flavor</i> está mascarando o sabor característico de LF.</p>
21 dias	<p>O <i>off-flavor</i> está mascarando os outros atributos de sabor. Amostra menos desagradável que a outra. Amostra com sabor muito desagradável. Amostra muito ruim, deixa um sabor amargo residual. Amostra insuportável. Sabor ácido e <i>off-flavor</i> muito intensos.</p>
28 dias	<p>O <i>off-flavor</i> está mascarando o sabor característico de LF. Presença de sabor amargo. Amostra com sabor muito desagradável. Aparência melhor que da outra amostra, mas o sabor está mais desagradável.</p>