



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

**Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e
atividade anti-*Escherichia coli*.**

Simone Weschenfelder

Porto Alegre, Brasil

Fevereiro 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
(PPGCTA)

Simone Weschenfelder
(Química Industrial de Alimentos/UNIJUÍ-UERGS)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientadora: Dra. Heloisa Helena Chaves
Carvalho

Porto Alegre
Fevereiro de 2009

Simone Weschenfelder
(Bacharel em Química Industrial de Alimentos/UNIJUÍ-UERGS)

DISSERTAÇÃO

Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-*Escherichia coli*.

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:...../...../.....
Pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. José Maria Wiest
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Dra. Heloisa Helena Chaves Carvalho
Co-orientadora – ICTA/UFRGS

Homologada em:/...../.....
Por:

Profa. Dra. Isa Beatris Noll
PPGCTA/UFRGS

José Maria Wiest
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

Profa. Dra. Angela Maria Fiorentini
DBQ/UNIJUÍ

Prof. Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Faculdade de Veterinária/UFRGS

ADRIANO BRANDELI
Diretor do Instituto de Ciência e
Tecnologia de Alimentos. ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus;

Ao orientador e amigo professor Dr. José Maria Wiest.

A co-orientadora professora Dra. Heloisa Helena Chaves Carvalho.

As bolsistas e mestrandas do grupo de pesquisa.

Aos professores e funcionários do PPGCTA.

A minha família.

Aos meus amigos.

Dedico este trabalho a minha família e em especial a minha mãe, Ida Maria, que sempre esteve do meu lado.

WESCHENFELDER, S. **Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-*Escherichia coli***. 72 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, (2009).

RESUMO

Kefir é um alimento fermentado resultante da dupla fermentação do leite pelos grãos de kefir, sendo estes grãos uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas. Do kefir pode-se obter o kefir leban e o soro de kefir, ambos resultantes da filtração do kefir em tecido de algodão esterilizado, por 24 horas, a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Este estudo tem por objetivos caracterizar e avaliar o comportamento de diferentes amostras de grãos de kefir tradicional e de derivados (kefir, kefir leban e soro de kefir) quanto às características físico-químicas, sensoriais, intenção de compra e atividade anti-*Escherichia coli*, quando inoculados em diferentes concentrações, padronizando-se o tipo de leite, o tempo e a temperatura de incubação, a maturação e a filtração. Foram desenvolvidas análises físico-químicas, a avaliação sensorial através do teste de aceitabilidade e preferência e a determinação de atividade anti-*Escherichia coli*. Os resultados demonstraram que a técnica de manipulação e padronização das amostras foi eficaz na obtenção de produtos com características idênticas, visto a reprodutibilidade dos resultados. Também indicam que o volume de leite utilizado na incubação influencia significativamente nas características do produto final. O kefir leban obtido do experimento apresentou consistência cremosa, semelhante ao queijo *quark*, aroma característico de laticínio fermentado, cor amarela esbranquiçada, sabor ácido e boa espalhabilidade. Manteve os teores de cálcio contidos no leite após o processamento, concentrou as proteínas e gorduras, além de não conter lactose. Apresentou boa aceitabilidade e 58% de intenção de compra, quando utilizado na elaboração de formulações alimentares tipo antepasto. O kefir e o soro de kefir apresentaram Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/ bactericidia máximas frente ao inóculo bacteriano *Escherichia coli* (ATCC 11229), testado em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL.

Palavras-chave: grãos de kefir, kefir, kefir leban, soro de kefir, características físico-químicas, sensoriais, atividade antibacteriana.

WESCHENFELDER, S. **Characterization of traditional kefir on physicalchemical composition, sensorial characteristic and anti-*Escherichia coli* activity.** 72 p. Master Dissertation (Master's Degree in Food Science and Technology) - Institute of Food Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul, (2009).

ABSTRACT

Kefir is a fermented food resulting from the double fermentation of milk by kefir grains, these grains are a symbiotic association of yeasts, acid-lactic and acetic-acid bacteria. From kefir can be obtained kefir leban and kefir whey, both from the filtration of kefir in sterile cotton cloth, during 24 hours at $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. This study aims to characterize and evaluate the behavior of different samples of traditional kefir grains and products derived (kefir, kefir leban and kefir whey) on the physicochemical composition, sensorial characteristic, intent to buy and anti-*Escherichia coli* activity, when inoculated in different concentrations, standardized the type of milk, the time and temperature of incubation, the maturation and filtration processes. Were developed physical and chemical analysis, the sensory evaluation using the tests of acceptability and preference and determination of anti-*Escherichia coli* activity. The results showed that the technique of handling and standardizing of the samples was effective in providing products with similar characteristics as the reproductibility of results. It is also indicate that the volume of milk used in the incubation influence significantly the characteristics of the final product. The kefir leban obtained in the experiment showed creamy consistency, similar to quark cheese, characteristic aroma of fermented dairy, whitish yellow color, acid flavor and good spread. He maintained the calcium contained in milk after processing, he concentrated protein, and don't contain any lactose. The product showed good acceptability and 58% of purchase intention, when used in the preparation of food formulations such hors d'oeuvre. The kefir and the kefir whey showed maximal intensity of bacterial inhibition activity/bacteriostasis, and intensity of bacterial inactivation activity/bactericidie in front of inoculum of *Escherichia coli* (ATCC 11229), tested at concentrations $\leq 10^8$ CFU/mL.

Keywords: kefir grains, kefir, kefir leban, whey kefir, physicochemical and sensorial characteristics, antibacterial activity.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Grãos de kefir	18
Figura 2: Localização geográfica de região de origem do kefir	19
Figura 3: Grãos de kefir	24
Figura 4: Kefir.....	25
Figura 5: Kefir leban	25
Figura 6: Soro de kefir	25

CAPÍTULO II

Figura 1: Fluxograma do processo de manipulação e padronização do kefir	42
---	----

CAPÍTULO III

Figura 1: Fluxograma do processo de manipulação e padronização do kefir	65
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1- Composição da microbiota encontrada nos grãos de kefir.....	19
Tabela 2- Composição da microbiota encontrada nos grãos de kefir	20
Tabela 3- Microrganismos com propriedades probióticas	22
Tabela 4- Composição físico-química do kefir.....	26

CAPÍTULO II

Tabela 1- Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos	44
Tabela 2- Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à <i>Escherichia coli</i> ATCC (11229) determinadas em três repetições	45
Tabela 3- Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do soro de Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à <i>Escherichia coli</i> ATCC (11229) determinadas em três repetições	46

CAPÍTULO III

Tabela 1- Formulações alimentares tipo antepasto preparadas para realização das análises de aceitabilidade e preferência, com provadores não treinados	66
Tabela 2- Peso final dos grãos de kefir após incubação e maturação em diferentes concentrações	66
Tabela 3- Valores de pH, acidez e lactose em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação	66
Tabela 4- Valores residuais de lactose no soro de kefir em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação	67
Tabela 5- Composição centesimal do kefir leban obtido das populações agrupadas das alíquotas A e B após incubação, maturação e filtração em relação à concentração de grãos/leite	67

Tabela 6- Avaliação da aceitabilidade por teste de escala hedônica de três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban67

Tabela 7- Avaliação da preferência associada a intenção de compra dos três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban67

CAPITULO IV

Tabela 1- Peso final dos grãos de kefir após incubação e maturação em diferentes concentrações69

Tabela 2- Valores de pH, acidez e lactose em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação69

Tabela 3- Valores residuais de lactose no soro de kefir em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação70

Tabela 4- Composição centesimal do kefir leban obtido das populações agrupadas das alíquotas A e B após incubação, maturação e filtração em relação à concentração de grãos/leite70

Tabela 5- Avaliação da aceitabilidade por teste de escala hedônica de três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban70

Tabela 6- Avaliação da preferência associada a intenção de compra dos três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban70

Tabela 7- Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições71

Tabela 8- Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do soro de Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições71

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - Introdução e revisão bibliográfica	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Exposição do Problema	15
1.2 Objetivo	16
1.3 Hipóteses	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Origem evolutiva dos grãos de kefir	18
2.2 Composição microbiana	19
2.3 Características probióticas	21
2.4 Aspectos legais	22
2.5 Preparo e armazenamento do kefir e derivados	23
2.6 Caracterização físico-química e sensorial dos alimentos	25
2.6.1 Caracterização físico-química	25
2.6.2 Análise sensorial	27
2.7 Microrganismos patogênicos em alimentos e atividade antibacteriana do kefir	28
2.7.1 Microrganismos Patogênicos em Alimentos	28
2.7.2 Atividade Antibacteriana do Kefir	29
3. REFERÊNCIAS	32
CAPÍTULO II - Atividade anti- <i>Escherichia coli</i> em kefir e soro de kefir tradicionais	37
1. INTRODUÇÃO	39
2. MATERIAL E MÉTODOS	41
2.1 Manipulação e padronização do kefir	41
2.2 Determinação de atividade antibacteriana	42
2.2.1 Amostras	42
2.2.2 O inóculo	43
2.2.3 O método	43
2.3 Análise estatística	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4. CONCLUSÕES	47
5. REFERÊNCIAS	48
CAPÍTULO III - Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados	52
1. INTRODUÇÃO	54
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1 Padronização do kefir	56
2.2 Análises físico-químicas e sensoriais	57
2.2.1 Rendimento	57
2.2.2 pH, acidez e lactose	57
2.2.3 Composição centesimal e análise sensorial do kefir leban	57
2.3 Análise estatística	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
3.1 Rendimento	58
3.2 pH, acidez e lactose	59

3.2.1 Kefir	59
3.2.2 Soro de kefir	60
3.3 Composição centesimal e análise sensorial do kefir leban	61
3.3.1 Composição centesimal	61
3.3.2 Análise sensorial	61
4. CONCLUSÕES	62
5. AGRADECIMENTOS	63
6. REFERÊNCIAS	63
CAPÍTULO IV - Reapresentação dos resultados e considerações finais	68
1. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
1.1 Composição físico-química	69
1.2 Análise sensorial	70
1.3 Atividade antibacteriana	71

CAPÍTULO I

Introdução e revisão bibliográfica.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm merecendo lugar de destaque nos meios científicos. Isto se deve ao grande número de produtos existentes e a uma tendência atual quanto ao consumo de produtos naturais. Dentre esses produtos destacam-se os leites fermentados, que são resultantes da fermentação microbiológica do leite (BASTOS, 1995).

Kefir é um leite fermentado resultante da dupla fermentação do leite pelos grãos de kefir, de fácil preparo apresenta consistência semelhante ao iogurte, sendo ligeiramente efervescente e espumoso. Os grãos de kefir são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran. O kefir é um alimento rico em ácido lático, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares. O ácido lático formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro, combinando-se este com os nutrientes, cálcio e ferro, facilitando a absorção dos mesmos. O produto possui ainda, alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (SOUZA *et al.*, 1984; HERTZLER *et al.*, 2003).

A composição microbiológica e química indica que o kefir é um produto com características probióticas, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Sua capacidade de imunomodulação, resultante da ingestão oral já foi relatada em alguns estudos (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005).

Outro benefício atribuído ao kefir é a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE *et al.*, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-láticas dos grãos de kefir produzem bacteriocinas e o próprio kefiran, que são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES *et al.*, 2005).

A partir do kefir pode-se obter o kefir leban e o soro de kefir. O kefir leban é a fase sólida, obtida da filtração do kefir durante 24 horas. É um produto leve e altamente digerível,

com sabor e textura semelhantes ao queijo tipo *quark*. Pode ser consumido puro ou usado em formulações substituindo o *cream cheese* ou queijo *cottage*, além do desenvolvimento de outros produtos. O soro de kefir consiste na fase líquida obtida da mesma filtração, podendo este ser aproveitado de diversas maneiras, desde o uso como matéria prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (CZAMANSKI 2003; SCHNEEDORF *et al.*, 2004).

A produção de kefir em escala comercial já existe em alguns países, no entanto, a maioria das indústrias utiliza apenas algumas amostras bacterianas isoladas dos grãos de kefir para a produção da bebida, o que faz com que muitas das propriedades naturais, encontradas na bebida oriunda da fermentação com os grãos, que apresentam uma complexa microbiota, não sejam encontradas nos produtos comerciais. Bezerra *et al.* (1999) comentam que, embora ainda não industrializado no Brasil, o kefir vem conquistando adeptos em várias regiões do país nos últimos anos. Sua preparação, apenas em nível artesanal, resulta em um produto com uma série de características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas ainda não bem definidas e se restringe a poucas famílias que, de alguma forma, conseguiram amostras de grãos de kefir e a eles adicionam leite, obtendo o produto fermentado.

Assim, considerando-se as características e atributos do kefir como produto, referidos pela literatura, realizou-se a caracterização de quatro diferentes populações de grãos de kefir tradicional existentes no Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS, oriundos de distintas manipulações domiciliares. A seguir, os derivados kefir, kefir leban e soro de kefir obtidos da padronização do tipo de leite, do tempo e da temperatura de incubação, maturação e filtração das amostras, foram descritos quanto à sua composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-*Escherichia coli*.

1.1 Exposição do Problema

O desenvolvimento do presente trabalho orientou-se pelas seguintes indagações:

- Qual o comportamento de diferentes populações de grãos de kefir quando inoculadas ao leite, tendo padronizados tempo e temperatura de incubação e maturação, quanto aos teores residuais de lactose no kefir, no kefir leban e no soro de kefir?

- A utilização de leite pasteurizado em diferentes proporções para inoculação dos grãos, associado ao binômio tempo e temperatura de incubação e de maturação, influenciam no desenvolvimento (peso) dos grãos?
- Qual a composição centesimal do kefir leban produzido com diferentes concentrações de grãos e leite?
- Qual a aceitabilidade de diferentes formulações alimentares preparadas à base de kefir leban?
- Pode o kefir leban ser considerado um produto viável, em nível de mercado, em relação as suas características físico-químicas e sensoriais?
- Qual a intensidade de atividade antibacteriana do kefir, não submetido a tratamento térmico, frente a um inóculo padronizado de interesse em alimentos, como *Escherichia coli*?
- Qual a intensidade de atividade antibacteriana do soro de kefir, não submetido a tratamento térmico, frente a um inóculo padronizado de interesse em alimentos, como *Escherichia coli*?

1.2 Objetivo

O presente estudo se propõe a caracterizar e avaliar o comportamento de diferentes populações tradicionais de grãos de kefir e de seus derivados, o kefir, o kefir leban e o soro de kefir, quanto à composição físico-química, à sensorialidade e à atividade antibacteriana, uma vez padronizados os procedimentos em relação ao tipo de leite utilizado, ao tempo/temperatura de incubação, de maturação e de filtração.

1.3 Hipóteses

- As diferentes populações, de origem domiciliar, de grãos de kefir apresentarão comportamento semelhante em relação aos teores de lactose, no kefir, no kefir leban e no soro de kefir, quando utilizadas diferentes concentrações de grãos e leite.
- O desenvolvimento dos grãos será influenciado pela concentração de leite utilizado na incubação.

- O kefir leban obtido de diferentes concentrações apresentará diferença significativa em sua composição centesimal.
- A sensorialidade das diferentes formulações alimentares elaboradas a partir do kefir leban apresentará aceitabilidade superior a 70%.
- O kefir apresentará atividade antibacteriana seletiva frente ao inóculo padronizado de *Escherichia coli*
- O soro de kefir apresentará atividade antibacteriana seletiva frente ao inóculo padronizado de *Escherichia coli*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Kefir é uma bebida láctea fermentada, ligeiramente efervescente e espumosa, originada da ação da microbiota natural presente nos grãos ou grumos de kefir (WITTHUHN *et al.*, 2004). Os grãos são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, apresentando tamanhos variados entre 0,5-3,5cm de diâmetro, com volume de 0,5-20,0 mL/grão, forma irregular, cor amarelada ou esbranquiçada (RIVIÈRE *et al.*, 1967; PINTADO *et al.*, 1996; HERTZLER *et al.*, 2003).



Figura 1. Grãos de kefir (Fonte: Laboratório Higiene de Alimentos ICTA/UFRGS)

2.1 Origem evolutiva dos grãos de kefir

O Kefir é originário das montanhas do Cáucaso, do Tibet e da Mongólia, há muitos anos atrás (Figura 2). Existem relatos da possível forma através do qual o povo do Cáucaso preparava a cultura-mãe do kefir, quando estocavam leite de cabra ou de ovelha em odres de barro, acrescentando fragmentos de estômago de carneiro ou de veado, agitando de tempos em tempos até a coagulação do produto. Após o consumo da coalhada formada, sem limpeza prévia do odre, acrescentavam novamente leite, esperavam sua coagulação, consumindo-o a seguir. Esse processo repetitivo teria por finalidade forrar, cobrir as paredes do odre com uma crosta constituída, em grande parte, por um aglomerado de microrganismos vivos, com aparência de fragmentos de couve-flor, que se adaptaram ao meio e nele se propagaram (SILVA, 1978; LIU *et al.*, 1983; KOROLEVA *et al.*, 1984; SOUZA *et al.*, 1984).



Figura 2. Localização geográfica de região de origem do kefir.

Já nesta época, segundo Tamime *et al.* (1991), os leites fermentados eram considerados eficazes no tratamento de vários males, como por exemplo, desordens do estômago, fígado e intestinos. Também eram utilizados para estimular o apetite, regularizar a temperatura do sangue e melhorar a cor da pele.

Até o presente momento não se conseguiu esclarecer a origem evolutiva dos grãos de kefir. Mesmo com o aporte de todos os componentes individualmente isolados da flora e dos próprios grãos, não foi alcançada em laboratório sua formação espontânea. Novos grãos de kefir só se originam da multiplicação e da repartição de grãos pré-existentes (HÄFLIGER *et al.*, 1991).

2.2 Composição microbiana

A composição microbiana dos grãos de kefir é variável, sofrendo influência da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato utilizado para proliferação dos grãos e das técnicas utilizadas para sua manipulação (WSZOLEK *et al.*, 2001; WITTHUHN *et al.*, 2004). Simova *et al.* (2002) isolaram microrganismos de seis amostras de grãos de kefir e a partir delas encontraram a distribuição de bactérias e leveduras conforme a Tabela 1:

Tabela 1. Composição da microbiota encontrada nos grãos de kefir.

Bactérias ácido lácticas	Leveduras
Streptococci	<i>K. marxianus</i> var. <i>lactis</i>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. thermophilus</i>	<i>C. inconspicua</i>
Lactobacilli	<i>C. maris</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
<i>L. helveticus</i>	
<i>L. casei</i> subsp. <i>pseudopantarum</i>	
<i>L. brevis</i>	

Fonte: Adaptada de Simova *et al.* (2002)

Os microrganismos que podem ser encontrados nos grãos de kefir estão listados na Tabela 2:

Tabela 2. Composição da microbiota encontrada nos grãos de kefir

Constituintes da flora bacteriana

Bactérias	Leveduras
<i>Lactobacilli</i>	<i>Klyveromyces species</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Klyveromyces marxianus</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Klyveromyces lactis</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Saccharomyces species</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Saccharomyces cerevesiae</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Saccharomyces delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Torulaspota species</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Torulaspota delbrus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Candida species</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Candida valida 6</i>
<i>Lactococci</i>	<i>Candida kefyri</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	<i>Other yeasts</i>
<i>Streptococci</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
<i>Enterococci</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Bretannomyces anomalus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Leuconostocs</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris</i>	
<i>Acetic acid bacteria</i>	
<i>Acetobacter aceti</i>	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Other bacteria</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Micrococcus sp.</i>	

Fonte: Adaptada de Sarkar (2008)

A dupla fermentação do leite por bactérias e leveduras resulta na produção de pequenas quantidades de dióxido de carbono, álcool e moléculas aromáticas que conferem à bebida características sensoriais singulares (HERTZLER *et al.*, 2003).

O desenvolvimento e uso de kefir em escala comercial, já existe, no entanto, a maioria dos produtos são elaborados com cepas isoladas dos grãos de kefir, o que faz com que muitas

das propriedades naturais, que só os grãos produzem em função de sua complexa microbiota, não sejam encontradas nos produtos comerciais. Bezerra *et al.* (1999) comentam que no Brasil o kefir é praticamente desconhecido e se restringe a algumas famílias que, de alguma forma, conseguiram o “fermento” ou os “grãos de kefir” e a ele adicionam leite, obtendo um produto fermentado, de qualidade e características variáveis.

2.3 Características probióticas

Através da composição microbiológica e química, o kefir pode ser considerado um produto probiótico complexo, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Sua capacidade de imunomodulação, resultante da ingestão oral já foi relatada em alguns estudos (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005).

Os probióticos são microrganismos vivos e, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SANDERS, 2003). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra patógenos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ *et al.*, 2002). Na Tabela 3 encontram-se alguns microrganismos com propriedades probióticas.

Tabela 3. Microrganismos com propriedades probióticas

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Outras bactérias ácido lácticas	Bactérias não ácido lácticas
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i> var. <i>toyoi</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> cepa nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. gallinarum</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Sporolactobacillus inulinus</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. johnssonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

Fonte: Adaptado de HOLZAPFEL *et al.* (2001).

É comum na atualidade o uso de bactérias probióticas em produtos lácteos devido aos efeitos benéficos proporcionados como: redução dos efeitos da intolerância a lactose, possível diminuição do colesterol sérico, atividade anticarcinogênica e, mais recentemente, pesquisadores têm proposto sua utilização no tratamento auxiliar da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) pela inativação do vírus HIV (O'SULLIVAN *et al.*, 1992; KIM, 1998).

Na indústria de alimentos devem ser utilizadas culturas probióticas com boas propriedades tecnológicas, que apresentem boa multiplicação no leite, promovam propriedades sensoriais adequadas no produto e sejam estáveis e viáveis durante armazenamento. Desta forma, podem ser manipuladas e incorporadas em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e a funcionalidade, resultando em produtos com textura e aroma adequados (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Além disso, com relação às perspectivas de processamento de alimentos, é desejável que essas cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo a condições de processamento como a liofilização ou secagem por *spray drying* (STANTON *et al.*, 2003).

2.4 Aspectos legais

Tanto o kefir tradicional, produzido e manipulado em domicílio, como o kefir industrializado constituem, à luz da literatura, um problema para a padronização, bem como

para a legislação alimentar. Considerando as expectativas do consumidor e a crescente comercialização e consumo do produto na Europa Ocidental, nos últimos 100 anos de convivência com o kefir, a legislação e a jurisprudência ainda não se definiram quanto sua regularização e padronização (WEIS *et al.*, 1986).

Na Alemanha o kefir industrial não possui características estáveis, existindo diferenças explícitas entre os produtos obtidos de diferentes empresas produtoras e mesmo entre lotes oriundos de uma mesma empresa. É extremamente difícil estabelecer critérios de qualidade para o kefir em função de sua heterogeneidade (SCHAUFF *et al.*, 1985)

No Brasil, embora ainda não industrializado, encontra-se referência ao kefir na legislação de leites fermentados. A resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos define kefir como o produto cuja fermentação se realiza com cultivos acidolácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (BRASIL, 2000).

2.5 Preparo e armazenamento do kefir e derivados

Na região do Cáucaso os primeiros cultivadores de kefir o preparavam com leite de cabra ou ovelha, integral e não submetido a tratamento térmico. Em países europeus já é possível encontrar a bebida na forma industrializada (GARROTE *et al.*, 2000; HERTZLER *et al.*, 2003). O tipo de leite utilizado (pasteurizado, esterilizado, desnatado, semi-desnatado, integral) fica a escolha do consumidor (WSZOLEK *et al.*, 2001).

Os grãos são adicionados ao leite em recipiente de vidro, esterilizado, onde fermenta, à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) por aproximadamente 24 horas. Após a fermentação os grãos são coados e o líquido resultante é o kefir que pode ser consumido fresco ou maturado. A maturação consiste em uma fermentação secundária por 24 horas ou mais a temperatura de 10°C , promovendo o crescimento das leveduras e conferindo sabor e aroma específicos a bebida. Os grãos poderão ser adicionados novamente a mais leite e o processo repetido infinitamente (BESHKOVA *et al.*, 2002).

Existem, segundo a literatura, diversas relações entre o peso dos grãos e o volume de leite ideal para produção do kefir. De acordo com Simova *et al.* (2002) a razão entre o peso dos grãos e o volume de leite ideal seria de 1:10, ou seja, 100 gramas de kefir para 1,0L de leite inoculados a temperatura ambiente por 24 horas.

Durante a fermentação do leite os grãos crescem, propagam-se e passam suas propriedades às gerações seguintes de novos grãos (SIMOVA *et al.*, 2002). É também nesse momento que os microrganismos são dispersos no leite. De acordo com Toba *et al.* (1989) os grãos perdem a capacidade de se multiplicar após 3 ou 4 dias de transferência de um leite para outro, no entanto eles continuam a fermentar o leite e a produzir kefir.

A partir do kefir pode-se obter o leban e o soro de kefir. O leban é a fase sólida, obtida da filtração do kefir. É um produto leve e altamente digerível, com sabor e textura semelhantes ao queijo quark, pode ser consumido puro ou usado em formulações substituindo o cream chesse ou queijo cottage, além do desenvolvimento de outros produtos. O soro de kefir consiste na fase líquida obtida da mesma filtração, este pode ser aproveitado de diversas maneiras, desde o uso como matéria prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (CZAMANSKI 2003; SCHNEEDORF *et al.*, 2004).

As figuras abaixo ilustram o kefir e seus derivados:



Figura 3. Grãos de kefir (Fonte: Laboratório Higiene de Alimentos ICTA/UFRGS)



Figura 4. Kefir (Fonte: Laboratório Higiene de Alimentos ICTA/UFRGS)



Figura 5. Kefir leban (Fonte: Laboratório Higiene de Alimentos ICTA/UFRGS)



Figura 6. Soro de kefir (Fonte: Laboratório Higiene de Alimentos ICTA/UFRGS)

2.6 Caracterização físico-química e sensorial dos alimentos

2.6.1 Caracterização físico-química

Trabalhos analíticos sobre os nutrientes em alimentos brasileiros foram bastante desenvolvidos entre as décadas de quarenta e cinquenta e início da década de sessenta. Porém,

após este período, esse tipo de pesquisa perdeu interesse no campo de investigação, cedendo lugar para as pesquisas na área da toxicologia. O resultado foi que nos últimos anos pouco se fez no Brasil para conhecer melhor nossos alimentos do ponto de vista nutricional. Recentemente, em virtude de novos conceitos científicos surgidos em nutrição e ciências dos alimentos, e do reconhecimento da importância do assunto, o interesse começou a renovar-se (LAJOLO, 1995).

Assim, a obtenção de dados referentes à composição de alimentos brasileiros tem sido estimulada com o objetivo de reunir informações atualizadas, confiáveis e adequadas à realidade nacional. Dados sobre composição de alimentos são importantes para inúmeras atividades: avaliar o suprimento e o consumo alimentar de um país, verificar a adequação nutricional da dieta de indivíduos e de populações, avaliar o estado nutricional, para desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, em planejamento agropecuário, na indústria de alimentos, além de outras (HOLDEN, 1997).

Segundo Garrote *et al.* (1996) a composição química dos grãos de kefir é de 89-90% de água, 0,2% de lipídeos, 3% de proteína, 6% de carboidrato e 0,7% de cinzas. Souza *et al.* (1984) ao avaliar a composição físico-química do kefir, nas condições de seu experimento, encontrou os resultados expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Composição físico-química do kefir

Componentes	Valores aproximados
Água	87%
Acidez em graus Dornic (°D)	80 (final do processo)
Proteínas totais	3,4 – 4,2%
Sacarose	4,4 (mínimo)
Gordura	0,5 – 3,0%
Matérias albuminóides	3,1%
pH	4,2 – 4,5
Acidez volátil	3,9mL de NaOH n/10 x 100mL
Caseína	2,8%
Albumina	0,2%
Lactose	2,6 – 3,75%
Ácido láctico	0,7%
Álcool (etanol)	0,23 – 1,0%
Gás carbônico	20 – 25% (v/v)
Minaerais	0,74 – 0,8%
Diacetil	0,49mg/L
Acetaldeído	1,30mg/L

Fonte: Souza *et al.* (1984)

Existem poucos trabalhos em relação às características físico-químicas do kefir, do kefir leban e soro de kefir, elas estão diretamente relacionadas às técnicas de manipulação dos grãos, ao tipo de leite empregado e ao tempo e temperatura de incubação e maturação. A caracterização físico-química do kefir e dos derivados associada à análise sensorial, surge como suporte para elaboração de novos produtos a base destes ingredientes, bem como para o lançamento dos mesmos no mercado.

2.6.2 Análise sensorial

Segundo Maciel (2004), muito mais que um ato biológico, a alimentação humana é um ato social e cultural. Mais que um elemento da chamada cultura material, a alimentação implica em representações e imaginários, envolve escolhas, classificações e símbolos que organizam as diversas visões de mundo no tempo e no espaço. O alimentar-se então, é mutável como a cultura, sofrendo interações e integrações.

A análise sensorial é um método científico utilizado pela indústria e por instituições de pesquisa, para evocar, medir, analisar e interpretar as características dos alimentos que possam ser percebidos pelos sentidos do paladar, visão, olfato, tato e audição, utilizando conhecimentos de ciência de alimentos, fisiologia, antropologia, psicologia e estatística (SIMPSON *et al.*, 1998).

Dento da análise sensorial encontramos os testes afetivos, que podem ser classificados em duas categorias: aceitabilidade e preferência. O primeiro tem o objetivo de avaliar o grau com que consumidores gostam ou desgostam de um determinado produto e o segundo objetiva avaliar a preferência do consumidor quando ele compra dois ou mais produtos, comparando-os entre si. Estes testes afetivos, então, são usados para avaliar a preferência e/ou aceitação de produtos ou formulações alimentares. Geralmente um grande número de julgadores é requerido para essas avaliações. Os julgadores não são treinados, mas são selecionados para representar uma população alvo. Os testes afetivos são uma ferramenta importante, de forma que acessam diretamente a opinião do consumidor já estabelecido ou potencial de um produto, sobre características específicas ou idéias sobre o produto (MEILGAARD *et al.*, 1991). As principais aplicações dos testes afetivos são a manutenção da qualidade do produto, otimização de processos e desenvolvimento de novos produtos. A indústria de alimentos, ao lançar novos produtos no mercado, opta por aqueles com

aceitabilidade igual ou superior a 70%. A escala hedônica é usada para medir o nível de preferência de produtos por uma população e relata os estados agradáveis e desagradáveis no organismo (MACFIE *et al.*, 1994).

A análise sensorial de produtos em ascensão, como é o caso dos leites fermentados, mais especificamente do kefir é importante, pois contribuirá na padronização dos processos, bem como na definição das concentrações e elaboração de novas formulações alimentares a base deste produto.

2.7 Microrganismos patogênicos em alimentos e atividade antibacteriana do kefir

2.7.1 Microrganismos Patogênicos em Alimentos

Os microrganismos estão intimamente associados com a disponibilidade, a abundância e a qualidade do alimento para consumo humano. Alimentos são facilmente contaminados com microrganismos na natureza, durante manipulação e processamento. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento de microrganismos que se tiverem condições de crescer, podem mudar as características físicas e químicas do alimento e causar a sua deterioração. Os microrganismos no alimento podem também ser responsáveis por intoxicações e infecções transmitidas por alimentos (PELCZAR *et al.*, 1997).

Os microrganismos de maior importância em saúde pública, contaminando direta ou indiretamente os alimentos, principalmente os produtos de origem animal, envolvidos em toxinfecções alimentares são, segundo Board (1988), *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, e outros como *Vibrio parahemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolítica*.

A *Escherichia coli* encontra-se largamente difundida na natureza, tendo como habitat principal o trato intestinal de animais de sangue quente, integrando as bactérias do grupo coliforme, subdividindo-se em vários biótipos e sorotipos, alguns dos quais patogênicos em potencial para o homem, constituindo-se os alimentos e a água sua principal fonte de infecção. A bactéria é referenciada ainda hoje como indicador de contaminação fecal, mormente em alimentos, pela facilidade de sua comprovação diagnóstica e por sua representatividade (FRAZIER *et al.*, 1993). Os diferentes sorotipos (enterohemorrágico, enterotoxígeno, enteroinvasor, enteropatógeno e enteroagregativo) de *Escherichia coli* vem

merecendo crescente atenção epidemiológica, considerando os riscos para os humanos expostos à esta zoonose considerada emergente (ACHA *et al.*, 2003). Para que se desenvolva uma enfermidade enterotoxigênica e invasora, necessita-se de doses elevadas de *E. coli*, portanto uma grande multiplicação. Os alimentos devem estar contaminados massivamente ou devem estar incorretamente conservados.

2.7.2 Atividade Antibacteriana do Kefir

Gould (1995) refere que o sistema antimicrobiano ocorre naturalmente nos alimentos e cita enzimas derivadas de animais como a lisozima e a lactoperoxidase, proteínas como a lactoferrina, ovo transferrina e outros; cita derivados de microrganismos, por exemplo, bacteriocinas como a nisina e pediocina; refere-se ainda a sistemas antimicrobianos naturais derivados das plantas como por exemplo as fitoalexinas, componentes de baixo peso molecular, ervas e condimentos, derivados fenólicos como a oleuropeína, além de óleos essenciais entre outros. O autor salienta ainda que na utilização dos sistemas antimicrobianos naturais para a preservação dos alimentos existe o sinergismo de vários elementos, dentre eles os componentes de origem animal, os de origem microbiana, bem como os de origem vegetal e os processos físicos de empacotamento e armazenagem de alimentos.

Dentre os benefícios atribuídos ao kefir está a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE *et al.*, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-láticas dos grãos de kefir produzem bacteriocinas e o próprio kefiran, que são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Garrote *et al.* (2000) tem demonstrado que em várias fontes de pesquisa, metabólitos produzidos por bactérias ácido-láticas inibem o crescimento de bactérias patogênicas e saprófitas. Esta atividade antagônica pode envolver diferentes mecanismos, semelhantes às competições por nutrientes livres e produção de metabólitos, inibidores (peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil e bacteriocinas). Em muitos casos, a combinação destes fatores pode ser responsável pela inibição.

Alm (1983) através de estudos “*in vitro*” demonstrou atividade antimicrobiana em diversos produtos originados de leite fermentado. Especificamente o kefir demonstrou capacidade de inibição frente à *Salmonella typhimurium*, após uma hora de exposição.

Ota (1999) sugere que o uso do kefir auxilia na prevenção da contaminação por *E. coli* O-157 enterohemorrágica, pois ele é capaz de aumentar o número de bactérias ácido lácticas e bífidas, nativas do trato gastrointestinal.

Shama (1998), através de estudos “*in vitro*”, descreveu algumas características higiênico-sanitárias de seis amostras de kefir tradicional, como a pesquisa de coliformes totais e fecais, de enterococos, de mesófilos aeróbios, a acidez expressa em graus Dornic e o pH. Todas as amostras apresentaram, no início do experimento, coliformes totais expressos em números mais prováveis. Estes índices, porém, reduziram-se à zero, ao estender-se a fermentação das alíquotas de cada amostra nos diferentes experimentos, por um período de dez dias. Nenhuma das amostras utilizadas apresentou coliformes fecais e enterococos no momento da integração ou do encerramento do experimento, dez meses mais tarde. Posteriormente, as seis amostras de kefir foram contaminadas com *E. coli* (NCDC nº 25922). Às vinte e quatro horas do processamento tradicional adotado, atingiu-se, em todas as amostras, 10^6 UFC/mL. Após dez dias houve redução para 10^4 UFC/mL em cinco das amostras, e para 10^5 UFC/mL na amostra restante, havendo evidências de descontaminação.

Ao estudar a atividade antibacteriana e antifúngica de cepas isoladas de grãos de kefir frente à *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* e *Candida* spp. Cevikbas *et al.* (1994) encontraram cepas que produziam uma bacteriocina com amplo espectro de inibição, com maior atividade frente as bactérias gram-positivas. Santos *et al.* (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana de 58 cepas isoladas do kefir frente a bactérias enteropatogênicas, observando atividade da maioria das cepas frente aos agentes testados.

Czamanski (2003) determinou as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs) do filtrado de kefir tradicional frente a duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) e duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC 11076). Os resultados demonstram um maior efeito bacteriostático frente a bactérias Gram-negativas e um melhor efeito bactericida frente a bactérias Gram-positivas.

Rodrigues *et al.* (2005) e Kwon *et al.* (2003), em estudos sobre a ação inibitória dos microrganismos presentes nos grãos de kefir, observaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

Ulusoy *et al.* (2007) ao testar a atividade antibacteriana do kefir frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) verificou atividade frente a todos os agentes testados.

3. REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N. ; SZYFRES, B. **Zoonosis and communicable diseases common to men and animals: bacteriosis and mycosis**. 3 ed. Washington: World Health Organization. Cientifical and Technical Publication n. 580. 2003, 398p.
- ALM, Livia. Survival rate of Salmonella and Shigella in fermented milk products with and without added human gastric juice in vitro study. **Program Food Nutrition Science**, Philadelphia, Pergamon Press Ltd. Vol 7. p 19-28. 1983.
- BASTOS, M. do S.R. **Informações de sistema de qualidade NB 9.000 em laticínios em produção de iogurte e leite longa vida (UHT)**. Viçosa : UFV, (Universidade Federal de Viçosa) 1995. 243p. (Tese - mestrado em ciência e tecnologia de alimentos).
- BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; SIMOV, Z. I.; FRENGOVA, G. I.; SPASOV, Z. N. Pure cultures for making kefir. **Food Microbiology**, v. 19, 537-544, 2002.
- BEZERRA, A.B.; BOARI, C.D.; OLIVEIRA, M.N.; ZANCANARO, JR.O. Kefir x iogurte: uma comparação sensorial. **Indústria de laticínios**, São Paulo, 1999.
- BOARD, R.G. **Introducción a la Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. 272p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Oficializa **Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta> Acesso em: 20 jun. 2007.
- CEVIKBAS, A.; YEMMI, E.; EZZEDENN, F. W.; YARDIMICI, T. Antitumoral, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytother Res**. 1994; 8: 78-82.
- CZAMANSKI, R. T. **Avaliação da atividade antibacteriana de filtrados de quefir artesanal**. 2003. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. **Food Sci.Technol. Bull.**, v.2, n.1, p.1-17, 2005.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf>. Acesso em: 03 fev. 2007.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF,D.C.. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993.681p.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63. n. 3, 2000.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. **Preservation of Kefir Grains, a Comparative Study** 1996.

GOULD, G.W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for foods applications. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 58, n.1, p. 82-86, 1995.

HÄFLIGER, M.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Kefir-ein faszinierendes Sauermilchprodukt. **Deutsche Molkerei-Zeitung-Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft, Kempten**. Vol. 13 p370-375. 1991.

HERTZLER, S. R., CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal os American Dietetic Association**,. v. 153, n. 5, p. 582-587, 2003.

HOLDEN, J.M. **Assement of The quality of data in nutritional databases**. Bol. SBCTA, v. 31, n. 2, p. 105-108, 1997

HOLZAPFEL, W. H. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, n.2, p.365S-373S,2001.

KIM, H.S. Characterization of Lactobacilli and Bifidobacteria as Applied to Dietary Adjuncts. **Cultured Dairy Products Journal** 23(3): 6-2p, 1998.

KOROLEVA, N.S.; BAVINA, N.A. Effects of conditions of kefir fungus cultivation on the microflora and biochemical characteristics of kefir starters. Proc. 18th. **Inst. Dairy Congress**. 1E: 413,1970. In Souza et al, 1984.

KWON, H.; KIM, Y.K.L. **Korean fermented foods: kimchi and doenjang**. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.287-304.

LAJOLO, F.M. Grupo de trabalho: Composição de Alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 29, n. 1, p. 57-69, 1995

LIU, J.A.P.; MOON, N.J. Kefir – a “new” fermented Milk product. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington. Vol83. Nº3. P11-12. 1983.

MACFIE, H. J.; THOMSON, D. M. H. **Measurement of food preferences**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1994. 310 p.

MACIEL; Maria Eunice. **Uma cozinha a brasileira**. In: Estudos Históricas, Rio de Janeiro, n. 33, p. 25-39, jan-jun. 2004.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 2.ed. Flórida: CRC Press, 1991. 354 p.

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, São Paulo, v.38, n.1, p.1-21, 2002.

O'SULLIVAN, M.G.; THORNTON, G.; O'SULLIVAN, G.C.; COLLINS, J.K.. Probiotic bacteria: myth or reality? **Trends in Food Science and Technology** 3:309-314p, 1992.

OTA, A. Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic E. coli O-157. **Medical Hypotheses**, Japão, v. 53, n. 1, p. 87-88, jan. 1999.

PELCZAR JR, M.J; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1997. v.2. cap.30, p.372-397: Microbiologia de Alimentos.

PINTADO, M. E., SILVA, J. A. L., FERNANDES, P. B., MALCATA, F. X., HOGG, T. A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALEDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

RIVIÈRE, J. W. M., KOOIMAN, P. Kefiran, a Novel Polissaccharide Produced in Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 59, p. 269-278, abril 1967.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, Vol. 13, No. 5-6, pp. 485-492 2005

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SANTOS, A.; MAURO, S. M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. System. **Appl. Microbiol.** 26, 434-437 2003.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal** Vol. 110 No. 3, 2008 p. 283-295

SCHAUFF, M.; WERNER, G. Milchwirtschaftliche Rechtspraxis, Urteil: Anforderungen an Kefir. **Deutsche Milchwirtschaft**, Hildesheim. Vol 47. p. 67-76, 1985.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. **Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação**, in: *Fitoterápicos anti-inflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*, Carvalho, J. C. T. (Ed.), ch. 33, pp. 443-467. Tecmedd, Ribeirão Preto 2004.

SHAMA, S. de F.M.S. **Características higiênico sanitárias e contaminação fecal-experimental de amostras de kefir tradicional**. 1998. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SILVA, T.J.P. Processamento de Produtos Lácteos Fermentados. **Revista do Instituto de Laticínios Candido Tostes**, Juiz de Fora. Jul-ago. p18-21. 1978.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T. S.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal os Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1-6, 2002.

SIMPSON, S. J.; PIGGOTT, J. R.; WILLIAMS, S. A. R. Sensorial Analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 1, p. 7-18, 1998.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J.L. **Kefir e sua tecnologia - aspectos gerais**. Boletim ITAL, Campinas. Vol 21. Nº 2. P 137-155. Abril/junho 1984.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. **Challenges facing development of probiotic-containing functional foods**. In: FARNWORTH, E.R., ed. *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.27-58.

TAMIME, A. Y. ROBINSON, R. K. **Yogur; ciencia y tecnologia**. Traducido por Maria de la Concepción Díaz de Villegas Soláns e Alvaro Rodríguez Sánchez Arévalo. Zaragoza: Acribia, 1991, 368p.

TOBA, T. ARIHARA, K., ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal os Food Microbiology**, v. 10, p. 219-224, out. 1989.

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 Mikrobiyol Cem Derg** 2007

VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **J. Dairy Res.**, v.72, p.195-202, 2005.

WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T., CILLIERS, A., BRITZ, T. J. Impacto of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, África do Sul, v. 22, p. 337-344, set. 2004.

WEIS, W.; BURGBACHER, G. **100 Jahre Kefir in Deutschland**. Nach wie vor ein aktuelles Thema. Deutsche Milchwirtschaft, Hildesheim. Vol. 4 p 81-90. 1986.

WSZOLEK, M., TAMIME, A. Y., MUIR, D. D., BARCLAY, M. N. 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, fev. 2001.

CAPÍTULO II

Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais.

Artigo submetido à Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”

Dairy Journal Bimonthly Published By The “Cândido Tostes” Dairy Institute

Instituto de Laticínios Cândido Tostes

Rua Tenente Luiz de Freitas, 116 - Santa Terezinha

36045-560 - Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil

Enviado em 22 de dezembro de 2008.

Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais¹**Anti-*Escherichia coli* activity in traditional kefir and kefir whey¹**Simone WESCHENFELDER²José Maria WIEST³Heloisa Helena Chaves CARVALHO⁴**SUMÁRIO**

Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se, *in vitro*, a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de kefir e soro de kefir tradicionais, não submetidos a tratamento térmico, padronizados em relação ao tipo de leite e ao binômio tempo/temperatura de incubação e maturação, frente a inóculo padronizado de *Escherichia coli* (ATCC 11229) microrganismo indicador de interesse em alimentos. Kefir é um leite fermentado produzido pela adição de grãos de kefir ao leite, constituindo uma associação simbiótica entre bactérias ácido lácticas, bactérias ácido acéticas e leveduras envoltas por uma matriz de polissacarídeos, o kefiran, enquanto o soro é o produto obtido da filtração do kefir. Tanto o kefir, quanto o soro de kefir apresentaram capacidade de inibição e inativação máximas sobre o inóculo bacteriano em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL.

Palavras-chave: kefir tradicional; atividade antibacteriana do kefir; inibição bacteriana; inativação bacteriana.

¹ Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: simone.weschenfelder@yahoo.com.br

* Autor para correspondência. Local de realização do trabalho: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS) Porto Alegre – RS/Brasil

² Professor Doutor orientador do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: jmwiest@ufrgs.br

³ Doutora Nutricionista do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: hhcarvalho@terra.com.br

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm merecendo lugar de destaque nos meios científicos, isso se deve ao grande número de produtos existentes e uma tendência atual ao consumo de produtos naturais. Dentre esses produtos destacam-se os leites fermentados, que são resultantes da fermentação microbiológica do leite (BASTOS, 1995).

Kefir é um leite fermentado, ligeiramente efervescente e espumoso, de fácil preparo e economicamente acessível, originado da ação da microbiota natural presente nos grãos ou grumos de kefir (WITTHUHN *et al.*, 2004; MARCHIORI, 2007). Estes são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, apresentando tamanhos variados entre 0,5-3,5cm de diâmetro, com volume de 0,5-20,0mL/grão, forma irregular, cor amarelada ou esbranquiçada (PINTADO *et al.*, 1996; HERTZLER *et al.*, 2003).

A composição microbiana dos grãos de kefir é variável, sofrendo influencia da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato utilizado para proliferação dos grãos e das técnicas utilizadas para sua manipulação (WITTHUHN *et al.*, 2004; WSZOLEK *et al.*, 2001).

Durante a fermentação no leite, os grãos multiplicam-se e aumentam de volume passando suas propriedades às gerações seguintes de novos grãos e dispersando os microrganismos no leite (SIMOVA *et al.*, 2002). De acordo com Toba *et al.* (1989) os grãos perdem a capacidade de se multiplicar após o terceiro ou quarto dia de fermentação do leite.

A partir do kefir pode-se obter o kefir leban e o soro de kefir. O kefir leban é a fase sólida, obtida da filtração do kefir por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. É um produto leve e altamente digerível, com sabor e textura semelhantes ao queijo quark. Pode ser consumido puro ou usado em formulações substituindo o *cream chesse* ou queijo *cottage*, além do desenvolvimento de outros produtos. O soro de kefir consiste na fase líquida obtida da mesma filtração, que pode ser aproveitado de diversas maneiras, desde o uso como matéria prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (CZAMANSKI 2003; SCHNEEDORF *et al.*, 2004).

A dupla fermentação no leite por bactérias e leveduras, que ocorre no kefir, resulta na produção de um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares (HERTZLER *et al.*, 2003). O ácido láctico formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro, que combina-se também com os nutrientes cálcio e ferro, facilitando a absorção desses elementos. O produto possui ainda, alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (SOUZA *et al.*, 1984).

Através da composição microbiológica e química o kefir pode ser considerado um produto probiótico complexo, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Sua capacidade de imunomodulação, resultante da ingestão oral já foi relatada em alguns estudos (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005).

Outro benefício atribuído ao kefir é a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE *et al.*, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-lácticas dos grãos de kefir produzem bacteriocinas e o próprio kefiran, que são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Board (1988) afirma que *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, e outros como *Vibrio parahemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* são os microrganismos de maior importância em saúde pública, contaminando direta ou indiretamente os alimentos, principalmente os produtos de origem animal, envolvidos em toxinfecções alimentares.

Dentre eles, destaca-se a *Escherichia coli*, que se encontra largamente difundida na natureza, tendo como habitat principal o trato intestinal de animais de sangue quente, integrando as bactérias do grupo coliforme, subdividindo-se em vários biótipos e sorotipos, alguns dos quais patogênicos em potencial para o homem, constituindo-se os alimentos e a água sua principal fonte de infecção. Esta bactéria é referenciada ainda hoje como indicador de contaminação fecal em alimentos, pela facilidade de sua comprovação diagnóstica e por sua representatividade (FRAZIER *et al.*, 1993). Os diferentes sorotipos (*enterohemorrágico*,

enterotoxígeno, enteroinvasor, enteropatógeno e enteroagregativo) de *Escherichia coli* vem merecendo crescente atenção epidemiológica, considerando os riscos para os humanos expostos à esta zoonose (ACHA *et al.*, 2003). Para que se desenvolva uma enfermidade enterotoxigênica e invasora, necessita-se de doses elevadas de *Escherichia coli*, portanto uma grande multiplicação.

Segundo Ota (1998) o uso do kefir auxilia na prevenção da contaminação por *Escherichia coli* O-157 enterohemorrágica, pois ele é capaz de aumentar o número de bactérias ácido lácticas e bífidas, nativas do trato gastrointestinal.

Ulusoy *et al.* (2007) ao testar a atividade antibacteriana do kefir frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) verificou atividade antibacteriana frente a todos os agentes testados.

Vários estudos demonstram a atividade antibacteriana do kefir frente à *Escherichia coli* e a outros agentes de interesse em alimentos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (ALM, 1983; KWON *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana do kefir e do soro de kefir tradicional, não submetidos a tratamento térmico, padronizados em relação ao tipo de leite e ao binômio tempo/temperatura de incubação e maturação, frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229) indicador de interesse em alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manipulação e padronização do kefir

Para a realização do experimento foram utilizadas populações de grãos de kefir tradicional, oriundas de manipulações familiares, existentes no Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS. A inoculação dos grãos de kefir ao leite foi realizada utilizando-se leite pasteurizado, padronizado e homogeneizado tipo C, na relação entre o peso dos grãos e o volume de leite de 1:10, de acordo com Simova *et al.* (2002).

A inoculação dos grãos ao leite foi feita em recipiente de vidro esterilizado, onde a amostra foi incubada por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em meio aeróbio. A seguir, procedeu-se à

maturação, sob refrigeração a $7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 144 horas. Após esta maturação, realizou-se uma tamisação prévia em peneira de aço inoxidável, sob assepsia, separando-se o kefir dos grãos de kefir. O kefir assim obtido foi submetido a uma filtração, em tecido de algodão esterilizado, por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para obtenção do kefir leban e do soro de kefir. Os grãos retidos na tamisação prévia foram novamente inoculados ao leite, repetindo-se as etapas acima descritas. O fluxograma abaixo (figura 1) ilustra o processo adotado durante o experimento:

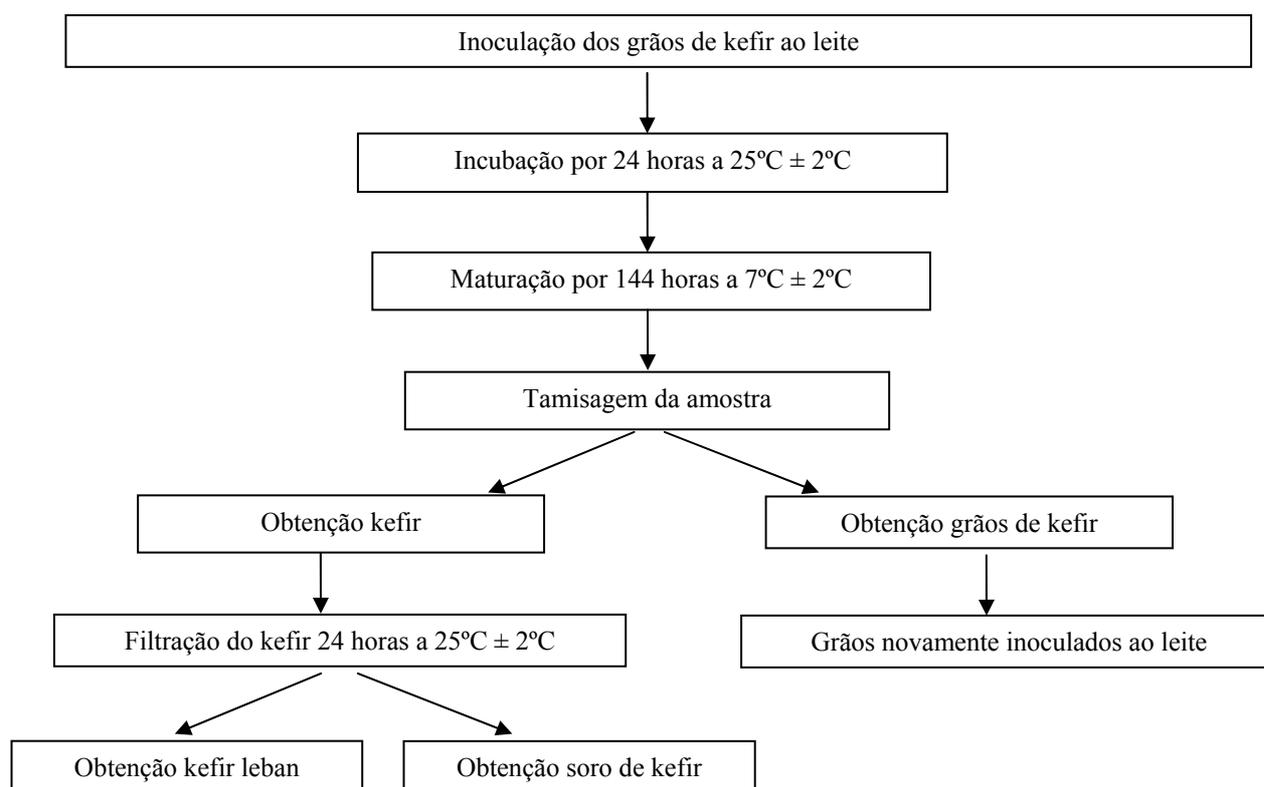


Figura 1: Fluxograma do processo de manipulação e padronização do kefir.

Fonte: Adaptado de Czamanski (2003)

O kefir e o soro de kefir foram previamente testados quanto à colimetria total e fecal através do plaqueamento direto de diferentes alíquotas em meio Ágar Chromocult® (Merck).

2.2 Determinação de atividade antibacteriana.

2.2.1 Amostras

Para a realização do experimento foram utilizadas amostras de kefir e de soro de kefir tradicional não submetidas a tratamento térmico. As avaliações foram realizadas em períodos distintos, sendo realizadas três repetições de cada experimento, ambas avaliados em triplicata.

2.2.2 O inóculo

Foi testada amostra padrão *Escherichia coli* (ATCC 11229) oriunda da coleção bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS para a avaliação da atividade antibacteriana. O inóculo foi reativado em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), à 37°C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, até atingir a concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL (AVANCINI, 2002).

Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1mL deste para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada 0,1% para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-12} . Das diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram transferidas três gotas para placas de Petri, contendo Ágar Chromocult® (MERCK), utilizando micropipetas de 15 μ L e a leitura realizada em 24 horas de incubação aeróbia à 37°C, para avaliação da concentração inicial do inóculo em estudo. O valor final considerado constituiu-se da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

2.2.3 O método

O método utilizado para determinação da atividade antibacteriana do kefir e do soro de kefir tradicional foi o teste de diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1980), com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini (2002). Foram organizadas duas baterias de tubos de ensaio, cada uma composta por doze tubos contendo caldo duplo de BHI (Brain heart infusion, OXOID) no volume de 4,5mL, sendo que uma bateria continha desinibidores bacterianos (Tween 80 a 3%; Histidina a 0,1% e Lecitina a 0,3%) e a outra não continha desinibidores. A cada tubo foi adicionado 4,5mL de kefir ou de soro de kefir, passando os mesmos para a concentração de 50%, em seguida, foram contaminados com 1mL de cada

diluição serial logarítmica (10^{-1} a 10^{-12} UFC/mL) do inóculo bacteriano padrão. Os tubos foram então agitados e incubados a 36°C.

Os resultados foram lidos como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB). Entende-se por IINIB o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana de kefir e soro de kefir em meio BHI (Brain heart infusion, OXOID), através de leitura por plaqueamentos, independentes de crescimento/turvação em meio seletivo, Ágar Chromocult® (MERCK), em intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação a 36°C. Entende-se por IINAB o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos (Tween 80 a 3%; Histidina a 0,1% e Lecitina a 0,3%) acrescidos ao BHI. Segundo Andrade *et al.* (1996) estes desinibidores tem a função de inativar as soluções antibacterianas em teste, além de fornecer substrato para as bactérias, facilitando seu crescimento.

IINIB e IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de 12 a 0, sendo que o valor de 12 (doze) representava atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, que uma amostra testada tem sobre uma dada dose infectante do microrganismo, nas diferentes condições do experimento, ou seja, com e sem desinibidores bacterianos (tabela 1).

Tabela 1. Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinárias de intensidade de atividade
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	10^{-11}	10^{-12}	n.a	UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas
10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	n.a	UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas

n.a: ausência de atividade antibacteriana;
UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mL.

2.3 Análise estatística

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) do kefir e do soro de kefir foram tratados através do programa Statistical Analysis System (SAS versão 6.4), sendo avaliados através da Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a fermentação com leite pasteurizado padronizado homogeneizado tipo C, o kefir e o soro de kefir, *in natura*, não submetidos a tratamento térmico, apresentaram resultado negativo em relação ao controle de colimetria total e fecal. A partir deste resultado, optou-se em trabalhar com o kefir e o soro de kefir em condições naturais.

Os resultados da determinação da Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e da Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia do kefir tradicional, encontrados em três repetições do experimento, realizadas em períodos distintos, sendo todos avaliados em triplicata, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições.

		<i>Escherichia coli</i> ATCC (11229)					
Amostra	Tempo (h)	1ª repetição		2ª repetição		3ª repetição	
		IINIB	IINAB	IINIB	IINAB	IINIB	IINAB
Kefir	24	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	48	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	72	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}

Resultados representam a média das triplicatas

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Os resultados da determinação da Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e da Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia do soro de kefir tradicional, encontrados em três repetições do experimento, realizadas em períodos distintos, sendo todos avaliados em triplicata, estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do soro de Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições.

		<i>Escherichia coli</i> ATCC (11229)					
		1ª repetição		2ª repetição		3ª repetição	
Amostra	Tempo (h)	IINIB	IINAB	IINIB	IINAB	IINIB	IINAB
Soro de kefir	24	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	48	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	72	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}

Resultados representam a média das triplicatas

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

As tabelas demonstram que, tanto o kefir como o soro de kefir, na concentração testada de 50%, apresentaram total inibição e inativação frente ao inóculo *Escherichia coli* ATCC (11229), em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL, em ambas as análises. Estes resultados tornam-se relevantes, considerando que, dificilmente, em preparações alimentares, seriam encontradas concentrações tão elevadas deste microrganismo. Isto sugere, a precisão do método (resistência a fatores extrínsecos) e a padronização das técnicas quanto a preditividade dos resultados positivos e negativos (CÔRTEZ, 1993), pela diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade dos resultados obtidos.

A *Escherichia coli* ATCC (11229) sofrendo inibição e inativação frente ao kefir e ao soro do kefir, teve este resultado garantido pela presença e ausência dos desinibidores bacterianos recomendados no experimento.

Os tempos de incubação dos inóculos testados, tanto frente ao kefir como ao soro de kefir, (24, 48 e 72 horas) não influenciaram na intensidade de ação do mesmo, pois, como indicam as tabelas 2 e 3, não houve diferença significativa entre os tempos de confrontação da mesma repetição entre si e em relação à presença ou ausência de desinibidores.

Este comportamento permite concluir que a técnica de manipulação e padronização adotada para o kefir no experimento foi eficaz, pois permitiu a obtenção de um produto com características antibacterianas similares e reprodutivas.

Resultados semelhantes ao presente experimento, obtidos com o kefir resultante da fermentação do leite com os grãos de kefir, foram observados por Shama (1998), que, através de estudos “*in vitro*”, trabalhou com seis amostras de kefir que foram contaminadas com *Escherichia coli* (NCDC nº 25922). Às vinte e quatro horas do processamento tradicional adotado, atingiu-se, em todas as amostras, 10^6 UFC/mL. Após dez dias houve redução para 10^4 UFC/mL em cinco das amostras, e para 10^5 UFC/mL na amostra restante, havendo

evidências de descontaminação. Czamanski (2003) determinou as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas do filtrado de kefir tradicional frente a duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) e duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC 11076). Os resultados encontrados demonstraram um maior efeito bacteriostático frente a bactérias Gram-negativas e um melhor efeito bactericida frente a bactérias Gram-positivas.

Outros autores encontraram atividade antibacteriana e antifúngica trabalhando, porém, com cepas bacterianas isoladas individualmente de grãos de kefir. Cevikbas *et al.* (1994) encontraram cepas que produziam uma bacteriocina com amplo espectro de inibição, frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* e *Candida* spp. Santos *et al.* (2003) avaliou a atividade antimicrobiana de 58 cepas isoladas do kefir frente a bactérias enteropatogênicas e observou atividade da maioria delas frente aos agentes testados. Ulusoy *et al.* (2007) ao testar a atividade antibacteriana do kefir liofilizado frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) verificou atividade antibacteriana frente a todos os agentes testados.

Os diferentes resultados encontrados nos trabalhos realizados sobre atividade antibacteriana do kefir justificam-se pelas diferentes técnicas de manipulação e padronização das amostras, bem como ao tipo de substrato utilizado para proliferação dos grãos e a origem dos mesmos. Embora utilizando diferentes técnicas e distintas populações, todos os trabalhos indicam que o kefir e seu soro apresentam atividade antibacteriana frente a agentes de interesse em alimentos.

4 CONCLUSÕES

O kefir e o soro de kefir tradicional apresentaram, espontaneamente, resultados negativos em relação à colimetria total e fecal, garantindo desta forma, a preditividade frente ao padrão ATCC desafiado.

A padronização das amostras resultou em um produto com características antibacterianas semelhantes e reprodutivas.

O tempo de exposição do inóculo frente ao kefir e ao soro de kefir não influenciou significativamente na Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e na Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia, pois nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição, os resultados foram iguais.

As diferentes repetições do experimento, realizadas em momentos distintos, apresentaram resultados reprodutivos, onde a concentração de 50% tanto do kefir quanto do soro de kefir, foram suficientes para inibir e inativar a *Escherichia coli* ATCC (11229) em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL.

Considerando as hipóteses iniciais formuladas tanto o kefir quanto o soro de kefir apresentaram Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia máximas frente ao inóculo bacteriano testado.

SUMMARY

Through Dilution Tests, in Multiple Tubes System it was determined, *in vitro*, the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/bactericidie) from traditional kefir and kefir whey, not heat-treated, patterned on the type of milk and the binomial time/temperature of incubation and maturation, as opposed to standardized inoculum of *Escherichia coli* (ATCC 11229) indicator microorganism in food interest. Kefir is a fermented milk produced by the addition of kefir grains, forming a symbiotic association between acid-lactic bacteria, acid-acetic bacteria and yeast, surrounded by a matrix of polysaccharides, the kefiran, while the whey is the product of the filtration of kefir. Both, the kefir, as the whey of kefir, had maximum capacity for inhibition and inactivation of the bacterial inoculum, in concentrations $\leq 10^8$ CFU/mL.

Keywords: traditional kefir; antibacterial activity of kefir; bacterial inhibition; bacterial inactivation.

5. REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis and communicable diseases common to men and animals: bacteriosis and mycosis.** 3 ed. Washington: World Health Organization. Cientifical and Technical Publication n. 580. 2003, 398p.

ALM, L. Survival rate of Salmonella and Shigella in fermented milk products with and without added human gastric juice in an in vitro study. **Program Food Nutrition Science**, Philadelphia, Pergamon Press Ltd. Vol 7. p 19-28. 1983.

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 186p.

AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum*- Cham e Schlecht. Hypericaceae (Guttiferae) — (“escadinha”/”sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre, 2002.

BASTOS, M. do S.R. **Informações de sistema de qualidade NB 9.000 em laticínios em produção de iogurte e leite longa vida (UHT)**. Viçosa: UFV, (Universidade Federal de Viçosa 1995. 243p. (Tese - mestrado em ciência e tecnologia de alimentos).

BOARD, R.G. **Introducción a la Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. 272p.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.

CEVIKBAS, A.; YEMMI, E.; EZZEDENN, F. W.; YARDIMICI, T. Antitumoral, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytother Res**. 1994; 8: 78-82.

CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia Conceito e princípios fundamentais**. São Paulo; Livraria Varela, 1993.

CZAMANSKI, R. T. **Avaliação da atividade antibacteriana de filtrados de quefir Artesanal**. 2003. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT/SOCIEDADE ALEMÃ DE MEDICINA VETERINÁRIA (DVG). *Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin*/Normas para a testagem de desinfetantes químicos para a medicina veterinária. Giessen, 1980. In: SCHLIESSER, Th.; Strauch, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft/Desinfecção na produção animal, em laticínios e em frigoríficos**. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.

FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. **Food Sci. Technol. Bull.**, v.2, n.1, p.1-17, 2005.

FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C.. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993. 681p.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63. n. 3, 2000.

HERTZLER, S. R., CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of American Dietetic Association**, v. 153, n. 5, p. 582-587, 2003.

KWON, H.; KIM, Y.K.L. **Korean fermented foods: kimchi and doenjang**. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.287-304.

MARCHIORI, R. C. Caracterização do kefir e propriedades probióticas – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. V. 62, p. 21-31, set/out. 2007.

OTA, A. Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic E. coli O-157. **Medical Hypotheses**, Japão, v. 53, n. 1, p. 87-88, jan. 1998.

PINTADO, M. E.; SILVA, J. A. L.; FERNANDES, P. B.; MALCATA, F. X.; HOGG, T. A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, Vol. 13, No. 5–6, pp. 485–492 2005

SANTOS, A.; MAURO, S. M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. **System. Appl. Microbiol.** 26, 434–437 2003.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação, in: **Fitoterápicos anti-inflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**, Carvalho, J. C. T. (Ed.), ch. 33, pp. 443–467. Tecmedd, Ribeirão Preto 2004.

SHAMA, S. de F.M.S. **Características higiênicas sanitárias e contaminação fecal-experimental de amostras de kefir tradicional**. 1998. 68f.Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA, T. S.; FRENGOVA, G.; SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1-6, 2002.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J.L. Kefir e sua tecnologia - aspectos gerais. **Boletim ITAL**, Campinas. Vol 21. Nº 2. P 137-155. Abril/junho 1984.

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 219-224, out. 1989.

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 Mikrobiyol Cem Derg** 2007

VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **J. Dairy Res.**, v.72, p.195-202, 2005.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. J. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, África do Sul, v. 22, p. 337-344, set. 2004.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. 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, fev. 2001.

CAPÍTULO III

Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados.

Artigo submetido à Revista SEMINA
Universidade Estadual de Londrina
Campus Universitário – Caixa Postal 6001
86051-990 – Londrina, Paraná, Brasil
Enviado em 8 de janeiro de 2009.

Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados.**Physicalchemical and sensorial characteristic of traditional kefir and derivatives.**

SIMONE WESCHENFELDER^{1*}; JOSÉ MARIA WIEST²; HELOISA HELENA CHAVES CARVALHO³

RESUMO

Kefir é um leite fermentado resultante da dupla fermentação no leite pelos grãos de kefir, estes grãos são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas. Do kefir pode-se obter o kefir leban e o soro de kefir, ambos resultantes da filtração do kefir. Este estudo teve por objetivo caracterizar e avaliar o comportamento de diferentes populações de grãos de kefir tradicional e de seus derivados, o kefir, o kefir leban e o soro de kefir, quanto às características físico-químicas, sensoriais e intenção de compra, quando inoculados em diferentes concentrações de leite padronizado, levando em consideração as variáveis tempo/temperatura de incubação, maturação e filtração. Os resultados demonstraram que a manipulação e padronização das populações de grãos de kefir foram eficazes na obtenção de produtos com características semelhantes e que o volume de leite utilizado na incubação influencia significativamente nas características dos derivados. A avaliação sensorial apresentou boa aceitabilidade e obteve-se 58% de intenção de compra.

Palavras-chave: Grãos de kefir, Kefir, kefir leban, soro de kefir, características físico-químicas e sensoriais.

¹ Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: simone.weschenfelder@yahoo.com.br

* Autor para correspondência. Local de realização do trabalho: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS) Porto Alegre – RS/Brasil

² Professor Doutor orientador do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: jmwiest@ufrgs.br

³ Doutora Nutricionista do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. E-mail: hhcarvalho@terra.com.br

ABSTRACT

Kefir is a fermented milk from of the double fermentation in milk by kefir grains, these grains are described as a symbiotic association of yeasts, acid-lactic and acid-acetic bacteria. Kefir leban and kefir whey can be obtained by the filtration of kefir. This study aimed to characterize and evaluate the behavior of different traditional kefir grains populations and their derivatives, the kefir, the kefir leban and the kefir whey, on physicochemical and sensorial characteristics, including purchase intention, when inoculated into different standardized milk concentrations, with the incubation time / temperature, maturation and filtration variables. The results showed that the handling and the standardization of kefir grains populations have been effective in obtaining products with similar characteristics and that the volume of milk used in the incubation has influenced significantly the characteristics of the derivatives. The sensory evaluation showed good acceptability and purchase intention was up 58%.

Keywords: kefir grains, kefir, kefir leban, kefir whey, physicochemical and sensorial characteristics.

1 INTRODUÇÃO

Kefir é um leite fermentado, ligeiramente efervescente e espumoso, de fácil preparo e economicamente acessível, originado da ação da microbiota natural presente nos grãos ou grumos de kefir (WITTHUHN *et al.*, 2004; MARCHIORI, 2007). Os grãos são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, apresentando tamanhos variados entre 0,5-3,5cm de diâmetro, com volume de 0,5-20,0 mL/grão, forma irregular, cor amarelada ou esbranquiçada (RIVIÈRE *et al.*, 1967; PINTADO *et al.*, 1996; HERTZLER *et al.*, 2003). A composição microbiana dos grãos de kefir é variável, sofrendo influência da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato utilizado para proliferação dos grãos e das técnicas utilizadas para sua manipulação (WSZOLEK *et al.*, 2001; WITTHUHN *et al.*, 2004).

A dupla fermentação no leite por bactérias e leveduras, que ocorre no kefir, resulta na produção de um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás

carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares. O ácido lático formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro, combinando-se este com os nutrientes, cálcio e ferro, facilitando a absorção dos mesmos. O produto possui ainda, alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (SOUZA *et al.*, 1984; HERTZLER *et al.*, 2003).

A composição microbiológica e química indica que o kefir é um produto com características probióticas, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Sua capacidade de imunomodulação, resultante da ingestão oral já foi relatada em alguns estudos (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005).

Outro benefício atribuído ao kefir é a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE *et al.*, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-láticas dos grãos de kefir produzem bacteriocinas e o próprio kefiran, que são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES *et al.*, 2005).

A partir do kefir pode-se obter o kefir leban e o soro de kefir. O kefir leban é a fase sólida, obtida da filtração do kefir por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. É um produto leve e altamente digerível, com sabor e textura semelhantes ao queijo quark. Pode ser consumido puro ou usado em formulações substituindo o *cream cheese* ou queijo *cottage*, além do desenvolvimento de outros produtos. O soro de kefir consiste na fase líquida obtida da mesma filtração, este pode ser aproveitado de diversas maneiras, desde o uso como matéria prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (CZAMANSKI 2003; SCHNEEDORF *et al.*, 2004)

O desenvolvimento do kefir em escala comercial já existe em alguns países, no entanto, a maioria destes produtos são elaborados apenas a partir de algumas amostras bacterianas isoladas dos grãos de kefir, o que faz com que muitas das propriedades naturais, que somente os grãos produzem em razão de sua complexa microbiota, não sejam encontradas nos produtos comerciais. Bezerra *et al.* (1999) comentam que, embora ainda não

industrializado no Brasil, o kefir vem conquistando adeptos em várias regiões do país nos últimos anos. Sua preparação, apenas em nível artesanal, resulta em um produto com uma série de características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas ainda não bem definidas e se restringe a poucas famílias que, de alguma forma, conseguiram amostras de grãos de kefir e a eles adicionam leite, obtendo o produto fermentado.

O presente trabalho que teve por objetivo caracterizar e avaliar o comportamento de diferentes populações de grãos de kefir e dos derivados, o kefir, o kefir leban e o soro de kefir, quanto à composição físico-química, aceitação sensorial e intenção de compra.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Padronização do kefir

Para a realização do experimento foram utilizadas quatro populações distintas de grãos de kefir tradicional, oriundas de manipulações familiares, existentes no Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS. A inoculação dos grãos de kefir ao leite foi realizada utilizando-se leite pasteurizado, padronizado e homogeneizado tipo C.

As quatro populações distintas de grãos de kefir foram nomeadas como população 1, 2, 3 e 4 e cada uma dividida em duas alíquotas representadas por A e B que indicavam concentrações de grãos e leite de 1:10 e 1:5 respectivamente, ficando esquematizado da seguinte maneira: 1A representa a concentração de 1:10; 1B representa a concentração de 1:5, assim considerando para as demais populações.

A inoculação dos grãos, de cada população, ao leite foi feita em recipiente de vidro esterilizado, onde as amostras forem incubadas por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em condições aeróbias. A seguir, procedeu-se à maturação, sob refrigeração a $7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 144 horas. Após esta maturação, realizou-se uma tamisação, em peneira de aço inoxidável, sob assepsia, separando-se o kefir dos grãos de kefir. O kefir assim obtido foi submetido a uma filtração em tecido de algodão esterilizado, por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para obtenção do kefir leban e do soro de kefir. Os grãos retidos na tamisação foram novamente inoculados a outra alíquota de leite, repetindo-se as etapas acima descritas. O fluxograma abaixo (Figura 1) ilustra o processo adotado durante o experimento.

Para a obtenção e análise do kefir leban, foram reunidas todas as alíquotas padronizadas A (1:10) obtendo-se somente uma população, sendo o mesmo procedimento adotado para as alíquotas padronizadas B (1:5).

Figura 1

2.2 Análises físico-químicas e sensoriais

2.2.1 Rendimento

Foram realizadas pesagens sucessivas nos grãos de kefir a cada etapa ou ciclo completado desde a inoculação até a obtenção do kefir leban e do soro de kefir para verificar a influencia da concentração de grãos/leite.

2.2.2 pH, acidez e lactose

No kefir e no soro de kefir foi determinada a lactose conforme as normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

A acidez expressa em °D (Dornic) (BRASIL, 2006) e o pH através do pHmetro MP220 (Mettler Toledo) foram determinados no kefir.

2.2.3 Composição centesimal e análise sensorial do kefir leban

As determinações físico-químicas, em triplicata, no kefir leban, foram realizadas pelos métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemist – AOAC (2005), que compreendem: proteína bruta, pelo método de Kjeldahl; resíduo mineral fixo, pela incineração da amostra a 550°C; lipídios totais, através da hidrólise ácida e extração etérea Soxhlet; cálcio, por absorção atômica; e umidade por dessecação 85°C sob vácuo. Já a lactose, conforme normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

Determinou-se também, a sensorialidade de três formulações alimentares lácteas tipo antepasto, a base de kefir leban, utilizando a alíquota A (1:10) por apresentar maior rendimento.

Na tabela 1 são apresentados os ingredientes de cada formulação.

Tabela 1

Todos os ingredientes das formulações foram colocados em aparelho processador/mixer por cerca de 2 minutos. As amostras foram resfriadas a 10°C para posterior realização da análise sensorial.

A análise sensorial foi realizada, através de testes de aceitabilidade e preferência com uma equipe de provadores, composta de 34 julgadores não-treinados. Os testes foram conduzidos em cabines individuais, com os tratamentos identificados de acordo com o teste de aceitação por escala hedônica variando de um a nove pontos (DUTCOSKI, 1996). Foi avaliada também, a intenção de compra, caso as formulações alimentares fossem encontrados à venda no mercado.

2.3 Análise estatística

Os resultados foram analisados através da análise de variância (Anova) e pelo teste de Tukey, estabelecendo significância estatística ao nível de 5% de probabilidade utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS versão 6. 4).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento

Após 168 horas de incubação e maturação das amostras as populações de grãos de kefir 1A, 2A, 3A e 4A apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) com crescimento médio de 20% em relação ao peso inicial dos grãos (Tabela 2). Ao passo que, as populações 1B, 2B, 3B e 4B permaneceram com peso constante após as mesmas horas de incubação e maturação.

Tabela 2

Este comportamento pode ser explicado devido à maior quantidade de substrato disponível para multiplicação nas alíquotas representadas por A do que nas representadas por B. Mesmo se tratando de populações distintas, oriundas de diferentes manipulações familiares, observou-se que o determinante para o crescimento dos grãos foi à quantidade de leite utilizado.

3.2 pH, acidez e lactose

3.2.1 Kefir

A Tabela 3 indica os valores de pH, acidez e lactose encontrados no kefir oriundo da incubação e maturação das populações de grãos nomeadas como 1, 2, 3 e 4 em diferentes concentrações de grãos/leite.

Tabela 3

Os resultados demonstram que houve diferença significativa entre os valores de pH encontrados no kefir originado das populações de grãos 1, 2 e 4 em relação a concentração de leite utilizado. Todos os valores encontrados indicam que o tempo de incubação e maturação foi suficiente para alcançar o pH desejável segundo legislação para leites fermentados (BRASIL, 2000), classificando este produto como um “alimento muito ácido”, garantindo segundo Franco *et al.* (1996) a inibição do desenvolvimento de microrganismos patogênicos e deteriorantes que porventura sobrevivam ao tratamento térmico do leite e que poderiam alterar o produto durante sua vida-de-prateleira.

Irigoyen *et al.* (2005) não encontraram diferença significativa na variação do pH ao longo do armazenamento do kefir em diferentes amostras, mas observaram uma forte queda durante a fermentação, na presença dos grãos, que pode ser justificada pela degradação da lactose, resultante da ação das bactérias presentes nos grãos, que faz com que o pH do kefir diminua. Ulusoy *et al.*, (2007), utilizando grãos liofilizados, encontrou valores de pH semelhantes a este trabalho.

Houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre a acidez encontrada no kefir originado das quatro populações em relação à concentração de leite utilizado. De acordo com os padrões

de identidade e qualidade para leites fermentados, a acidez do kefir ficou acima do determinado pela legislação (BRASIL, 2000). Silva (1995), afirma que o aumento da acidez é determinado pela transformação da lactose pelos microrganismos, com formação de ácido láctico, conferindo acidez característica ao produto. Esta acidez auxilia na absorção e utilização dos nutrientes pelo organismo, além de prevenir possíveis doenças transmitidas por alimentos.

Souza *et al.* (1984) ao avaliar a composição físico-química do kefir, nas condições de seu experimento, encontrou valores de pH na faixa de 4,2 e 4,5, teores de lactose de 2,6 a 3,75% e acidez de 80°D.

Quanto à lactose, após o período de incubação e maturação, os resultados demonstram que também houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre o percentual encontrado no kefir originado das quatro populações em relação à concentração de grãos/leite utilizado. Houve uma diminuição de 64% no kefir com maior quantidade de leite (A) e de 70% no kefir com menor quantidade de leite (B), considerando os níveis iniciais de lactose presente no leite utilizado (\bar{x} 3,68%).

Irigoyen *et al.* (2005) ao testar diferentes concentrações de grãos de kefir e leite, observou, nas concentrações do experimento, diminuição nos teores de lactose de 22% nas primeiras 24 horas de fermentação, em relação aos teores de lactose iniciais presentes no leite, estes valores permaneceram constantes até o 14° dia de maturação.

3.2.2 Soro de kefir

A Tabela 4 indica os resultados da análise dos teores residuais de lactose no soro de kefir resultante da fermentação e maturação de quatro populações distintas de grãos de kefir, o qual apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) quando comparados as concentrações grãos/leite.

Tabela 4

O soro de kefir obtido do processo de filtração apresentou teores de lactose semelhantes aos encontrados no kefir (Tabela 3), estes resultados são esperados uma vez que a lactose é hidrossolúvel.

Apesar de pouco explorado, o soro de kefir é semelhante ao soro de queijo, podendo ser uma opção para elaboração de produtos como bebida láctea, ricotas, sorvetes, tendo inclusive, propriedades antibacterianas (CZAMANSKI, 2003).

3.3 Composição centesimal e análise sensorial do kefir leban

3.3.1 Composição centesimal

A Tabela 5 indica os valores da composição centesimal encontrados para o kefir leban obtido das populações agrupadas das alíquotas A (1:10) e B (1:5), onde as diferentes quantidades de leite utilizadas influenciaram significativamente ($p \leq 0,05$) nos teores de proteína e gordura. A maior concentração protéica no kefir leban obtido da população de alíquotas A pode ser justificada pelo aumento da produção de grãos (Tabela 2).

Tabela 5

O kefir leban obtido dos experimentos apresentou características peculiares como consistência cremosa, semelhante ao queijo quark, aroma característico, cor amarela esbranquiçada, sabor ácido acentuado, boa espalhabilidade.

Mantiveram-se no kefir leban, os teores de cálcio encontrados no leite após o processamento, caracterizando o produto como uma boa fonte deste mineral, que é indispensável na construção e manutenção dos ossos, além de auxiliar no processo de contração muscular e coagulação do sangue (LERNER *et al.*, 2000).

O teor de proteína encontrado no kefir leban equivale a 18% da IDR (ingestão diária recomendada) (ANVISA, 2005), segundo Hertzler *et al.* (2003) o kefir leban possui, alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram desnaturação em vários graus durante a fermentação, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos.

A ausência de lactose constatada no kefir leban pode ser ressaltada, em relação a grupos populacionais da espécie humana que não podem ingerir este nutriente.

3.3.2 Análise sensorial

Os resultados da análise sensorial, teste de aceitabilidade, realizados com os antepastos elaborados a base de kefir leban estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6

O teste de aceitabilidade demonstrou diferença significativa entre o antepasto I e os antepastos II e III. A aceitabilidade, por parte dos provadores, foi maior para o Antepasto I, elaborado com salsa, cebola, alho nirá, pimenta preta, sal e leban.

A acidez elevada do kefir que originou o kefir leban pode justificar o fato da aceitabilidade não ter sido maior, além do fato dos provadores não terem o hábito de consumir produtos a base de kefir leban.

A Tabela 7 indica a intenção de compra dos provadores em relação aos três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban.

Tabela 7

Comparando-se os resultados com os da Tabela 6 constatou-se que as formulações alimentares, antepasto II e III, embora não apresentando diferença significativa em relação a aceitabilidade, apresentaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) em relação a intenção de compra. O antepasto III, elaborado com hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), açúcar e kefir leban descaracterizou-se como antepasto segundo a opinião da maioria dos provadores, pois apresentou características como cor e consistência semelhantes ao iogurte.

O antepasto I foi à formulação com maior aceitabilidade e intenção de compra. A condimentação utilizada no preparo, na opinião dos provadores, são tradicionalmente conhecidas, o que não provocou estranheza e mascarou parte da acidez pronunciada do produto.

4 CONCLUSÕES

A padronização das amostras resultou em produtos com características físico-químicas semelhantes e reprodutivas nas diferentes repetições do experimento.

A quantidade de leite utilizada para incubação e maturação das amostras influenciou significativamente no rendimento dos grãos, nos valores de pH, acidez e lactose do kefir e do soro de kefir.

O kefir leban obtido no experimento apresentou características peculiares como consistência cremosa, aroma característico, cor amarela esbranquiçada, sabor ácido acentuado, boa espalhabilidade. Manteve os teores de cálcio presentes no leite utilizado para incubação dos grãos, além de concentrar a proteína e não conter lactose. Sua aceitabilidade em formulações alimentares foi considerada satisfatória, considerando o fato dos provadores não terem o hábito de consumir produtos a base deste.

Sendo assim, pode se considerar esses resultados como uma ferramenta para novos estudos na área, visando o desenvolvimento de futuros trabalhos para melhor explorar as propriedades dos grãos de kefir e derivados (kefir, kefir leban e soro de kefir) em nível de mercado.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto.

6 REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais**. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18828&word=> Acesso 20 dez. 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18.ed. Maryland: AOAC, 2005.

BEZERRA, A.B.; BOARI, C.D.; OLIVEIRA, M.N.; ZANCANARO, JR.O. **Kefir x iogurte: uma comparação sensorial**. Indústria de laticínios, São Paulo, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. **Oficializa os "Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados"**. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3285> Acesso em: 20 dez. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 68 de 12 de dezembro de 2006. **Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite**

e produtos lácteos. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17472> Acesso em: 20 jun. 2008.

CZAMANSKI, R. T. **Avaliação da atividade antibacteriana de filtrados de quefir artesanal.** 2003. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

DUTCOSKI, S. D. **Análise Sensorial de Alimentos.** Curitiba: Champagnat, 123 p., 1996,

FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. **Food Sci. Technol. Bull.**, v.2, n.1, p.1-17, 2005.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 1996.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63. n. 3, 2000.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal os American Dietetic Association.** v. 153, n. 5, p. 582-587, 2003.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo v.1, 533p., 1985.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P., IBANEZ, F.C. "Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage", **Fd Chem.**, Vol. 90, p. 613-20, (2005).

LERNER, B. R.; LEI, D. L. M.; CHAVES, S. P.; FREIRE, R. D. O cálcio consumido por adolescentes de escolas públicas de Osasco, São Paulo. **Rev. Nutr.**. 2000, v. 13, n. 1, pp. 57-63. ISSN 1415-5273

MARCHIORI, R. C. Caracterização do kefir e propriedades probióticas – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes.** V. 62, p. 21-31, set/out. 2007.

PINTADO, M. E.; SILVA, J. A. L.; FERNANDES, P. B.; MALCATA, F. X.; HOGG, T. A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.

RIVIÈRE, J. W. M., KOOIMAN, P. Kefiran, a Novel Polissaccharide Produced in Kefir Grain by *Lactobacillus brevis*. **Archiv für Mikrobiologie**, v. 59, p. 269-278, abril 1967.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, Vol. 13, No. 5–6, pp. 485–492, 2005.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. **Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação**, in: *Fitoterápicos anti-inflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*, Carvalho, J. C. T. (Ed.), ch. 33, pp. 443–467. Tecmedd, Ribeirão Preto, 2004.

SILVA, J. E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1995.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J.L. **Kefir e sua tecnologia - aspectos gerais**. Boletim ITAL, Campinas. Vol 21. Nº 2. P 137-155. Abril/junho 1984.

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 Mikrobiyol Cem Derg** 2007.

VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **J. Dairy Res.**, v.72, p.195-202, 2005.

WITTHUHN, R. C.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A.; BRITZ, T. J. Impacto f preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, África do Sul, v. 22, p. 337-344, set. 2004.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. Properties of kefir made in Scotland ando Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with different Starter Cultures. **Lebensm.- Wiss. u.- Technol.**, v. 34, p. 251-261, fev. 2001.

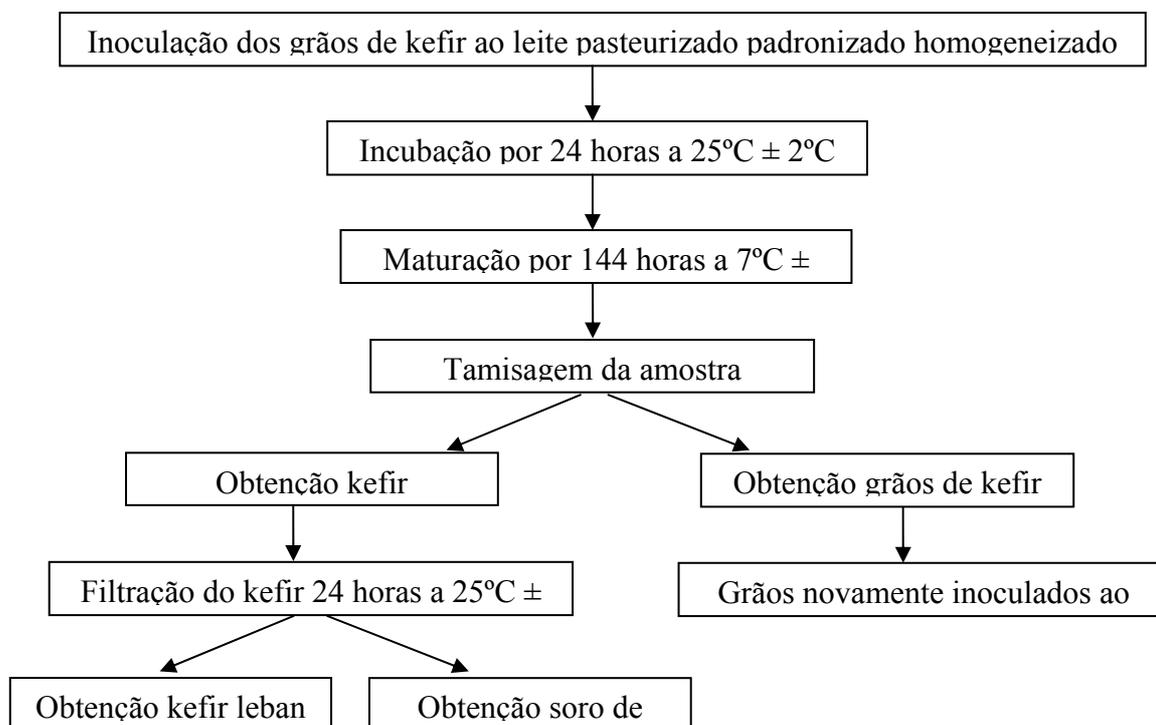


Figura 1. Fluxograma do processo de manipulação e padronização do kefir.

Tabela 1. Formulações alimentares tipo antepasto* preparadas para realização das análises de aceitabilidade e preferência, com provadores não treinados.

Antepasto I	Antepasto II	Antepasto III
40 g de salsa picada	10 g de massa de tomate	30 g de hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.)
30 g de cebola picada	90 g de pimentão vermelho	30 g de açúcar
15 g de alho nirá picado	10 g de açúcar	90 g de kefir leban
0,5 g de pimenta preta	90 g de kefir leban	
5 g de sal		
90 g de kefir leban		

* Antepastos são pequenas iguarias, pratos servidos como entrada ou aperitivo, antes da refeição principal.

Tabela 2. Peso final dos grãos de kefir após incubação e maturação em diferentes concentrações.

Populações de grãos de kefir e concentração de grãos/leite	Peso dos grãos na incubação	Peso dos grãos após tamisagem
1, 2, 3 e 4 (A)	50g ^a	60g ^b
1, 2, 3 e 4 (B)	50g ^a	50g ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Letra A corresponde à concentração de grãos/leite 1:10; Letra B corresponde a concentração de grãos/leite 1:5.

Tabela 3. Valores de pH, acidez e lactose em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação.

Kefir	pH		Acidez (°D)		Lactose (%)	
	A	B	A	B	A	B
1	3,60 ^a	3,79 ^b	141,95 ^a	184,02 ^b	1,21 ^a	0,96 ^b
2	3,76 ^a	3,59 ^b	210,20 ^a	248,54 ^b	1,59 ^a	1,30 ^b
3	3,61 ^a	3,57 ^a	251,09 ^a	266,98 ^b	1,04 ^a	0,93 ^b
4	3,77 ^a	3,70 ^b	156,14 ^a	201,02 ^b	1,50 ^a	1,07 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha, considerando cada análise independente entre si, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Letra A corresponde à concentração de grãos/leite 1:10; Letra B corresponde a concentração de grãos/leite 1:5

Tabela 4. Valores residuais de lactose no soro de kefir em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação.

Soro de kefir	Lactose	
	A (1:10)	B (1:5)
1	1,51 ^a	1,30 ^b
2	1,66 ^a	1,23 ^b
3	1,30 ^a	0,95 ^b
4	1,47 ^a	0,91 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 5. Composição centesimal do kefir leban obtido das populações agrupadas das alíquotas A e B após incubação, maturação e filtração em relação à concentração de grãos/leite.

Determinações	A (1:10)	B (1:5)
Umidade %	79,39 ^a	79,41 ^a
Proteína %	9,23 ^a	8,11 ^b
Gordura %	8,29 ^a	9,26 ^b
Cinzas %	0,89 ^a	0,83 ^a
Cálcio %	0,11 ^a	0,10 ^a
Lactose %	ausência	ausência

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Avaliação da aceitabilidade por teste de escala hedônica de três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban.

	Antepasto I	Antepasto II	Antepasto III
Aceitabilidade	6,8 ^a	5,6 ^b	5,1 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 7. Avaliação da preferência associada a intenção de compra dos três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban.

	Antepasto I	Antepasto II	Antepasto III
Intenção de compra (%)	58,06 ^a	25,80 ^b	16,12 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

CAPÍTULO IV

Reapresentação dos resultados e considerações finais.

1. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho de pesquisa teve por objetivo caracterizar e avaliar o comportamento de diferentes populações tradicionais de grãos de kefir e de seus derivados, o kefir, o kefir leban e o soro de kefir, quanto à composição físico-química, à sensorialidade e à atividade antibacteriana, uma vez padronizados os procedimentos em relação ao tipo de leite utilizado, ao tempo/temperatura de incubação, de maturação e de filtração.

Relembrando as hipóteses que conduziram o estudo, citadas no capítulo I, foram desenvolvidas as atividades práticas que resultaram na produção de dois artigos científicos constantes nos capítulos II e III da presente dissertação.

1.1 Composição físico-química

Os derivados (kefir, kefir leban e soro de kefir) resultantes da incubação, maturação e filtração em condições padronizadas apresentaram características físico-químicas semelhantes e reproduzíveis nas diferentes repetições do experimento.

A quantidade de leite utilizada para incubação e maturação das amostras influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) no rendimento dos grãos (Tabela 1), nos valores de pH, acidez e lactose do kefir (Tabela 2) e do soro de kefir (Tabela 3).

Tabela 1. Peso final dos grãos de kefir após incubação e maturação em diferentes concentrações.

Populações de grãos de kefir e concentração de grãos/leite	Peso dos grãos na incubação	Peso dos grãos após tamisagem
1, 2, 3 e 4 (A)	50g ^a	60g ^b
1, 2, 3 e 4 (B)	50g ^a	50g ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Letra A corresponde a concentração de grãos/leite 1:10; Letra B corresponde a concentração de grãos/leite 1:5.

Tabela 2. Valores de pH, acidez e lactose em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação.

Kefir	pH		Acidez (°D)		Lactose (%)	
	A	B	A	B	A	B
1	3,60 ^a	3,79 ^b	141,95 ^a	184,02 ^b	1,21 ^a	0,96 ^b
2	3,76 ^a	3,59 ^b	210,20 ^a	248,54 ^b	1,59 ^a	1,30 ^b
3	3,61 ^a	3,57 ^a	251,09 ^a	266,98 ^b	1,04 ^a	0,93 ^b
4	3,77 ^a	3,70 ^b	156,14 ^a	201,02 ^b	1,50 ^a	1,07 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha, considerando cada análise independente entre si, indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$).

Letra A corresponde a concentração de grãos/leite 1:10; Letra B corresponde a concentração de grãos/leite 1:5

Tabela 3. Valores residuais de lactose no soro de kefir em relação à concentração de grãos/leite, após 168 horas de incubação e maturação.

Soro de kefir	Lactose	
	A (1:10)	B (1:5)
1	1,51 ^a	1,30 ^b
2	1,66 ^a	1,23 ^b
3	1,30 ^a	0,95 ^b
4	1,47 ^a	0,91 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

1.2 Análise sensorial

O kefir leban obtido no experimento apresentou características peculiares como consistência cremosa, aroma característico, cor amarela esbranquiçada, sabor ácido acentuado, boa espalhabilidade. Manteve os teores de cálcio presentes no leite utilizado para incubação dos grãos, além de concentrar a proteína e não conter lactose (Tabela 4). Sua aceitabilidade em formulações alimentares foi considerada satisfatória, considerando o fato dos provadores não terem o hábito de consumir produtos a base deste. A intenção de compra ficou em 58% para formulação alimentar preparado com kefir leban e condimentos (Tabelas 5 e 6).

Tabela 4. Composição centesimal do kefir leban obtido das populações agrupadas das alíquotas A e B após incubação, maturação e filtração em relação à concentração de grãos/leite.

Determinações	A (1:10)	B (1:5)
Umidade %	79,39 ^a	79,41 ^a
Proteína %	9,23 ^a	8,11 ^b
Gordura %	8,29 ^a	9,26 ^b
Cinzas %	0,89 ^a	0,83 ^a
Cálcio %	0,11 ^a	0,10 ^a
Lactose %	ausência	ausência

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 5. Avaliação da aceitabilidade por teste de escala hedônica de três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban.

	Antepasto I	Antepasto II	Antepasto III
Aceitabilidade	6,8 ^a	5,6 ^b	5,1 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Tabela 6. Avaliação da preferência associada a intenção de compra dos três tipos de antepasto elaborados a base de kefir leban.

	Antepasto I	Antepasto II	Antepasto III
Intenção de compra (%)	58,06 ^a	25,80 ^b	16,12 ^c

Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

1.3 Atividade antibacteriana.

Em relação à atividade antibacteriana seletiva frente ao inóculo padronizado de interesse em alimentos, no caso, a *Escherichia coli* (ATCC 11229), tanto o kefir quanto o soro de kefir, na concentração testada de 50%, apresentaram total inibição e inativação frente ao inóculo, nas condições do experimento, conforme demonstram as Tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições.

		<i>Escherichia coli</i> ATCC (11229)					
Amostra	Tempo (h)	1ª repetição		2ª repetição		3ª repetição	
		IINIB	IINAB	IINIB	IINAB	IINIB	IINAB
Kefir	24	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	48	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	72	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}

Resultados representam a média das triplicatas

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Tabela 8. Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) do soro de Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições.

		<i>Escherichia coli</i> ATCC (11229)					
Amostra	Tempo (h)	1ª repetição		2ª repetição		3ª repetição	
		IINIB	IINAB	IINIB	IINAB	IINIB	IINAB
Soro de kefir	24	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	48	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}
	72	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}	12 ^{Aa}

Resultados representam a média das triplicatas

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

As tabelas demonstram a atividade máxima frente ao inóculo *Escherichia coli* ATCC (11229), em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL, em ambas as análises e nas diferentes repetições do experimento. Estes resultados tornam-se relevantes, considerando que, dificilmente, em preparações alimentares, seriam encontradas concentrações tão elevadas deste microorganismo. Isto sugere a precisão do método (resistência a fatores extrínsecos) e a padronização das técnicas quanto à preditividade dos resultados positivos e negativos, pela diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade dos resultados obtidos.

A inibição e inativação da *Escherichia coli* ATCC (11229) foi garantida pela presença e ausência dos desinibidores bacterianos recomendados no experimento e pelas técnicas de

manipulação e padronização adotadas para o kefir que se mostraram eficazes, pois permitiram a obtenção de um produto com características antibacterianas similares e reprodutivas.

Concluindo, pode se considerar que os resultados aqui apresentados constituem ferramenta para novos estudos na área, visando o desenvolvimento de observações e de experimentos que permitam melhor explorar as propriedades dos grãos de kefir e de seus derivados (kefir, kefir leban e soro de kefir), inclusive com vistas ao lançamento de novos produtos alimentícios no mercado.