

RAFAELA BERGMANN STRADA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO QUEFIR EM GRÃOS,  
SUSPENSÃO, LIOFILIZADO E ADICIONADO À RAÇÃO DE  
COELHOS**

Alfenas - MG  
2005

RAFAELA BERGMANN STRADA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO QUEFIR EM GRÃOS,  
SUSPENSÃO, LIOFILIZADO E ADICIONADO À RAÇÃO DE  
COELHOS**

Dissertação apresentada à Universidade José do Rosário Vellano-UNIFENAS como parte das exigências do Curso de Mestrado em Ciência Animal para obtenção do Título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini  
Co-orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Alfenas – MG  
2005

Oliveira, Rafaela Bergmann Strada de

Análise Microbiológica do quefir em grãos, suspensão, liofilizado e adicionado à ração de coelhos/.  
Alfenas:Unifenas, 2005.

59 p.

Orientador: Prof. Dr. João Evangelista Fiorini  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –  
Universidade José do Rosário Vellano  
1. Coelhos-ração I Título

CDU:  
576.8:636.084(043)

## MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

---

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Título:** “ Análise Microbiológica do Quefir em Grãos, Suspensão, Liofilizado e Adicionado a Ração de Coelhos”

**Autora:** RAFAELA BERGMANN STRADA DE OLIVEIRA

**Orientador:** Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIA ANIMAL pela Comissão Examinadora.

---

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

---

Prof. Dr. José Maurício Schneedorf F.Silva

---

Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Sandra Maria Oliveira Morais Veiga

---

Prof. Dr. Paulo Figueiredo

Alfenas, 21 de fevereiro de 2005

---

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini

Presidente da Comissão Organizadora

Orientador

***DEDICO***

***Aos meus orientadores, Prof. Dr. João Evangelista Fiorini e Prof.  
Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.***

## **AGRADECIMENTOS**

***A Deus,***

que sempre esteve presente.

***À minha família,***

que sempre acreditou.

***À Unifenas e ao Laboratório de Biologia e Fisiologia de  
Microrganismos ,***

pela oportunidade de realização do curso.

***Ao Reitor Prof. Edson Antônio Vellano,***

pelo apoio e confiança.

***Ào Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva,***

pela co-orientação, apoio e dedicação, o meu respeito e  
agradecimento.

***Ao Prof. Dr. João Evangelista Fiorini,***

pela orientação, carinho, atenção, paciência e sabedoria, a  
minha eterna gratidão.

***Às técnicas do Laboratório de Biologia e Fisiologia de  
Microrganismos , Maria e Fátima,***

o meu muito obrigado pela colaboração e trabalho eficiente.

***Aos meus amigos de Curso,***

pela alegria, bons momentos e sugestões. Vocês foram responsáveis por dias incríveis e são donos de algumas das melhores horas de estudo que tive;

***Aos meus eternos amigos, Marlon e João Paulo,***

pelo carinho, atenção, paciência e seus ombros amigos nas minhas horas difíceis.

***Aos meus colegas de Laboratório, Daniel e Bruno***

pela alegria do convívio.

**Aos Professores do curso de Mestrado em Ciência Animal,**

que depositaram confiança no que realizei.

**Aos funcionários do Restaurante dos Lagos,**

pelo excelente trabalho na minha ausência.

**À minha amiga, Fabiana Claudia de Freitas,**

obrigado pelas conversas e sua paciência no meu tempo corrido.

***“ O tempo é o SENHOR do destino”.***

## SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	4
3.1 Alimentos Funcionais.....	4
3.2 Prebióticos, Probióticos e Simbióticos.....	5
3.3 Quefir.....	9
3.4 Cunicultura.....	14
3.5 Água-de-Coco.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local.....	19
4.2 Procedência dos Grãos de Quefir.....	19
4.3 Métodos.....	19
4.3.1 Produção do Quefir.....	19
4.3.2 Quefir liofilizado.....	20
4.3.3 Rações com Quefir.....	20
4.3.4 Análise Microbiológica do Quefir, do Quefir Liofilizado e da Ração contendo Quefir.....	21
4.3.4.1 Preparo das amostras e inóculo em Ágar Água-de-Coco a 1,5%(AAC)..	22
4.3.4.2 Preparo das amostras e inóculo em Ágar Água-de-Coco Adicionado de Extrato de leveduras(AACE).....	22
4.3.4.3 Identificação e Determinação de Coliformes Totais, Coliformes Fecais e <i>Escherichia coli</i> .....	23
4.3.4.4 Técnica de Análise de Streptococcus.....	23
4.3.4.5 Técnica de Análise de Leveduras.....	23
4.3.4.6 Técnica de Análise de Bactérias Lácticas.....	23
4.3.4.7 Contagem Total de Bactérias e Leveduras.....	24
4.3.4.8 Identificação de Leveduras e Bactérias.....	24
4.4. Análise Estatística.....	25
5 MANUSCRITO 01.....	26
6 MANUSCRITO 02.....	46
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

## LI STA DE TABELAS

Pág.

TABELA 1. Microbiota dominante encontrada no quefir, e algumas características..... 11

### MANUSCRITO 01

TABELA 1. Contagem média total de *Lactobacillus* em Suspensão e Grão de Quefir cultivados no meio de Rogosa incubados a 35,5°C por 72h..... 34

TABELA 2. Isolamento, identificação e quantificação de bactérias facultativas presentes nos grãos do quefir, na suspensão e no quefir liofilizado cultivados em Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras a 35,5°C..... 36

TABELA 3. Leveduras isoladas e identificadas em amostras de quefir em grãos, suspensão e liofilizado cultivados em Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras e Ágar Água-de-Coco a 35,5°C..... 37

TABELA 4. Contagem média global de bactérias facultativas no meio Água-de-Coco e Água-de- Coco com Extrato de Leveduras em amostras de quefir em grãos, suspensão e liofilizado..... 39

### MANUSCRITO 02

TABELA 1 – Contagem média total de bactérias mesófilas facultativas heterotróficas no quefir em diferentes apresentações adicionado a rações modificadas (grãos, suspensão, liofilizado)e ração controle, cultivados em BHI a 35,5°C por 72h..... 55

Tabela 2 - Frequência de presença ou ausência de coliformes totais(meio EMB35°C) e fecais(meio EMB 45°C) em amostras de rações adicionadas de quefir em grãos, suspensão , liofilizado e ração controle..... 56

## Resumo

**OLIVEIRA, Rafaela Bergmann Strada de. Análise Microbiológica do Quefir em Grãos, Suspensão, Liofilizado e Adicionado à Ração de Coelhos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). UNIFENAS. Alfenas.**

Os alimentos probióticos são suplementos alimentares elaborados à base de microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinado teor, afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O microrganismo, para ser considerado probiótico, deve ser habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, manter a viabilidade e atividade metabólica no intestino. O quefir enquadra-se no grupo dos alimentos probióticos. O quefir tradicional é um subproduto do leite, resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do quefir-conglomerado de organismos vivos-constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. Existem dois tipos de quefir: açucarado, em fermentado aquoso, e lácteo. Os grãos de quefir e seu sobrenadante são compostos de microrganismos, polissacarídeos, moléculas aminadas, vitaminas, álcool e substâncias voláteis. Sua composição microbiológica é bastante variável, o que resulta em distintos perfis de bioprodutos e conseqüente ação probiótica. Este trabalho teve por objetivo isolar, quantificar e caracterizar os microrganismos presentes em amostras de quefir e os estabilizados em ração comercial para consumo em cunicultura. O processo de quantificação microbiana do quefir liofilizado, do quefir total (suspensão e grãos) e da ração misturada ao quefir foi realizado através de diluições decimais, plaqueadas nos meios Ágar Rogosa (AR) e De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para *Lactobacillus*, "Brain Heart Infusion" (BHI), para contagem global de bactérias, Sabouraud-glicose (para leveduras e fungos filamentosos), Tioglicolato para *Streptococcus*, *Acetobacter* e *Leuconostoc* e Ágar Água-de-Coco (AAC) e Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras (AACE), para crescimento de gêneros diversos (grão, suspensão e liofilizado). Utilizaram-se também os meios Ágar Mitis Salivarius (para *Streptococcus*) o EMB35°C (coliformes totais) e EMB45°C (coliformes fecais) para a análise das rações. Para a identificação de gêneros e espécies foram utilizadas provas bioquímicas convencionais, além de galerias API específicas. Concluiu-se que a microbiota do quefir não é igual em todos os aspectos se comparada com a literatura disponível, existindo vários fatores que influenciam na sua composição, sendo que o quefir em estudo possui microrganismos semelhantes aos da literatura existente, apresentando também algumas particularidades ainda não descritas. As bactérias encontradas foram *Leuconostoc* ssp, *Lactobacillus lactis cremoris*, *Chysemomonas luteola* e *Acetobacter*. As leveduras encontradas foram *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspola delbruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloekera* sp, *Candida famata*, *Kluyveromices lactis*, *Kluyveromices marxianus* e *Candida quefir*. O meio Ágar Água-de-Coco demonstrou um bom crescimento para microrganismos, sendo indicado como meio de cultivo alternativo, com melhor resultado se acrescido de extrato de leveduras. O quefir no estado liofilizado foi o que apresentou a contagem de bactérias mais elevada possivelmente, em virtude de sua concentração.

## SUMARY

**OLIVEIRA, Rafaela Bergmann Strada de.** Microbiological analysis of kefir preparations (grains, fermented suspensions, lyophilized) and kefir added to pellets diet for rabbits. Dissertation (Master in Animal Science). UNIFENAS. Alfenas.

Probiotics are supplementary foods produced by living microorganisms that improve animal health by promoting balance of the intestinal microbiota. To be considered probiotic, the microorganism must either be a normal inhabitant of the gastrointestinal tract, survive the passage through the stomach, resist the action of digestive enzymes and bile, and keep its viability and metabolic activity in the intestines. Kefir is a probiotic, made by several bacteria and yeasts encapsulated in a polysaccharide matrix, and looking like jelly grains. Traditional kefir is a byproduct of milk, resulting from double fermentation – alcoholic and lactic. There are two kinds of kefir: sugary in aqueous fermentation and milky. Kefir grains and their supernatant are composed of microorganisms, polysaccharides, aminated molecules, vitamins, aminoacids, peptides, ethanol and volatile compounds. Kefir is known to have diverse microbial contents, depending on country and fermentative substrates, what causes distinct probiotic effects. So, the purpose of this paper was to isolate, identify, quantify and characterize the microorganisms of kefir samples, including the kefir added to food pellets for rabbits. Serial dilutions of distinct kefir sources (fermented suspension, lyophilized, grains) and mixed pellets were plated in Rogosa agar (AR) and De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) for *Lactobacillus*, Brain Heart Infusion (BHI) for total bacteria, Sabouraud-glucose for yeast and filamentous fungi, thioglycolate for *Streptococcus*, *Acetobacteria* and *Leuconostoc*, coconut water agar (AAC) and coconut water agar supplemented with yeasts (AACE). In pellet analysis, plating with Mitis Salivarius agar (*Streptococcus*), EMB35°C (total enterobacteria) and EMB45°C (fecal enterobacteria) were also used. Genus and species of all strains were identified through usual biochemical reactions and specific API systems. In general, literature recognize the existence of differences in kefir microbial contents, depending on the source of the grains, but the kefir of this study has a microbial composition similar to the one described in the literature, and also shows other microorganisms, not reported yet. The data obtained with the AAC and AACE media suggested that both substrates are alternative and salutary media for culture of kefir strains.

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles que apresentam substâncias com distintas funções biológicas, denominadas componentes bioativos, e que são capazes de modular a fisiologia do organismo, garantindo a manutenção da saúde.

Existe um grupo de alimentos funcionais que merece maior atenção: os alimentos pré e probióticos. Prebióticos seriam ingredientes não digeríveis de alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro, simulando seletivamente o crescimento e/ou a modificação da atividade metabólica de uma ou um limitado número de cepas bacterianas no cólon, com potencial de melhorar a saúde do hospedeiro. Os alimentos probióticos são suplementos alimentares elaborados à base de microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinado teor, afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O microrganismo, para ser considerado probiótico, deve ser habitante normal do trato gastrintestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, manter a viabilidade e atividade metabólica no intestino. O quefir enquadra-se no grupo dos alimentos probióticos.

Historicamente, parece que o quefir seria um leite fermentado pelos chamados grãos ou grumos de quefir, unidades macroscópicas autopropagáveis em cultura. O quefir seria fabricado predominantemente a partir do leite de cabra ou ovelha, desde tempos remotos, pelos tártaros e povos caucasianos. Os grãos de quefir e a suspensão de seus produtos fermentados são compostos de microrganismos, polissacarídeos, proteínas, peptídeos, aminoácidos livres, vitaminas, álcool e substâncias voláteis. Sua composição microbiológica é bastante variável, dependendo de sua origem. Os fatores que interferem nesta natureza parecem ser, principalmente, de ordem geográfica, contribuindo também a natureza do substrato utilizado para proliferação dos grãos. O quefir pode ser também liofilizado, retirando-se sua umidade por completo.

Em virtude de seus benefícios para a saúde, como regulador da microbiota intestinal, barreira patogênica contra grande espectro microbiano, e imunomodulador, foi pensada, para este estudo, a utilização do quefir para adição em ração de coelhos - por tratarem-se de bons modelos experimentais e de fácil acesso no estudo em questão, mantendo os seus

componentes ao longo do processo de fabricação para futuras aplicações no campo da Ciência Animal.

O presente trabalho teve por objetivo isolar, quantificar e caracterizar os microrganismos presentes em amostras de quefir diferentemente elaboradas para consumo em cunicultura.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Alimentos Funcionais

Os alimentos funcionais são aqueles que apresentam substâncias com distintas funções biológicas, denominadas componentes bioativos, capazes de modular a fisiologia do organismo, garantindo a manutenção da saúde (DÂMASO,2001).

O Ministério da Saúde publicou uma portaria (Port. MS nº398, 30/04/1999), definindo a regulamentação para alimentos funcionais, conceituando-os como “os alimentos consumidos como parte da dieta usual, que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos e/ou capacidade de reduzirem o risco de doenças crônico-degenerativas, além das suas funções nutricionais básicas. Tais propriedades têm que ser comprovadas junto às autoridades competentes, quando do registro do alimento ou novo rótulo”. Define ainda como *alegação de propriedade de saúde*: “aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde” (DÂMASO, 2001).

“Alimento funcional” é um conceito relativamente recente, que tem sua origem no Japão. Na década de 80, o governo japonês lançou três programas de pesquisa de propriedades funcionais de alimentos que trariam benefícios à saúde. Assim, em 1991, uma nova categoria de alimentos foi definida: Alimentos para Uso Específico em Saúde (*Food for Specific Health Use — FOSHU*), com resultados promissores, tanto sob o ponto de vista da melhoria da qualidade de vida, quanto do ponto de vista econômico-financeiro. Logo, os Estados Unidos e a Europa lançaram-se nestas investigações (ASHWELL, 2002).

Na década de 90, uma ação conjunta foi instaurada pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (*International Life Sciences Institute — ILSI*), sendo denominada Ciência dos Alimentos Funcionais Européia (*Functional Food Science in Europe — FUFOSÉ*).

Roberfroid (1998) afirma ser o alimento funcional “um alimento que detém um atributo passível de ser declarado”.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) segue a mesma linha de definição ao caracterizar uma alegação de propriedade funcional para um alimento, para fins de registro e rotulagem, como “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c). Tal definição provém da Comissão de Assessoramento Tecno-científico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos criada com a atribuição de, entre outras, assessorar a ANVISA em assuntos científicos relacionados à área de alimentos funcionais (BRASIL, 1999a).

São muitas as definições e atributos para os alimentos funcionais. O termo “alimentos funcionais” é o mais utilizado no Brasil e no exterior, embora outros termos sejam utilizados também: nutragênicos, nutracêuticos, biocêuticos, “pharmafood”, “medical food”, “nutritional food”, “therapeutic food”, “fitness food”, dentre outros (ROSSI, 2001; ASHWELL, 2002).

Existe um grupo de alimentos funcionais que merece maior atenção dentro deste nosso cenário de definições: os alimentos pré e probióticos. Estes estão relacionados a áreas fisiológicas bastante diferentes dos alimentos funcionais usuais (ricos em micronutrientes) e caracterizam uma amplitude de possibilidades de desenvolvimento dos mesmos (ASHWELL, 2002). Rossi (2001) considera o grupo dos probióticos muito significativo, chegando a considerá-lo como precursor dos alimentos funcionais.

## 2.2 Probióticos, Prebióticos e Simbióticos

Considera-se que o passo inicial nas investigações científicas acerca dos probióticos foi dado por Ellie Metchnikoff. Percebendo que populações caucasianas apresentavam grande longevidade e alta ingestão de leites fermentados, este microbiologista publicou o tratado “O prolongamento da vida” (*The prolongation of life*) em 1908, registrando suas observações de que bacilos presentes nestes alimentos impediam a proliferação de outros microrganismos patógenos (ROSSI, 2001). Já na década de 40, indústrias passariam a produzir leites fermentados, em virtude de diversos trabalhos científicos que demonstravam os benefícios dos probióticos (ROSSI, 2001).

Os alimentos probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus acidophilus*, por exemplo, que ingeridos em determinado teor afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O microrganismo, para ser considerado probiótico, deverá ser habitante

normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, além de manter sua viabilidade e atividade metabólica no intestino. Os leites fermentados fazem parte deste grupo. Dentre os efeitos profiláticos e terapêuticos enunciados para os probióticos, destacam-se: balanceamento da microbiota intestinal, aumento da tolerância e da digestão da lactose, atividade anti-tumorigênica, redução do nível de colesterol, modulação da absorção de amônia, síntese de vitaminas do complexo B, absorção de cálcio e modulação do sistema imunológico, equilíbrio da relação insulina/glucagon, redução da lipogênese hepática, catabolismo do colesterol e metabolismo das lipoproteínas. Os probióticos podem ser usados de forma inovadora, como suplementos para aliviar uma inflamação intestinal, normalizar as disfunções da mucosa intestinal e para aumentar as reações de hipersensibilidade. O suprimento limitado de proteína animal, em algumas partes do mundo, gera a necessidade de pesquisar fontes alternativas. No Brasil, na faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas, está sendo desenvolvido um fruto-oligossacarídeo, obtido a partir da cana de açúcar, chamado de Neosugar, com função pré-biótica, ou seja, componentes da dieta (alimentos não digeríveis) que beneficiam o hospedeiro por estimular seletivamente o crescimento e/ou a atividade das bactérias residentes no cólon. A ingestão destes produtos aumenta a quantidade de bifidobactérias presentes no organismo, produz ácidos graxos de cadeia curta, diminuindo o pH intestinal e reduz o tempo em que o alimento fica no intestino, levando a uma diminuição da produção de substâncias putrefativas no intestino (LANZILLOTTI, 2002).

Para o ILSI, existem muitas controvérsias sobre as definições dos termos probiótico, prebiótico e simbiótico. Este órgão sugere que probióticos seriam “microrganismos vivos, ingredientes de alimentos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, exercem benefícios à saúde do consumidor”. Prebióticos seriam “ingredientes não digeríveis de alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro, simulando seletivamente o crescimento e/ou a modificação da atividade metabólica de uma ou um limitado número de cepas bacterianas no cólon, com potencial de melhorar a saúde do hospedeiro”. Por fim, simbióticos seriam “uma mistura de probióticos e prebióticos com o objetivo de aumentar a sobrevivência da bactéria com capacidade de promover saúde, com a meta final de modificar a microbiota intestinal e seu metabolismo” (ASHWELL, 2002). Particularmente no que diz respeito aos probióticos, outros autores adotam este conceito (MARTEAU & SALMINEN, 1998; TAIPINA & FONTES & COHEN, 2002; DINIZ *et al.*, 2003).

Rossi (2001) afirma que as bactérias lácticas têm efeito probiótico, desde que sobrevivam às condições do aparelho digestório e se estabeleçam no intestino, onde desempenhariam suas funções de promoção à saúde. O autor lista cepas que podem ser consideradas probióticas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium* e *Propionibacterium fredenrichi*. Algumas foram desenvolvidas pela iniciativa privada e são mantidas sob propriedade intelectual, ou seja, são patenteadas, como *Lactobacillus casei* var. *shirota*, *Lactobacillus rhamnosus* var. *GG*, e *Lactobacillus johnsonii*.

A quantidade de probiótico necessária para se obter benefícios à saúde não é clara. Rossi (2001) defende que os benefícios de um probiótico somente seriam alcançados com uma dosagem diária de  $10^9$  células. Sua utilidade está voltada para a saúde humana. Fernandes et al. (2000), em contrapartida, estimam que uma dosagem de  $10^6$  a  $10^7$  células seriam suficientes, sendo os benefícios voltados principalmente para caninos.

Os efeitos de produtos fermentados são variados. Já foram demonstradas diminuição dos sintomas da mal absorção da lactose, prevenção de diarreias, estimulação da resposta imune e redução da incidência de tumores (ROSSI, 2001).

Os critérios adotados para classificar uma substância como um prebiótico são: resultar em quantidades significativas no cólon, não ser digerido nas partes mais altas do aparelho digestório, ser um substrato seletivo de microrganismos benéficos à saúde, e resultar em benefícios colônicos ou sistêmicos ao hospedeiro (FERNANDES *et al.*, 2000; ROSSI, 2001; ASHWELL, 2002; LANZILLOTTI, 2002). Os exemplos mais conhecidos de prebióticos são os oligossacarídeos e a inulina. Entre os oligossacarídeos, são citados os frutoligossacarídeos (FOS), galactoligossacarídeos, xiloligossacarídeos, lactossacarose, rafinose, estaquiose, lactulose, isomaltoligossacarídeos, *neosugars*, lactitol, transgalactosídeos (SAKO & MATSUMOTO & TANAKA, 1999; FERNANDES *et al.*, 2000; ROSSI, 2001; LANZILLOTTI, 2002; PASSOS & PARK, 2003). Os prebióticos são encontrados na natureza em pinhas, mel, cebola, aspargo, gramíneas, banana, centeio, aveia, alcachofra, beterraba, chicória, alho, bulbo de lírio vermelho, trigo e tomate (FERNANDES *et al.*, 2000; PASSOS & PARK, 2003). Alimentos processados também são fontes de prebióticos, como geléia, açúcar mascavo, produtos de padaria, molhos para

salada, produtos cárneos, e confeitaria em geral (ASHWELL, 2002; PASSOS & PARK, 2003).

Zubillaga *et al.* (2001) definem o quefir como um probiótico e descrevem os grãos de quefir como “uma associação simbiótica entre bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras”. Neste ponto, vale ressaltar que a tradução do termo simbiótico refere-se a dois vocábulos, no idioma inglês, de diferentes significados. O termo “synbiotic” é utilizado pelo ILSI para caracterizar a associação de probióticos com prebióticos. Sua tradução seria simbiótico (ASHWELL, 2002). Já a palavra “symbiotic”, tal como usada por Zubillaga *et al.* (2001), refere-se a uma simbiose entre vários organismos vivos de diferentes espécies, e sua tradução poderia significar "simbionte".

### 2.3 Quefir

Também conhecido por *kefir*, *kafir*, *kipp*, e *kefhir*, a palavra parece originar-se do vocábulo turco *kef*, que significa “estar bem”. Há controvérsias em relação a quem se refere propriamente o termo. Historicamente, parece que o quefir seria um leite fermentado pelos chamados grãos ou grumos de quefir. O quefir seria fabricado predominantemente a partir do leite de cabra ou ovelha, desde tempos remotos, pelos tártaros e povos caucasianos. Tornou-se popular em vários países da Europa e é comercializado em algumas regiões da América do Norte. Na Argentina, é importante sua produção domiciliar. No Brasil, sua produção artesanal é feita essencialmente em leite de vaca (SANDOVAL, 1999; GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 1997).

O quefir tradicional é um subproduto do leite, resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do quefir- conglomerado de organismos vivos- constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. O quefir pode ser classificado como um alimento funcional.

Existem dois tipos de quefir: açucarado, em fermentado aquoso e lácteo. Não há registros de que qualquer um dos dois tipos seja produzido em escala comercial no Brasil, mas o quefir existe como um produto da medicina popular.

Wyder, Spillmann & Puhon (1997) acreditam ser o próprio grão do quefir o melhor iniciador para o seu crescimento. O grão consiste em uma matriz gelatinosa que agrupa bactérias do ácido láctico, leveduras e bactérias do ácido acético. Esta microbiota presente no grão pode ser variável, dependendo da origem do grão. Esta bebida difere de outros

leites fermentados porque não é resultado metabólico de uma única espécie (MARSHALL & COLE, 1985).

Vale ressaltar que os grãos de quefir são capazes de fermentar outros alimentos, como açúcar mascavo, refresco adoçado de frutas (RABL *et al.*, 1994), leite de cabra ou ovelha (HAENLEIN, 2001), e soja (ABRAHAM & ANTONI, 1999; LIU & LIN, 2000, LIU, CHEN & LIN, 2002).

Os grãos de quefir e seu sobrenadante são compostos de microrganismos, polissacarídeos, moléculas aminadas, vitaminas, álcool e substâncias voláteis. Sua composição microbiológica é bastante variável, dependendo de sua origem. Os fatores que interferem nesta natureza parecem ser, principalmente, de ordem geográfica e do substrato utilizado para proliferação dos grãos. Wszolek *et al.* (2001) discordam, afirmando que apenas o substrato diferencia a composição do fermentado de quefir, ao analisar leite de ovinos, caprinos e bovinos provenientes da Polônia e Escócia. Vale ressaltar que os autores acima descritos reconhecem que pode ter havido diferenças de análise, realizada em laboratórios dos diferentes países.

Os grãos do quefir têm uma estrutura similar aos pequenos ramos de couve-flor, e podem variar de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro. A composição química dos grãos do quefir gira em torno de 890-900 g/kg de água, 2 g/kg de lipídeos, 30 g/kg de proteínas, 60 g/kg de açúcares e 7 g/kg de cinzas(ZOURARI & ANIFANTAKIS, 1988).

A composição da microbiota dos grãos do quefir depende de sua origem. Em algumas pesquisas foram descritas a presença de *Lactobacillus* homofermentadores e heterofermentadores, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* (ÂNGULO, LOPES & LEMA, 1993).

Bottazzi & Bianchi (1980) investigaram a distribuição da microbiota do quefir. Estes sugerem que as populações encontradas não estão distribuídas aleatoriamente nos grãos. Os *Lactobacillus* encontram-se na periferia do grão. Assadi & Pourahmad & Moazami (2000) estudaram as formas de proliferação do quefir. Os estudos concluíram que o crescimento do quefir é melhor quando se utiliza o próprio grão como colônia iniciadora para o seu cultivo. Os resultados do estudo também puderam concluir as diferentes características sensoriais de acordo com o seu cultivo. Com o intuito de se desenvolver um “quefir placebo” para uso em experimentos clínicos, Mainville *et al.* (2001) estudaram os métodos que poderiam inativar a microbiota do quefir. Foram utilizados os processos de autoclavagem, irradiação e uso de altas pressões. O quefir controle (não tratado) obteve um registro de 8,58 UFC/g de

*Lactococcus*, 8,6 UFC/g de *Lactobacillus* e 5,09 UFC/g de leveduras totais. Após a exposição à temperatura de 110 °C por 3 minutos e temperatura interna de 72 °C, ocorreu a inativação de bactérias e leveduras. A irradiação com 5 kilo Gray (KGy), e o tratamento a alta pressão por 30 minutos, inativou também as bactérias e leveduras, mas deixou inalteradas as estruturas de proteínas e lipídios.

Segundo Marshall & Cole (1985), os grãos de quefir incluem principalmente bactérias lácticas, leveduras, bactérias do ácido acético e possivelmente, outros microrganismos. A composição total dos grãos não está elucidada completamente.

Em adição, os grãos do quefir contêm uma microbiota grande e variada, incluindo bactérias do ácido acético, ácido láctico, e leveduras, como principais componentes, como explicitado na Tabela 1 (ZOURAI & ANIFANTAKIS, 1988; KOROLEVA, 1988; ÂNGULO, LOPES & LEMA, 1993; PINTADO, LOPES & FERNANDES, 1996; REA *et al.*, 1996; GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 1997; KUO & LIN, 1999; LIN, CHEN & LIU, 1999, WSZOLEK *et al.*, 2001).

Garrote, Abraham & Antonini (1997) isolaram e identificaram algumas cepas da microbiota dos grãos do quefir, caracterizando ao menos duas cepas de *Lactococcus*, duas de *Lactobacillus*, duas de leveduras e um bolor ou mofo.

Tabela 1 – Microbiota dominante encontrada no Quefir, e algumas características

Microorganismo	Função	Referência
<b><u>Bactérias</u></b>		Ohara <i>et al.</i> , 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lactobacillus casei</i>	Produção de lactato	Pidoux <i>et al.</i> , 1990; Franzetti <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Produção de lactato	Pidoux <i>et al.</i> , 1990 Marquina <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Produção de arabinose e polissacarídeo a partir de sacarose	Pidoux <i>et al.</i> , 1990; Lin & Chen, Liu, 1999; Leroi & Couroux, 1996
<i>Lactobacillus helveticus</i>		Lin, Chen & Liu, 1999; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus desidiosus</i>	Fermentação de L-arabinose e gluconato	Marshall, Cole & Farrow, 1984
<i>Lactobacillus brevis</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Marquina <i>et al.</i> , 2002; Simova <i>et al.</i> , 2002

<i>Lactobacillus kefirgranum</i>		Arihara, Toba & Adachi, 1990; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa <i>et al.</i> , 1998; Watabe <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Produção de kefirano, interno	Arihara, Toba & Adachi, 1990; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa <i>et al.</i> , 1998;
<i>Lactobacillus kefir</i>	Produção de Kefirano, superficial	Arihara, Toba & Adachi, 1990, 1990; Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Garrote, Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus parakefir</i>		Arihara, Toba & Adachi, 1990, 1990; Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Garrote, Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Takizawa <i>et al.</i> , 1998
<i>Lactobacillus viridescens</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Lactobacillus fermentus</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>Rhamnosus</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>Tolerans</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Lactobacillus casei</i> ssp. <i>Pseudopantarum</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Homo-fermentativo	Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus gasseri</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>Bulgaricus</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactobacillus plantarum</i>		Garrote, Abraham & Antonini, 2001
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		Lin, Chen & Liu, 1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001
<i>Leuconostoc</i> spp.		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Ohara <i>et al.</i> , 1997
<i>Streptococcus</i> spp.		Ohara <i>et al.</i> , 1997; Mitsue,

		Tachibana & Fujio, 1999
<i>Streptococcus salivarius</i> <i>ssp. Thermophilus</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Streptococcus lactis</i> <i>ssp. Lactis</i>		Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Streptococcus thermophilus</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Lactococcus</i> <i>spp.</i>		Ohara <i>et al.</i> , 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999
<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. Diacetylactis</i>		Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Garrote, Abraham & Antonini, 2001
<i>Lactococcus lactis</i> <i>ssp. Lactis</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Garrote, Abraham & Antonini, 1997
Acetobacter		Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999
<b><u>Leveduras e bolores</u></b>		Ohara <i>et al.</i> , 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999
<i>Sacharomyces</i> <i>spp.</i>		
<i>Sacharomyces lipolytic</i>		Garrote, Abraham & Antonini <i>et al.</i> , 1997
<i>Sacharomyces florentinus</i>		Leroi & Courcoux, 1996
<i>Sacharomyces cerevisal</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Garrote, Abraham & Antonini, 1997; Franzetti <i>et al.</i> , 1998; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Sacharomyces unisporus</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Kluyveromyces lactis</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Kluyveromyces marxianus</i>		Lin, Chen & Liun., 1999; Garrote, Abraham & Antonini, 2001; Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida</i> <i>spp.</i>		Ohara <i>et al.</i> , 1997; Mitsue, Tachibana & Fujio, 1999
<i>Candida kefir</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Candida friedrich</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Candida inconspicua</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida maris</i>		Simova <i>et al.</i> , 2002
<i>Torulaspora</i> <i>spp.</i>		Ohara <i>et al.</i> , 1997; Mitsue

		et al., 1999
<i>Torulaspora delbruechii</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993
<i>Hansenula yalbensis</i>		Franzetti <i>et al.</i> , 1998
<i>Geotrichum candidum</i>		Garrote, Abraham & Antonini., 1997
<i>Pichia fermentans</i>		Ângulo, Lopes & Lema, 1993; Lin, Chen & Liun., 1999; Leroi & Courcoux, 1996

Com mais de mil anos de consumo, os microrganismos do quefir não se mostram patogênicos e as suspensões de quefir mostram-se capazes de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; ANSELMO, VITORIA & LAUSADA, 2001). Exemplificando, Belickova *et al.* (2001) avaliaram a contagem global de *Staphylococcus aureus* em 18 diferentes amostras de suspensão de quefir oriundos de um mercado da Eslovênia. Todas as amostras apresentaram-se isentas com relação ao patógeno. Segundo Anselmo, Vitória & Lausada (2001), não ocorre sobrevivência de cepas de *Salmonella* após sua incubação em grãos de quefir num período de 24 horas. O autor concluiu que a atividade antimicrobiana do quefir é eficaz em temperatura ambiente (22°C) e a temperatura de refrigeração (4°C).

Neste sentido, o quefir parece gozar das mesmas características funcionais de probióticos largamente utilizados na indústria de alimentos para animais de produção, atuando como profilático e terapêutico contra o estresse animal no transporte e mudanças climáticas, indisposições variadas, infecção, contaminação, e perda de peso e produtividade que acompanham os períodos gestacionais e de lactação.

As pesquisas com o quefir estão em franca expansão, chegando atualmente, como citado acima, até mesmo na área da Ciência Animal. Gülmez & Güven (2003) estudaram a ação antioxidante do quefir e da vitamina E, utilizando ratos suíços.

Dias *et al.* (2004) estudaram os parâmetros fisiológicos durante a administração oral sub-crônica de quefir em ratos, onde os resultados indicam não haver diferenças significativas nesses parâmetros testados sob o consumo de quefir durante 30 dias em ratos.

A Universidade José do Rosário Vellano, Campus de Alfenas, MG, pesquisa o quefir em modelos animais desde 2000. As pesquisas abordam efeitos probióticos em modelos de ratos, camundongos e, recentemente, em coelhos.

## 2.4 Cunicultura

A carne de coelho é considerada um alimento para o ser humano de excelente qualidade. Por ser um alimento de origem animal, classifica-se como uma confiável fonte protéica. Pelo mesmo motivo, é fonte de micronutrientes importantes e críticos para a saúde coletiva, tais como o ferro, magnésio, cobre entre outros. Por ser ingerido quase sempre em preparações salgadas, oferece indiretamente aporte de iodo, elemento de alta relevância por prevenir o bócio endêmico. Além disso, é uma fonte protéica de baixo teor de lipídios totais e colesterol (FRANCO, 1999).

Sob o ponto de vista taxonômico, os coelhos fazem parte do reino animal, filo *Chordata*, classe dos mamíferos, subclasse placentários, ordem roedores, sub-ordem Duplicidentários, família Leporídeos, gênero *Oryctolagus*. Sua espécie é a *Oryctolagus cuniculus*, de onde vem o termo cunicultura (ZINSLY, 1986).

Há mais de uma centena de raças de coelhos, sendo 5 ou 6 de interesse comercial. Existem três classes de raças: gigantes, grandes ou pesadas; médias ou normais; e pequenas. A cunicultura brasileira vem crescendo e, cada vez mais, torna-se relevante no âmbito econômico. Por sua facilidade de manuseio, pequenos empreendedores vêm aderindo a este tipo de criação. Além da carne, diversos outros produtos de valor comercial são aproveitados do coelho. Uma criação pode ter um ou mais objetivos. Diversos produtos e subprodutos são aproveitados dos coelhos: carne, pele, lã, esterco, pêlo, couro, medicamentos, e subprodutos do abate e processamento. A criação pode ainda visar comercialização de animais para laboratórios e venda de reprodutores ( ZINSLY, 1986).

O coelho é um monogástrico herbívoro. Seu aparelho digestivo é desenvolvido e adaptado para digerir alimentos grosseiros e de baixa qualidade, com os quais se alimenta em seu habitat natural (ZINSLY, 1986).

O coelho se alimenta em pequenas quantidades a cada vez, e com grande frequência. Seu estômago encontra-se sempre cheio. Saindo do estômago, os alimentos percorrem o intestino delgado e, chegando ao seu final, atingem o ceco. Durante sua

permanência no ceco, os alimentos sofrem digestão microbiológica, pela ação de enzimas microbianas. As ações do ceco sobre os alimentos são muito semelhantes às daquelas do rúmen dos poligástricos. Ocorre digestão da fibra e, simultaneamente, síntese de aminoácidos e vitaminas do complexo B por microrganismos. O conteúdo fecal é excretado geralmente à noite, quando ocorre a cecotrofia. Finalmente, o cecotrofe percorre novamente o aparelho digestivo, junta-se a alimentos que não passaram pelo ceco e são eliminados com fezes diurnas, na forma de pelotas (ZINSLY, 1986).

O alimento recomendado é a ração balanceada para a espécie. Estas se apresentam em grânulos com 4 a 6 mm de diâmetro e 7 a 10 mm de comprimento. O modo de fornecimento ideal é através de comedouros tipo escorregador, de carga externa, devendo ser oferecida à vontade. A ingestão média diária de ração é de 150 a 160 g, e o consumo médio de água varia entre 250 e 300 mL ao dia. A água deve ser fornecida em bebedouros automáticos ou do tipo mamadeira (ANDRIGUETTO *et al.*, 1992). Segundo Duarte & Carvalho (1979), na elaboração de uma ração, deve-se atender a certas regras, que consistem em fornecer suficientes quantidades de água, lipídios, glicídios, proteína, fibra bruta, vitaminas e minerais.

O princípio da criação racional do coelho é o sistema de confinamento ou reclusão total. Os animais são mantidos em alojamentos individuais ou coletivos, denominados gaiolas. Recomenda-se o uso de gaiolas abrigadas, metálicas. Os equipamentos necessários são comedouro, bebedouro, e ninho (ZINSLY, 1986).

Como consequência, os animais estão sempre sujeitos às condições que lhe são impostas pelo criador. Assim, as instalações devem facilitar o manejo dos animais, a limpeza e outros serviços de rotina (ANDRIGUETTO *et al.*, 1992).

Tanto pequenos como grandes produtores de coelhos enfrentam distúrbios da criação com as freqüentes diarréias nos animais, principalmente nas primeiras semanas de vida. Muitas vezes a diarréia leva os animais à morte, em virtude do grande número de microrganismos patógenos de sua flora intestinal. Estudos em fezes de coelhos tornam-se necessários para determinar sua microbiota, com o intuito de buscar um tratamento eficiente para a solução deste problema. Sob o ponto de vista experimental, os coelhos são considerados boas cobaias por apresentarem semelhanças fisiológicas com humanos. Outrossim, sua reprodução facilita a obtenção de grandes quantidades de material de estudo em pequenos espaços de tempo. (ZINSLY, 1986).

## 2.5 Água-de-Coco

A água-de-coco é uma boa fonte de potássio, contém sódio, magnésio, cálcio, fósforo e é isenta de lipídios e proteínas. Hipocalórica (18cal / 100mL ), possui glicídios redutores como, por exemplo, glicose e sacarose. Sua composição varia de acordo com a maturação do coco (FRANCO, 1999).

Além de ser um alimento completo, equivale, pelo seu conteúdo nutricional, a uma farmácia. Pela riqueza em potássio, é utilizada como coadjuvante no tratamento de pacientes cardiopatas ou nefropatas, que estejam usando diuréticos ou cardiotônicos do tipo digitálico. Além do efeito antidiarréico, o coco serve como vermífugo. O coco (sua polpa ou sua água) atua minimizando os efeitos da deficiência corporal de potássio, que pode acarretar prejuízos das funções neuro-muscular (fraquezas e paralisias), cardíaca e respiratória (CARDOSO *et al*; 2002).

A água-de-coco pode, então, ser utilizada também com segurança em análises microbiológicas, como componente de meios de cultura. Segundo Cardoso *et al* (2002), a água-de-coco apresenta um fácil preparo e um baixo custo. Em comparação com os meios de cultivo tradicionais, o uso deste ingrediente poderia ser economicamente muito mais viável, comparativamente aos meios de cultivo tradicionais.

Dada a disponibilidade da fruta em vários países, o coco constitui importante fonte alimentar para muitos povos. Do reconhecimento das propriedades nutritivas da água-de-coco, surgiu a idéia do seu emprego em outras áreas, como, por exemplo, nas áreas de Bacteriologia e Micologia, ainda no século passado. Picado (1942), usando água-de-coco pura, fervida, isolou *Aspergillus* de micose pulmonar, afirmando ainda ter isolado fungos patogênicos ao homem com o Agar água-de-coco, sem, no entanto, mencionar os gêneros dos microrganismos, nem as técnicas observadas em seu cultivo. No estudo de Marques & Silva (1966), comparou-se à utilização do ágar água-de-coco com o meio de cultivo Sabouraud, também proposto aqui neste estudo. Para o preparo deste meio, foi retirada a água-de-coco de frutos maduros vendidos em mercados, seguindo-se a filtração e o ajuste do pH para 5,6 com NaOH. Adicionou-se ágar na proporção de 2g/100mL, procedendo-se então, à fusão, distribuição em tubos de ensaio com tampão de algodão e esterilização a 120°C, 20 minutos.

No ano de 1986, Márquez, no trabalho intitulado “El agua de coco verde como base de um cultivo monofásico para Trypanosomatidae, parásitos del hombre en América”,

utilizou a água-de-coco em seus ensaios com a justificativa da crescente dificuldade para a aquisição de recursos para os laboratórios, restrições cada vez maiores para a importação de insumos e o aumento dos custos dos materiais. Estes fatores o obrigaram a pensar em soluções alternativas para problemas já tão cotidianos.

No Laboratório de Microbiologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano, já foram conduzidos cultivos de bactérias Gram positivas e negativas em ágar água-de-coco, com promissores resultados, incluindo várias espécies de *Streptococcus*. Em virtude do exposto acima e das iniciativas anteriores neste mesmo Laboratório, optou-se pelo uso da água-de-coco como meio alternativo para esta proposta de trabalho.

Existem, atualmente, algumas linhas de pesquisa a respeito do cultivo do quefir em água-de-coco, sendo esta utilizada na ativação de grãos iniciadores para crescimento dos microrganismos. Gates (2004) lista alguns benefícios do quefir em água-de-coco: tonificante intestinal, auxílio no processo digestivo, aumento da beleza de pele e cabelos devido aos minerais presentes na água, entre outros.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), Campus de Alfenas, MG.

### 3.2 Procedência dos Grãos de Quefir

Neste trabalho, foi objeto de estudo os grãos ou grumos de quefir, e a sua suspensão ou caldo de cultura. A fim de padronização de termos, quefir se referirá ao produto fermentado pelos grãos de quefir. Os grãos de quefir utilizados foram cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, do Laboratório de Fitofármacos da Unifenas -Campus de Alfenas-, localizado no Bloco das Ciências Agrárias. Seu cultivo foi realizado no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano, utilizando-se água e açúcar mascavo. A liofilização de uma parte dos grãos foi feita na Universidade Federal de Lavras e as análises microbiológicas foram feitas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Unifenas.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Produção do Quefir

Foram utilizados 5g de quefir cultivado em 50g de açúcar mascavo para 1L de água filtrada, por meio de cultivo contínuo por 15 dias, antes do início dos experimentos. Os grãos

foram colocados em frascos de vidro e permitidos propagar em temperatura ambiente durante 24h. Após este período, os grãos foram lavados delicadamente em água corrente, sendo a solução nutriente substituída a cada 24h.

### 3.3.2 Quefir liofilizado

Alíquotas de 500g de grãos de quefir foram parcialmente desidratadas a 37°C por 24h, congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada na Universidade Federal de Lavras(UFLA).

### 3.3.3 Rações com Quefir

As rações foram elaboradas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade José do Rosário Vellano, variando-se a formulação de quefir liofilizado (0,5g), suspensão do quefir (caldo, 8mL) e quefir em grãos (4g) para 100g de ração. Além do quefir, as rações eram compostas de 100g de ração pulverizada para coelhos (Labina, PURINA), 0,5g de cloreto de sódio e 50mL de água destilada (exceção feita à ração com suspensão do quefir em que foram adicionados 42mL de água destilada). Estas foram misturadas em cubas de polietileno com o auxílio de colher de aço inox e uso de luvas de procedimentos. Após a mistura, as rações foram peletizadas em moedor de carne e colocadas em estufa a 45 °C por 24 h.

### 3.3.4 Análise Microbiológica do Quefir, do Quefir Liofilizado e da Ração contendo Quefir

O processo de quantificação microbiana do quefir liofilizado, do quefir total (caldo e grãos) e da ração misturada ao quefir, foi realizado por meio de diluições decimais e plaqueamento nos meios Ágar Rogosa (AR) e De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para *Lactobacillus*; "Brain Heart Infusion" (BHI), para contagem global de bactérias; Sabouraud-glicose, para leveduras e fungos filamentosos; Tioglicolato, para *Streptococos*, *Acetobacter* e *Leuconostoc*; Ágar Água-de-Coco (AAC) e Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras (AACE), para crescimento de gêneros diversos (grão, caldo e liofilizado). Utilizou-se, também, o Ágar Mitis Salivarius, para *Streptococcus*, EMB 35°C (coliformes totais) e EMB

45°C (coliformes fecais) para a análise das rações. Com exceção do AAC e AACE, todos os demais foram de procedência da MERCK/ ALEMANHÃ.

A temperatura de incubação para bactérias foi de 35,5 °C e, para os fungos, 25 °C. O tempo de incubação variou em função do aparecimento de unidades formadoras de colônias (UFC), visíveis macroscopicamente na superfície dos meios, e/ou da turvação dos caldos.

Foram retiradas assepticamente 25g de cada amostra de quefir, homogeneizadas em

Para a identificação de gêneros e espécies foram utilizadas provas bioquímicas convencionais (catalase, oxidase, mobilidade e fermentação de carboidratos), além de galerias API específicas (BioMérieux, França). As galerias API consistem de um índice analítico de perfil taxonômico utilizado para a identificação de bactérias gram-negativas. O mesmo sistema é utilizado para a identificação de bactérias gram-positivas. O sistema enzimático microbiano seletivo de catalogação numérica e posterior confronto com dados tabelados em pacote estatístico produzido pelo fabricante.

225mL de água peptonada (1%) e feitas às diluições decimais ( $10^{-1}$  -  $10^{-5}$ ). Posteriormente, foram pipetadas alíquotas de 1mL de cada diluição para placas de Petri (100 x 20mm) esterilizadas, em triplicatas. Em seguida, foram adicionados, em cada placa, 20mL do meio de cultivo previamente fundido e resfriado a 55°C. As placas foram homogeneizadas com movimentos suaves em forma de oito, sucessivamente por 10 vezes, deixando-se solidificar em temperatura ambiente. Incubaram-se as placas, em posição invertida, a 35,5°C por 5 dias. Transcorrido o período de incubação, consideram-se somente as placas que apresentaram crescimento de colônias isoladas. Foram pipetadas também alíquotas de 0,1mL de cada diluição para a técnica do plaqueamento em superfície com a realização da mesma metodologia descrita acima.

O preparo da amostra e os inóculos foram realizados como descrito anteriormente.

3.3.4.3 Identificação e Determinação de coliforme totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*

3.3.4.2 Preparo das amostras e inóculo em Ágar Água-de-Coco adicionado de Extrato de Levedura (AACE)

Para a elaboração deste meio, utilizou-se 1L de água-de-coco (extraída de coco natural e filtrada), 15g de Ágar Bacteriológico e 1,5g de extrato de leveduras.

A metodologia utilizada foi idêntica ao item 4.3.4.1., porém utilizou-se Ágar EMB previamente fundido e resfriado a 55°C. Transcorrido o período de incubação, consideram-

se somente as placas que apresentaram crescimento de colônias isoladas. Foram pipetadas também alíquotas de 1mL de cada diluição para a técnica do plaqueamento em superfície.

#### 3.3.4.4 Técnica de Análise de *Streptococcus*

A metodologia utilizada seguiu os padrões do item 4.3.4.1, apenas substituindo-se o meio de cultivo que, neste caso, foi o Ágar Mitis Salivarius, incubado a 35,5°C por 24-48h em jarras de microaerofilia.

#### 3.3.4.5 Técnica de Análise de Leveduras

#### 3.3.4.6 Técnica de Análise de Bactérias Lácticas

Com as mesmas diluições descritas anteriormente, foram adicionados em cada placa,

Metodologia conforme o item 4.3.4.1 descrito, utilizando-se o meio Ágar Sabouraud–glicose, incubado a 25°C por 3-5 dias.

20mL de Ágar Rogosa e Ágar DE MAN, ROGOSA e SHARPE previamente fundidos e resfriados a 55°C. Homogeneizou-se com movimentos suaves em forma de oito, sucessivamente por 10 vezes e deixou-se solidificar à temperatura ambiente. Incubaram-se as placas em posição invertida a 20 – 25 °C por 3 a 5 dias. Transcorrido o período de incubação, consideram-se somente as placas que apresentaram crescimento de colônias isoladas. Foram pipetadas também alíquotas de 0,1 mL de cada diluição para a técnica do plaqueamento em superfície.

#### 3.3.4.7 Contagem total de Bactérias e Leveduras

De cada diluição anterior foi plaqueado 1 mL pela técnica “ Pour Plate” em placas (triplicatas) e feita a incubação em posição invertida, a 35,5 °C por 24-48h, para bactérias (BHI), e 25°C / 3-5, dias para leveduras (Sabouraud–glicose). Transcorrido o período de incubação, consideram-se, para a contagem, somente as placas da mesma diluição, que apresentaram entre 30 a 300 UFC (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

### 3.3.4.8 Identificação de Leveduras e Bactérias

## ARTIGO 01

### **Análise Microbiológica do Quefir em Grãos, Suspensão e Liofilizado Cultivado em Alfenas/MG**

Após o isolamento das colônias presentes em cada meio de cultivo, foi realizada a microscopia óptica a fresco e após coloração, além de testes bioquímicos preliminares, como catalase, oxidase, mobilidade e fermentação de carboidratos. Após esta identificação presuntiva, as colônias foram semeadas em galerias API, para identificação de acordo com a sua natureza, sendo API 20 STREP para identificação de *Streptococcus*, API 20 NE para identificação de bactérias não entéricas e API 20 AUX para identificação de leveduras. Todos os Kits API foram de procedência BIOMÉRIEUX (França). A identificação foi realizada com o auxílio de software do próprio kit API.

### 3.4 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados por média aritmética e desvio padrão da média, além de tabelas de frequência. A comparação entre os grupos foi efetuada por análise não paramétrica de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, dependendo das premissas correlatas, sendo aceitos como significativos valores de  $p < 0,05$ . As análises foram conduzidas com o auxílio do pacote estatístico XLSTAT versão 5.0, desenvolvido por Rodney Carr (Universidade da Pensilvânia, EUA).

## Resumo

Os alimentos probióticos são suplementos alimentares elaborados à base de microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinado teor, afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O microrganismo para ser considerado probiótico deverá ser habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, manter a viabilidade e atividade metabólica no intestino. O quefir enquadra-se no grupo dos alimentos probióticos. O quefir tradicional é um subproduto do leite resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do quefir- conglomerado de organismos vivos- constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. Existem dois tipos de quefir: açucarado, em fermentado aquoso, e lácteo. Sua composição microbiológica é bastante variável, o que resulta em distintos perfis de bioprodutos e conseqüente ação probiótica. Este trabalho teve por objetivo isolar, quantificar e caracterizar os microrganismos presentes em amostras de quefir cultivado na cidade de Alfenas/MG. O processo de quantificação microbiana do quefir liofilizado e do quefir em suspensão e grãos foi realizado por meio de diluições decimais, plaqueadas nos meios Ágar Rogosa (AR) e De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para *Lactobacillus*, "Brain Heart Infusion" (BHI), para contagem global de bactérias, Sabouraud-

glicose(para leveduras e fungos filamentosos), Tioglicolato para *Streptococos*, *Acetobacter* e *Leuconostoc* e Ágar Água-de-Coco (AAC) e Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras (ACE), para crescimento de gêneros diversos (grão, suspensão e liofilizado). Para a identificação de gêneros e espécies foram utilizadas provas bioquímicas convencionais, além de galerias API específicas. Concluiu-se que a microbiota do quefir não é igual em todos os aspectos se comparada com a literatura disponível, existindo vários fatores que influenciam na sua composição; sendo que o quefir em estudo possui microrganismos semelhantes aos já descritos na literatura existente, apresentando também algumas particularidades ainda não descritas. O meio Ágar Água-de-Coco demonstrou um bom perfil para o crescimento de microrganismos, sendo indicado como meio de cultivo alternativo, com melhor resultado se acrescido de extrato de leveduras, que veio a enriquecer o meio e propiciar um melhor crescimento. O quefir no estado liofilizado foi o que apresentou a contagem de bactérias mais elevada, possivelmente em virtude de sua concentração.

## Abstract

**OLIVEIRA, Rafaela Bergmann Strada de.** Microbial content of kefir preparations (grains, fermented suspension and lyophilized) cultured in Alfenas/MG.. Dissertation (Master in Animal Science). UNIFENAS. Alfenas.

Probiotics are supplementary foods developed by microbial strains that improve animal health beyond the basic nutrition. Probiotics are consumed orally, despite being considered as normal inhabitant of the intestines, able to survive digestive enzymes and bile. Kefir is a probiotic made by several bacteria and yeasts encapsulated in a polysaccharide matrix, and looking like jelly grains. Kefir is also presented as a soured product both in sugary and milky suspensions, and containing vitamins, aminoacids, peptides, carbohydrates, ethanol and volatile compounds. Kefir is known to have a diverse microbial content, depending on country and fermentative substrates, what causes distinct probiotic effects. The purpose of this paper was to identify the microbial content of a native sugary kefir from Alfenas, Minas Gerais. Serial dilutions of distinct kefir sources (fermented suspension, lyophilized, grains) were plated in Rogosa agar (AR) and De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) for *Lactobacillus*, Brain Heart Infusion (BHI) for total bacteria, Sabouraud-glucose for yeast and filamentous fungi, thioglycolate for *Streptococcus*, *Acetobacteria* and *Leuconostoc*, coconut water agar (AAC) and coconut water agar supplemented with yeasts (ACE). Genus and species of all strains were identified through usual biochemical reactions and specific API systems. In general, literature recognize the existence of differences in kefir microbial contents, depending on the source of the grains, but the kefir of this study has a microbial composition similar to the one described in the literature, and also shows other microorganisms, not reported yet. The lyophilized formulation presented the great level of bacteria, probably due to its powdered nature. The data obtained with the AAC and ACE media suggested that both substrates are alternative and salutary media for culture of kefir strains.

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles que apresentam substâncias com distintas funções biológicas, denominadas componentes bioativos, capazes de modular a fisiologia do organismo, garantindo a manutenção da saúde (DÂMASO, 2001).

Existe um grupo de alimentos funcionais que merece maior atenção: os alimentos pré e probióticos. Estes estão relacionados a áreas fisiológicas bastante diferentes dos alimentos funcionais usuais (ricos em micronutrientes) e caracterizam uma amplitude de possibilidades de desenvolvimento dos mesmos (ASHWELL, 2002). Rossi (2001) considera o grupo dos probióticos muito significativo, chegando a considerá-lo como precursor dos alimentos funcionais.

Os alimentos probióticos são suplementos alimentares elaborados à base de microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinado teor, afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O microrganismo, para ser considerado probiótico, deverá ser habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, manter a viabilidade e atividade metabólica no intestino. O quefir enquadra-se no grupo dos alimentos probióticos.

Também conhecido por *kefir*, *kafir*, *kipp*, e *kefhir*, a palavra parece originar-se do vocábulo turco *kef*, que significa “estar bem”. Há controvérsias em relação a que se refere propriamente o termo. Historicamente, parece que o quefir seria um leite fermentado pelos chamados grãos ou grumos de quefir. O quefir seria fabricado predominantemente a partir do leite de cabra ou ovelha, desde tempos remotos, pelos tártaros e povos caucasianos. Tornou-se popular em vários países da Europa e é comercializado em algumas regiões da América do Norte. Na Argentina, é importante sua produção domiciliar. No Brasil, sua produção artesanal é feita essencialmente em leite de vaca (SANDOVAL, 1999; GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 1997).

O quefir tradicional é um subproduto do leite, resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do quefir- conglomerado de organismos vivos- constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. Existem dois tipos de quefir: açucarado, em fermentado aquoso, e lácteo. Zubillaga *et al.* (2001)

definem o quefir como um probiótico e descrevem os grãos de quefir como “uma associação simbiótica entre bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras”.

Os grãos de quefir e seu sobrenadante são compostos de microrganismos, polissacarídeos, moléculas aminadas, vitaminas, álcool e substâncias voláteis. Sua composição microbiológica é bastante variável, dependendo de sua origem. Os fatores que interferem nesta natureza parecem ser, principalmente, de ordem geográfica, e do substrato utilizado para proliferação dos grãos. Wszolek *et al.* (2001) discordam, afirmando que apenas o substrato diferencia a composição do fermentado de quefir, ao analisar leite de ovinos, caprinos e bovinos provenientes da Polônia e Escócia. Vale ressaltar que os autores reconhecem que pode ter havido diferenças de análises, realizadas em laboratórios dos diferentes países.

Os grãos do quefir têm uma estrutura similar aos pequenos ramos de couve-flor, e podem variar de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro. A composição química dos grãos do quefir gira em torno de 890-900 g/kg de água, 2 g/kg de lipídeos, 30 g/kg de proteínas, 60 g/kg de açúcares e 7 g/kg de cinzas(ZOURARI & ANIFANTAKIS, 1988).

A composição da microbiota dos grãos do quefir depende de sua origem. Em algumas pesquisas foram descritas a presença de *Lactobacillus* homofermentadores e heterofermentadores, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* (ÂNGULO, LOPES & LEMA, 1993).

Bottazzi & Bianchi (1980) investigaram a distribuição da microbiota do quefir. Estes sugerem que as populações encontradas não estão distribuídas aleatoriamente nos grãos. Os *Lactobacillus* encontram-se na periferia do grão. Assadi, Pourahmad & Moazami (2000) estudaram as formas de proliferação do quefir, concluindo que o crescimento do quefir é melhor quando se utiliza o próprio grão como colônia iniciadora para o seu cultivo. Os resultados do estudo também puderam concluir as diferentes características sensoriais de acordo com o seu cultivo. Com o intuito de se desenvolver um “quefir placebo” para uso em experimentos clínicos, Mainville *et al.* (2001) estudaram os métodos que poderiam inativar a microbiota do quefir. Foram utilizados os processos de autoclavagem, irradiação e uso de altas pressões. O quefir controle (sem ter passado por nenhum tratamento) obteve um registro de 8,58 UFC/g de *Lactococcus*, 8,6 UFC/g de *Lactobacillus* e 5,09 UFC/g de leveduras totais. Após a exposição à temperatura de 110 °C por 3 minutos e temperatura interna de 72 °C, ocorreu a inativação de bactérias e leveduras. A irradiação com 5 kGy e o

tratamento a alta pressão por 30 minutos inativou também as bactérias e leveduras, mas deixou as estruturas de proteínas e lipídios inalteradas.

Segundo Marshall & Cole (1985), os grãos de quefir incluem principalmente bactérias lácticas, leveduras, bactérias do ácido acético e, possivelmente, outros microrganismos. A composição total dos grãos não está elucidada completamente.

Em adição, os grãos do quefir contêm uma microbiota grande e variada, incluindo bactérias do ácido acético, ácido láctico, e leveduras, como principais componentes (ZOURAI & ANIFANTAKIS, 1988; KOROLEVA, 1988; ÂNGULO, LOPES & LEMA, 1993; PINTADO, LOPES & FERNANDES, 1996; REA *et al.*, 1996; GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 1997; KUO & LIN, 1999; LIN, CHEN & LIU, 1999, WSZOLEK *et al.*, 2001).

Garrote, Abraham & Antonini (1997) isolaram e identificaram algumas cepas da microbiota dos grãos do quefir, caracterizando ao menos duas cepas de *Lactococcus*, duas de *Lactobacillus*, duas de leveduras e um bolor.

Com mais de mil anos de consumo, os microrganismos do quefir não se mostram patogênicos e as suspensões de quefir mostram-se capazes de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; ANSELMO, 2001).

Esta investigação teve como objetivo isolar, quantificar e caracterizar os microrganismos presentes em diferentes amostras de quefir cultivado no Laboratório de Fitofármacos da Unifenas, Alfenas/Minas Gerais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), situada em Alfenas, MG. Neste trabalho, foi objeto de estudo o grão ou grumo de quefir, e a sua suspensão. Com o propósito de padronização de termos, quefir se referirá ao produto fermentado pelos grãos de quefir.

### 2.2 Procedência dos Grãos de Quefir

O quefir utilizado neste trabalho foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, do Laboratório de Fitofármacos da Unifenas, localizado no bloco das Ciências Agrárias, dentro do Campus de Alfenas.

Seu cultivo foi realizado no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas).

A liofilização de uma parte dos grãos foi feita na Universidade Federal de Lavras e as análises microbiológicas foram feitas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Unifenas, também localizado no bloco das Ciências Agrárias.

### 2.3 Métodos

#### 2.3.1 Produção do Quefir

Foram utilizados 5g de quefir cultivado em 50g de açúcar mascavo para 1L de água filtrada, através de cultivo contínuo por 15 dias, antes do início dos experimentos. Os grãos foram colocados em frascos de vidro e incubados para crescer em temperatura de 25°C

aproximadamente. Após este período, os grãos foram lavados delicadamente em água corrente, sendo a solução nutriente trocada a cada 24h.

### 2.3.2 Quefir Liofilizado

Alíquotas de 500g de grãos de quefir foram desidratadas a 37°C por 24h, congeladas em gelo seco e liofilizadas na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), situada na Universidade Federal de Lavras (UFLA).

### 2.3.3 Análise Microbiológica do Quefir e do Quefir Liofilizado

O processo de quantificação microbiana do quefir liofilizado e do quefir total (caldo e grãos) foi realizado por meio de diluições decimais, plaqueadas nos meios Ágar Rogosa (AR) e De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para *Lactobacillus*, "Brain Heart Infusion" (BHI), para contagem global de bactérias, Sabouraud–glicose (para leveduras e fungos filamentosos), Tioglicolato para *Streptococos*, *Acetobacter* e *Leuconostoc* e Ágar Água-de-Coco (AAC) e Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras (AACE), para crescimento de gêneros diversos (grão, caldo e liofilizado). Com exceção do AAC e AACE, todos os demais foram de procedência MERCK/ ALEMANHÃ.

A temperatura de incubação para bactérias foi de 35,5°C e a de fungos 25°C. O tempo de incubação variou em função do aparecimento de unidades formadoras de colônias (UFC), visíveis macroscopicamente na superfície dos meios, e/ou turvação dos caldos.

Para a identificação de gêneros e espécies, foram utilizadas provas bioquímicas convencionais, além de galerias API específicas (BioMérieux, França).

### 2.3.4 Análise Estatística

## 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Na análise dos dados desta pesquisa, todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos foram analisados por média aritmética e desvio padrão da média, além de tabelas de frequência. Comparação entre os grupos foi efetuada por análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, sendo aceitos como significativos valores de  $p < 0,05$ . As análises foram conduzidas com o auxílio do pacote estatístico XLSTAT versão 5.0, desenvolvido por Rodney Carr (Universidade da Pensilvânia, EUA).

Os resultados nas tabelas e figuras a seguir representam a média aritmética das contagens e análises realizadas nos ensaios.

Tabela 1 – Contagem média de *Lactobacillus* em Caldo e Suspensão de Quefir cultivados no meio de Rogosa incubados a 35,5°C por 72h

AMOSTRA	UFC/g
Grão	$8,5 \times 10^5$
Suspensão	$4,5 \times 10^4$

A Tabela 1 indica os valores encontrados em amostras de grãos e suspensão de quefir cultivados no meio Rogosa, que é um meio seletivo para *Lactobacillus*. Na realização do experimento, houve a tentativa de contagem também com quefir liofilizado, mas não houve o crescimento de colônias neste meio, o que poderia indicar que os *Lactobacillus* perderam a viabilidade pelo procedimento de liofilização utilizado ou a capacidade biossintética de algumas enzimas importantes para o crescimento neste meio. Corroborando esta hipótese o fato de terem sido encontradas cepas de *Lactobacillus* na formulação em suspensão de quefir (Tabela 2). A literatura reporta algumas cepas isoladas de amostras de quefir.

Marshall, Cole & Farrow (1984) isolaram dos grãos de quefir a bactéria *Lactobacillus desidiosus*. Esta bactéria fermenta especificamente L-arabinose e gluconato. Marquina *et al.* (2002) detectaram as bactérias *Lactococcus brevis* e *Lactobacillus paracasei*. Takizawa *et al.* (1998) encontraram 120 cepas do gênero *Lactobacillus* a partir de grãos de quefir. Esses autores colocaram-nas em quatro grupos, sendo *Lactobacillus kefirgranum* — que representou 49% das cepas —, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, e *Lactobacillus parakefir*. Estes dados indicam que os gêneros *Lactobacillus* e *Leuconostoc* predominam em isolados de quefir, o que foi constatado no presente trabalho.

Em pesquisa feita por Wszolek *et al.* (2001), compararam-se as características do quefir cultivado na Escócia e na Polônia, ambos em substrato de leite de vaca, cabra e ovelha. Estudaram-se as características microbiológicas e as propriedades sensoriais. Utilizou-se a solução salina e a liofilização para a conservação dos grãos de quefir. A qualidade microbiológica foi considerada boa, predominando bactérias do ácido láctico e leveduras. O tipo de colônia iniciadora e o período de armazenamento afetaram as

propriedades sensoriais, principalmente no quesito viscosidade (vaca e ovelha foram os mais viscosos). Em seis amostras de quefir provenientes do Iraque, após a fermentação dos grãos, encontrou-se uma contagem global de bactérias de  $10^9$  / g para *Lactococcus*,  $10^8$  / g para *Leuconostoc*,  $5 \times 10^5$  / g para *Lactobacillus*,  $10^5$  / g para bactérias do ácido acético e  $10^5$  para leveduras (REA *et al.*, 1995).

Ângulo, Lopes & Lema (1993) estudaram amostras de quefir obtidas de produtos lácteos de oito fontes domiciliares da região da Galícia, noroeste da Espanha. As bactérias encontradas foram *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fermentus*, *Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus*, *Lactobacillus casei* ssp. *tolerans*, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Leuconostoc* ssp., *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Dentre as leveduras, foram identificadas *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir*, *Candida friedrichii*, *Kluyveromyces lactis*, e *Pichia fermentans*. Outrossim, esses autores relatam que houve diferenças importantes na composição dos grãos entre cada uma das oito fontes, e atribuem o fato à diversidade da procedência das amostras, entre outros fatores.

Nas Tabelas 2 e 3 estão representadas algumas cepas microbianas encontradas nas diversas apresentações do quefir (suspensão, grão e liofilizado).

Tabela 2 - Isolamento, identificação e quantificação de bactérias facultativas presentes nos grãos do quefir, na suspensão e no quefir liofilizado cultivados em Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras a 35,5°C.

IDENTIFICAÇÃO	AMOSTRA	INÓCULO
Leuconostoc ssp	suspensão $10^5$	Superfície
Lactobacillus lactis cremoris	suspensão $10^5$	Superfície
Chryseomonas luteola	liofilizado $10^2$	Profundidade
	liofilizado $10^3$	Profundidade
	grão $10^5$	Superfície
	suspensão $10^5$	Superfície
	liofilizado $10^2$	Superfície
Acetobacter	suspensão $10^1$	Superfície

Na presente investigação foram encontrados microrganismos não usuais (*Lactobacillus lactis cremoris*, *Chryseomonas luteola*, *Candida colliculosa*, *Candida magnoliae*, *Kloekera spp* e *Candida famata*), o que demonstra uma grande diversidade microbiana em amostras de quefir de procedências diferentes.

Em relação a isso, Pidoux *et al* (1990) isolaram microrganismos até então desconhecidos como componentes do quefir, identificando cada uma de suas funções. As bactérias encontradas foram *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, altamente envolvidas com a produção de lactato; e *Lactobacillus hilgardii*, envolvida na produção de arabinose e polissacarídeos a partir de sacarose. Seus estudos foram realizados com fermentados de açúcar. No presente trabalho foi utilizado o açúcar mascavo como substrato para o crescimento de quefir, embora não tenha sido isolado nenhum microrganismo semelhante aos do estudo de Pidoux *et. al.* (1990). Entretanto, Leroi & Courcoux (1996) também isolaram cepas menos comuns do quefir mantido em água açucarada: *Lactobacillus hilgardii* e *Saccharomyces florentinus*.

Tabela 3 - Leveduras isoladas e identificadas em amostras de quefir em grãos, suspensão e liofilizado cultivadas em Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras e Ágar Água-de-Coco a 35,5°C.

IDENTIFICAÇÃO	MEIO	AMOSTRA
Sacharomyces cerevisae	AACE <sup>1</sup>	Suspensão 10 <sup>5</sup> *
	AACE	Grão 10 <sup>5</sup>
	AAC <sup>2</sup>	Grão 10 <sup>5</sup>
Candida colliculosa	AAC	Suspensão 10 <sup>3</sup>
Toruspola delbruechii	AAC	Suspensão 10 <sup>3</sup>
Candida inconspícua	AACE	Grão 10 <sup>5</sup>
	AAC	Grão 10 <sup>5</sup>
	AACE	Liofilizado 10 <sup>2</sup>
Candida magnoliae	AACE	Suspensão 10 <sup>5</sup>
Kloekera sp	AACE	Liofilizado 10 <sup>2</sup>
	AAC	Grão 10 <sup>4</sup>
Candida famata	AACE	Liofilizado 10 <sup>2</sup>
Kluyveromices lactis	AACE	Suspensão 10 <sup>5</sup>
Kluyveromices marxianus	AACE	Suspensão 10 <sup>5</sup>
Candida quefir	AACE	Suspensão 10 <sup>5</sup>

1 Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras

2 Ágar Água-de-Coco

\* Os expoentes referem-se aos níveis de diluição das amostras

A Tabela 3 apresenta as leveduras encontradas em suspensão, grãos e quefir liofilizado.

Observando-se as tabelas 2 e 3, constata-se que o Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras propiciou o crescimento de bactérias e leveduras, ao contrário do meio Ágar

Água-de-Coco, no qual cresceram apenas leveduras não sendo detectado o crescimento de nenhuma bactéria.

Na composição microbiológica do quefir cultivado em residências de Formosa, no Japão, encontrou-se *Lactobacillus helveticus* e *Leuconostoc mesenteroides*, como bactérias, e *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia fermentans*, como leveduras, segundo Lin, Chen & Liu (1999). Destaca-se, neste estudo, o *Lactobacillus helveticus* como a bactéria com a maior taxa de crescimento e o *Kluyveromyces marxianus* como a levedura que mais produz ácido láctico e etanol. A levedura *Pichia fermentans* foi classificada como lactose negativa e não fermentadora da lactose, o que indica ser necessária a presença de enzimas proteolíticas para o seu crescimento no leite. No trabalho em estudo, obteve-se em comum a levedura *Kluyveromyces marxianus*, que foi identificada, proveniente de caldo de quefir no Ágar Água-de-Coco com Extrato de Levedura, além da bactéria *Leuconostoc ssp.* Em relação aos resultados apresentados, não se contemplou a pesquisa de sub-produtos. Entretanto, é possível que os microrganismos isolados produzam os mesmos produtos finais, uma vez que o odor e o sabor do fermentado são semelhantes às propriedades sensoriais acre etanólica.

A análise dos resultados expostos na Tabela 4 indicam, que o método utilizado e o tipo de extrato não afetaram a contagem de células entre as amostras de grão e suspensão e que não houve diferença significativa entre o método de plaqueamento, o meio de cultivo e o crescimento em grão e suspensão das amostras analisadas (Mann Whitney,  $p < 0,05$ ), com exceção para o grupo de quefir liofilizado, onde se observam baixas contagens. Estes dados confirmam aqueles obtidos anteriormente.

Tabela 4 - Contagem média global de bactérias facultativas no meio Água-de-Coco e Água-de-Coco com Extrato de Leveduras em amostras de quefir em grãos, suspensão e liofilizado.

---

**AAC**

**AACE**

---

	Profundidade	Superfície	Profundidade	Superfície
Liofilizado	$1,4 \times 10^2$	$3 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$
Grão	$3,3 \times 10^5$	$2,4 \times 10^4$	$6,7 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
Suspensão	$1,4 \times 10^4$	$4,6 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$4,5 \times 10^5$

Garrote, Abraham & Antonini (1997) encontraram, em grãos obtidos em ambientes domiciliares argentinos, bactérias, leveduras e fungos filamentosos. As bactérias encontradas, em número de quatro, foram *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*; *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*; um bacilo homofermentativo podendo ser *Lactobacillus kefiranofaciens* — também isolado por Arihara, Toba & Adachi (1990) — ou *Lactobacillus kefirgranum*; e um bacilo heterofermentativo que poderia ser *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* — também isolado por Arihara, Toba & Adachi (1990) —, ou *Lactobacillus parakefir*. As leveduras encontradas foram as não fermentadoras de lactose *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces lipolytic*. O fungo foi caracterizado como *Geotrichum candidum*. Os resultados indicaram uma composição centesimal dos grãos de quefir de 0,9 % ( $1,64 \times 10^7$  UFC/g) de *Lactococci*, 78,3 % ( $159,00 \times 10^7$  UFC/g) de *Lactobacilli*, e 20,8 % ( $42,30 \times 10^7$  UFC/g) de leveduras. Estas bactérias tiveram suas colônias ligeiramente aumentadas no leite fermentado, enquanto a quantidade de leveduras diminuiu. Os autores concluíram que a composição microbiológica do leite fermentado com grão de quefir é a mesma dos grãos propriamente ditos, exceto pelo *Lactobacillus kefir*, que não foi detectado após a fermentação. Posteriormente, os mesmos autores (GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 2001) isolaram *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter* e *Saccharomyces*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus parakefir* e *Kluyveromyces marxianus*. No entanto, houve diferenças qualitativas entre as quatro fontes de amostra estudadas, todas argentinas. Os dados da presente investigação aproximam-se muito dos resultados dos autores citados acima com relação às bactérias e leveduras isoladas.

## 4 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

1. A contagem média total de *Lactobacillus* do grão de quefir foi de  $8,5 \times 10^5$  UFC/g e, na suspensão de quefir, de  $4,5 \times 10^4$  UFC/g, sendo isolado o *Lactobacillus lactis cremoris*;
2. Nas análises microbiológicas foram encontradas as seguintes bactérias e leveduras, respectivamente: *Leuconostoc* ssp, *Lactobacillus lactis cremoris*, *Chysemonas luteola*, *Acetobacter* e *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspola delbruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloekera* sp, *Candida famata*, *Kluyveromices lactis*, *Kluyveromices marxianus* , *Cândida quefir*.
3. A microbiota do quefir não é igual em todos os aspectos se comparada com a literatura disponível, existindo vários fatores que influenciam na sua composição, como, por exemplo, a fonte de grãos iniciadores ser de açúcar mascavo ou de leite, o clima, a sua origem e o seu manuseio.
4. O quefir cultivado no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos é semelhante aos já descritos na literatura no que tange os microrganismos nele presentes e apresentou algumas particularidades que ainda não foram descritas. Foram isolados e identificados microrganismos em número elevado em relação aos dados da literatura.
5. O Ágar Água-de-Coco demonstrou ser um bom meio para o crescimento de microrganismos, sendo indicado como meio de cultivo alternativo, ainda mais se acrescido de extrato de leveduras, que enriquece o meio e propicia um melhor crescimento.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂNGULO, L., LOPEZ, E., LEMA, C. Microflora present in Kefir grains of the galician region (North west of Spain). **Journal of Dairy Research**, v.60, p.263-267, 1993.

ANSELMO, R.J., VITORA, S.S., LAUSADA, L.I.. Effect of Kefir bactericide on Salmonella spp.. **Informacion Tecnologica**, v. 12, n. 5, p. 91-95, 2001.

ARIHARA, K.; TOBA, T.; ADACHI, S. Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, São Francisco, v. 11, n. 2, p. 127-134, out. 1990.

ASHWELL, M. **Concepts of functional foods**. Washington: ILSI Press, 2002. 45 p.

ASSADI, M.M., POURAHMAD, R., MOAZAMI, R.. Use of isolated Kefir starter cultures in Kefir production. **World Journal of microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 541-543, 2000.

BOTTAZZI, V., BIANCHI, F. A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. **Journal of Applied Bacteriology**, v.48, p.265-268, 1980.

DÂMASO, A. **Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças**. Rio de Janeiro: Thex, 2001. p.335-362.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Zurique, v. 30, n. 1, p. 77-84, fev. 1997.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONINI, G. L. de. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 4, p. 639-652, nov. 2001.

KOROLEVA, N.S. Technology of kefir and Kumys. **IDF Bull**, v. 227, p.96-100. 1988

KUO, C. Y.; LIN, C. W. Taiwanese kefir grains: Their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 19-23, abr. 1999.

LEROI, F.; COURCOUX, P. Influence of pH, temperature and initial yeast:bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 2, p. 138-146, fev. 1996.

LIN, C. W.; CHEN, H. L.; LIU, J. R. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 14-18, abr. 1999.

MAINVILLE, I., MONTPETIT, D., DURAND, N., FARNWORTH, E.R.. Deactivating the bacteria and yeast in Kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1 e 2, p. 45-49, 2001.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; CORPAS, I.; MUÑOZ, J.; ZAZO, J.; PEINADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 136, ago. 2002.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; FARROW, J. A. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 3, p. 503-508, jun. 1984.

MARSHALL, V.M., COLE,W.M. Methods for making Kefir and fermented milks based on Kefir. **Journal of dairy Research**, v.52, p.451-456,1985.

PIDOUX, M.; MARSHALL, V. M.; ZANONI, P.; BROOKER, B. *Lactobacilli* isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 3, p. 311-320, set. 1990.

PINTADO, M.E.; LOPES, J.A.S.; FERNANDES,P.B.M..Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains. **International Journal of Food science e Technology**, v. 31, n. 1, p. 15-26, 1996.

REA, M.C., LENNARTSSON, T., DILLON, P., DRINAN, F.D., REVILLE, W.J., HEAPES, M., COGAN, T.M.. Irish Kefir like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 1, p. 83-94, 1996.

ROSSI, E. A. Alimentos funcionais. In: DÂMASO, Ana (Coord.). **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 335-362.

SANDOVAL, L. A. **Leites fermentados**: yougurte, quefir e coalhada. São Paulo, SP:[s.n.], 1999. 12p.

TAKIZAWA, S.; KOJIMA, S.; TAMURA, S.; FUJINAGA, S.; BENNO, Y.; NAKASE, The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 121-127, 1998.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

ZOURARI, A., ANIFANTAKIS, E. M. L<sup>ê</sup> Kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. **Technologie de production**, v.68, p.373-392, 1988.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, mar. 2001.

## ARTIGO 02

### Análise Microbiológica de Rações para Coelhos contendo Quefir em Grãos, Suspensão e Liofilizado e pesquisa de Coliformes

#### Resumo

Os alimentos probióticos são suplementos alimentares elaborados à base de microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinado teor, afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O quefir enquadra-se no grupo dos alimentos probióticos. O quefir tradicional é um subproduto do leite, resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do quefir-conglomerado de organismos vivos-constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. Existem dois tipos de quefir: açucarado, em fermentado aquoso, e lácteo. A carne de coelho é considerada um alimento de excelente qualidade para o ser humano. Por ser um alimento de origem animal, classifica-se como uma confiável fonte protéica. Pelo mesmo motivo, é fonte de micronutrientes importantes e críticos para a saúde coletiva, tais como o ferro, magnésio, cobre, entre outros. A cunicultura brasileira vem crescendo e, cada vez mais, torna-se relevante no âmbito econômico. Do ponto de vista experimental, coelhos são considerados boas cobaias por apresentarem semelhanças fisiológicas com humanos. Este trabalho teve por objetivo isolar, quantificar e caracterizar os microrganismos presentes em rações para coelhos adicionadas de quefir em grãos, suspensão e liofilizado. O processo de quantificação microbiana do quefir liofilizado, da suspensão e grãos foi realizado por meio de diluições decimais, plaqueadas nos meios Ágar Rogosa (AR) e De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para *Lactobacillus*, "Brain Heart Infusion" (BHI), para contagem global de bactérias, Sabouraud-glicose (para leveduras e fungos filamentosos), Tioglicolato para *Streptococos*, *Acetobacter* e *Leuconostoc* e Ágar Água-de-Coco (AAC) e Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras (AACE), para crescimento de gêneros diversos (grão, suspensão e liofilizado). Após a análise dos resultados obtidos, não foi possível isolar nenhum microrganismo, comumente presente no quefir, com a metodologia utilizada.

## Abstract

**OLIVEIRA, Rafaela Bergmann Strada de...** Microbial analysis of rabbit foodstuffs supplemented with kefir (grains, suspension, lyophilized). Dissertation (Master in Animal Science). UNIFENAS. Alfenas

Probiotics are supplementary foods developed by microbial strains that improve animal health beyond the basic nutrition. Probiotics are consumed orally, despite being considered as normal inhabitant of the intestines, able to survive digestive enzymes and bile. Kefir is a probiotic made by several bacteria and yeasts encapsulated in a polysaccharide matrix, and looking like jelly grains. Kefir is also presented as a soured product both in sugary and milky suspensions, and containing vitamins, aminoacids, peptides, carbohydrates, ethanol and volatile compounds. Kefir is known to have a diverse microbial content, depending on country and fermentative substrates, what causes distinct probiotic effects. The rabbit flesh is considered to enhance human health as it has a high level of proteins and also microelements as iron, magnesium, and copper. Moreover, rabbits are considered a conventional model for nutrition studies aiming at health improvement. In this paper we analyzed kefir formulations added to commercial food pellets normally given to rabbits. Serial dilutions of distinct kefir sources (fermented suspension, lyophilized, grains) were mixed to food pellets and plated in Rogosa agar (AR) and De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) for *Lactobacillus*, Brain Heart Infusion (BHI) for total bacteria, Sabouraud-glucose for yeast and filamentous fungi, thioglycolate for *Streptococcus*, *Acetobacteria* and *Leuconostoc*, coconut water agar (AAC) and coconut water agar supplemented with yeasts (AACE). In pellet analysis, plating with Mitis Salivarius agar (*Streptococcus*), EMB35°C (total enterobacteria) and EMB45°C (fecal enterobacteria) were also used. Genus and species of all strains were identified through usual biochemical reactions and specific API systems. The methodology used in this study was not able to identify any microorganism in the kefir samples.

## 1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais são aqueles que apresentam substâncias com distintas funções biológicas, denominadas componentes bioativos, capazes de modular a fisiologia do organismo, garantindo a manutenção da saúde (DÂMASO, 2001).

Existe um grupo de alimentos funcionais que merece maior atenção: os alimentos pré e probióticos. Estes estão relacionados a áreas fisiológicas bastante diferentes dos alimentos funcionais usuais (ricos em micronutrientes) e caracterizam uma amplitude de possibilidades de desenvolvimento dos mesmos (ASHWELL, 2002). Rossi (2001) considera o grupo dos probióticos muito significativo, chegando a considerá-lo como precursor dos alimentos funcionais.

Os alimentos probióticos são suplementos alimentares elaborados à base de microrganismos vivos que, quando ingeridos em determinado teor, afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo um balanço da microbiota intestinal. O microrganismo, para ser considerado probiótico, deverá ser habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago, manter a viabilidade e atividade metabólica no intestino. O quefir enquadra-se no grupo dos alimentos probióticos.

Também conhecido por *kefir*, *kafir*, *kipp*, e *kefhir*, a palavra parece originar-se do vocábulo turco *kef*, que significa “estar bem”. Entretanto, há controvérsias em relação a que se refere propriamente, o termo. Historicamente, parece que o quefir seria um leite fermentado pelos chamados grãos ou grumos de quefir, sendo o mesmo fabricado, predominantemente, a partir do leite de cabra ou ovelha, desde tempos remotos, pelos tártaros e povos caucasianos. Tornou-se popular em vários países da Europa e é comercializado em algumas regiões da América do Norte. Na Argentina, é importante sua produção domiciliar. No Brasil, sua produção artesanal é feita essencialmente em leite de vaca (SANDOVAL, 1999; GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 1997).

O quefir tradicional é um subproduto do leite, resultante de dupla fermentação, alcoólica e láctica, proporcionada pelos grãos do quefir-conglomerado de organismos vivos-constituindo microecossistemas, apresentando complexos processos simbióticos. Existem dois tipos de quefir: açucarado, em fermentado aquoso, e lácteo.

Zubillaga *et al.* (2001) definem o quefir como um probiótico e descrevem os grãos de quefir como “uma associação simbiótica entre bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras”.

Os grãos de quefir e seu sobrenadante são compostos de microrganismos, polissacarídeos, moléculas aminadas, vitaminas, álcool e substâncias voláteis. Sua composição microbiológica é bastante variável, dependendo de sua origem. Os fatores que interferem nesta natureza parecem ser, principalmente, de ordem geográfica, e do substrato utilizado para proliferação dos grãos. Wszolek *et al.* (2001) discordam, afirmando que apenas o substrato diferencia a composição do fermentado de quefir, ao analisar leite de ovinos, caprinos e bovinos provenientes da Polônia e Escócia. Vale ressaltar que, esses autores reconhecem que podem ter havido diferenças de análises, realizadas em laboratórios dos diferentes países.

Os grãos do quefir têm uma estrutura similar aos pequenos ramos de couve-flor, e podem variar de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro. A composição química dos grãos do quefir gira em torno de 890-900 g/ Kg de água, 2 g/Kg de lipídeos, 30 g/Kg de proteínas, 60 g/Kg de açúcares e 7 g/Kg de cinzas(ZOURARI & ANIFANTAKIS, 1988).

A composição da microbiota dos grãos do quefir depende de sua origem. Em algumas pesquisas foram descritas a presença de *Lactobacillus* homofermentadores e heterofermentadores, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Acetobacter* (ÂNGULO, LOPEZ & LEMA, 1993).

Bottazzi & Bianchi (1980) investigaram a distribuição da microbiota do quefir, sugerindo que as populações encontradas não estão distribuídas aleatoriamente nos grãos. Os *Lactobacillus* encontram-se, predominantemente, na periferia dos grãos. Assadi, Pourahmad & Moazami (2000) estudaram as formas de proliferação do quefir, concluindo que o crescimento microbiano é melhor quando se utiliza o próprio grão como colônia iniciadora para o seu cultivo. Os resultados deste estudo também puderam concluir as diferentes características sensoriais, de acordo com o seu cultivo. Com o intuito de se desenvolver um “quefir placebo” para uso em experimentos clínicos, Mainville *et al.* (2001) estudaram os métodos que poderiam inativar a microbiota do quefir. Foram utilizados os processos de autoclavagem, irradiação e uso de altas pressões. O quefir controle (sem ter passado por nenhum tratamento) obteve um registro de 8,58 UFC/g de *Lactococcus*, 8,6 UFC/g de *Lactobacillus* e 5,09 UFC/g de leveduras totais. Após a exposição à temperatura de 110 °C por 3 minutos e temperatura interna de 72 °C, ocorreu a inativação de bactérias e

leveduras. A irradiação com 5 kGy e o tratamento a alta pressão por 30 minutos inativou também as bactérias e leveduras, mas deixou as estruturas de proteínas e lipídios inalteradas.

Segundo Marshall & Cole (1985), os grãos de quefir incluem principalmente bactérias lácticas, leveduras, bactérias do ácido acético e, possivelmente, outros microrganismos. A composição total dos grãos não está elucidada completamente.

Em adição, os grãos do quefir contêm uma microbiota grande e variada, incluindo bactérias do ácido acético, ácido láctico, e leveduras, como principais componentes (ZOURAI & ANIFANTAKIS, 1988; KOROLEVA, 1988; ÂNGULO, LOPES & LEMA, 1993; PINTADO, LOPES & FERNANDES, 1996; REA *et al.*, 1996; GARROTE, ABRAHAM & ANTONINI, 1997; KUO & LIN, 1999; LIN, CHEN & LIU, 1999, WSZOLEK *et al.*, 2001).

Garrote, Abraham & Antonini (1997) isolaram e identificaram algumas cepas da microbiota dos grãos do quefir, caracterizando ao menos duas cepas de *Lactococcus*, duas de *Lactobacillus*, duas de leveduras e um bolor ou mofo.

Com mais de mil anos de consumo, os microrganismos do quefir não se mostram patogênicos e as suspensões de quefir mostram-se capazes de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; ANSELMO, 2001).

A carne de coelho é considerada um alimento de excelente qualidade para o ser humano. Por ser um alimento de origem animal, classifica-se como uma confiável fonte protéica. Pelo mesmo motivo, é fonte de micronutrientes importantes e críticos para a saúde coletiva, tais como o ferro, magnésio, cobre, entre outros. Por ser ingerida quase sempre em preparações salgadas, oferece indiretamente aporte de iodo, elemento de alta relevância, por prevenir o bócio endêmico. Além disso, é uma fonte protéica de baixo teor de lipídios totais e colesterol (FRANCO, 1999).

Há mais de uma centena de raças de coelhos, sendo que 5 ou 6 apresentam interesse comercial. Existem três classes de raças: gigantes, grandes ou pesadas; médias ou normais; e pequenas.

A cunicultura brasileira vem crescendo e, cada vez mais, torna-se relevante no âmbito econômico. Por sua facilidade de manuseio, pequenos empreendedores vêm aderindo a este tipo de criação. Além da carne, diversos outros produtos de valor comercial são aproveitados do coelho.

Sob o ponto de vista experimental, os coelhos são considerados boas cobaias por apresentarem semelhanças fisiológicas com humanos. Outrossim, sua reprodução facilita a obtenção de grandes quantidades de material de estudo em pequenos espaços de tempo.

Esta investigação teve como objetivo isolar, quantificar e caracterizar os microrganismos presentes em diferentes amostras de ração para coelhos adicionadas de quefir em grãos, suspensão e liofilizado, com o intuito de implementar estudos futuros sobre a possibilidade de melhoria das rações, acrescentando-se o quefir como complemento nutricional.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas), situada em Alfenas, MG. Neste trabalho, foi objeto de estudo o quefir, em grãos ou grumos, e a sua suspensão. Com o propósito de padronização de termos, quefir se referirá ao produto fermentado pelos grãos de quefir.

### 2.2 Procedência dos Grãos de Quefir

O quefir utilizado neste trabalho foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva, do Laboratório de Fitofármacos da Unifenas, dentro do Campus de Alfenas.

Seu cultivo foi realizado no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas).

A liofilização de uma parte dos grãos foi feita na Universidade Federal de Lavras e as análises microbiológicas foram feitas no Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismos da Unifenas, também localizado no bloco das Ciências Agrárias.

### 2.3 Métodos

#### 2.3.1 Produção do Quefir

Foram utilizados 5g de quefir cultivados em 50g de açúcar mascavo para 1L de água filtrada, através de cultivo contínuo por 15 dias, antes do início dos experimentos. Os grãos foram colocados em frascos de vidro e incubados em temperatura de 25°C aproximadamente. Após este período, os grãos foram lavados delicadamente em água corrente, sendo a solução nutriente trocada a cada 24h.

### 2.3.2 Quefir Liofilizado

Alíquotas de 500g de grãos de quefir foram desidratadas a 37°C por 24h, congeladas em gelo seco e liofilizadas na Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais(EPAMIG), situada na Universidade Federal de Lavras(UFLA).

### 2.3.3 Rações com Quefir

As rações foram elaboradas no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade José do Rosário Vellano, variando-se a formulação de quefir liofilizado (0,5g), suspensão do quefir (caldo, 8mL) e quefir em grãos (4g) para cada 100g de ração. Além do quefir, as rações eram compostas de 100g de pó de ração comercial para coelhos (Labina, PURINA), 0,5g de cloreto de sódio e 50mL de água destilada (exceção feita à ração com suspensão do quefir em que foram adicionados 42mL de água destilada). Estas foram misturadas com o auxílio de colher de aço inox em cubas de etileno. Após a mistura, as rações foram peletizadas em moedor de carne e colocadas em estufa a 45 °C por 24h.

### 2.3.4 Análise Microbiológica do Quefir e do Quefir Liofilizado

O processo de quantificação microbiana do quefir liofilizado e do quefir total (caldo e grãos) foi realizado por meio de diluições decimais, plaqueadas nos meios Ágar Rogosa (AR) e De Man, Rogosa e Sharpe (MRS), para *Lactobacillus*, "Brain Heart Infusion" (BHI), para contagem global de bactérias, Sabouraud–glicose(para leveduras e fungos filamentosos), Tioglicolato para *Streptococos*, *Acetobacter* e *Leuconostoc* e Ágar Água-de-Coco (AAC) e Ágar Água-de-Coco com Extrato de Leveduras (AACE), para crescimento de gêneros diversos (grão, caldo e liofilizado). Com exceção do AAC e AACE, todos os demais meios foram de procedência da MERCK/ALEMANHA.

A temperatura de incubação para bactérias foi de 35,5°C e, para fungos, de 25°C. O tempo de incubação variou em função do aparecimento de unidades formadoras de colônias (UFC) visíveis macroscopicamente na superfície dos meios e/ou turbidez dos caldos.

### 2.3.5 Análise de Dados

Os dados obtidos do experimento realizado em triplicata foram analisados por média aritmética e desvio padrão da média, além de tabelas de frequência. Comparação entre os grupos foi efetuada por análise não paramétrica de Mann-Whitney, sendo aceitos como significativos valores de  $p < 0,05$ . As análises foram conduzidas com o auxílio do pacote estatístico XLSTAT versão 5.0, desenvolvido por Rodney Carr (Universidade da Pensilvânia, EUA). As análises foram conduzidas com o auxílio do pacote estatístico XLSTAT versão 5.0, desenvolvido por Rodney Carr (Universidade da Pensilvânia, EUA).

### 3 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados observados nas tabelas e figuras a seguir representam a média aritmética das contagens e análises realizadas nos ensaios.

Tabela 1 – Contagem média de bactérias mesófilas facultativas heterotróficas no quefir em diferentes apresentações adicionado a rações modificadas (grãos, suspensão, liofilizado) e ração controle, cultivados em BHI a 35,5°C por 72h.

<b>Amostras de ração adicionada de</b>	<b>UFC/g</b>
Quefir liofilizado	$9 \times 10^5$
Quefir em suspensão	$7 \times 10^5$
Quefir em grão	$4,1 \times 10^5$
Ração controle	$3,4 \times 10^5$

A Tabela 1 mostra a contagem global de bactérias facultativas cultivadas no meio BHI, sendo este um meio rico capaz de proporcionar o crescimento de bactérias diversas, pertencentes a vários gêneros ou espécies. Observa-se que no quefir liofilizado a densidade populacional foi superior às demais, o que poderia ser explicado pelo maior teor das bactérias num material liofilizado e, por consequência, mais concentrado.

Tabela 2 – Identificação de coliformes totais (meio EMB35°C) e fecais (meio EMB 45°C) em amostras de rações suplementadas com quefir em grãos, suspensão, liofilizado e ração **controle**.

\*amostra com presença de coliformes

<b>AMOSTRA</b>	<b>DILUIÇÃO</b>	<b>EMB 45°C</b>	<b>BEM 35°C</b>
Ração com quefir em grãos	10 <sup>-2</sup>	+ *	+
	10 <sup>-3</sup>	+	+
	10 <sup>-4</sup>	- **	-
	10 <sup>-5</sup>	-	-
Ração com quefir em suspensão	10 <sup>-2</sup>	+	+
	10 <sup>-3</sup>	+	+
	10 <sup>-4</sup>	-	-
	10 <sup>-5</sup>	-	-
Ração com quefir liofilizado	10 <sup>-2</sup>	+	+
	10 <sup>-3</sup>	+	+
	10 <sup>-4</sup>	-	+
	10 <sup>-5</sup>	-	-
Ração controle	10 <sup>-2</sup>	+	+
	10 <sup>-3</sup>	+	+
	10 <sup>-4</sup>	-	-
	10 <sup>-5</sup>	-	-

\*\*amostra com ausência de coliformes

A análise de frequência dos dados da tabela 2 indicam que não houve diferença significativa entre os grupos testados.

Após a realização das demais análises microbiológicas, não foi possível o isolamento e a identificação de nenhum microrganismo, comumente presente no quefir, nas diversas formulações de ração. Este resultado pode ter ocorrido em virtude da metodologia empregada ser pioneira para quefir, em função do tratamento térmico empregado na ração, em consequência do próprio quefir não se estabilizar em formulações, tais como ração animal e, ainda, pela presença de antibióticos na ração, o que poderia ter inativado os microrganismos.

#### 4 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos no presente trabalho, concluiu-se que não foi possível isolar os microrganismos comumente presentes no quefir, nas diversas formulações de ração elaboradas. Entretanto, foi possível a contagem global de bactérias facultativas e a análise de coliformes fecais e totais. O quefir no estado liofilizado foi o que apresentou a contagem de bactérias mais elevada, possivelmente em virtude de seu teor. Sugerem-se estudos mais avançados, em vista do quefir ser considerado um probiótico, além de estudos relacionados com a composição centesimal da carne de coelhos, quando tratados com ração associada a quefir.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂNGULO,L., LOPEZ,E., LEMA,C. Microflora present in Kefir grains of the galician region(North west of Spain). **Journal of Dairy Research**, v.60, p.263-267, 1993.

ANSELMO, R.J., VITORA, S.S., LAUSADA, L.I.. Effect of Kefir bactericide on Salmonella spp.. **Informacion Tecnologica**, v. 12, n. 5, p. 91-95, 2001.

ASHWELL, M. **Concepts of functional foods**. Washington: ILSI Press, 2002. 45 p.

ASSADI, M.M., POURAHMAD, R., MOAZAMI, R.. Use of isolated Kefir starter cultures in Kefir production. **World Journal of microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 541-543, 2000.

BOTTAZZI, V., BIANCHI, F. A note on scanning electron microscopy of microorganisms associated with the kefir granule. **Journal of Applied Bacteriology**, v.48, p.265-268,1980.

DÂMASO, A. **Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças**. Rio de Janeiro: Thex, 2001.p.335-362.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 307.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Zurique, v. 30, n. 1, p. 77-84, fev. 1997.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONINI, G. L. de. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 4, p. 639-652, nov. 2001.

KOROLEVA, N.S. Technology of kefir and Kumys. **IDF Bull.** v.227, p.96-100. 1988

KUO, C. Y.; LIN, C. W. Taiwanese kefir grains: Their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 19-23, abr. 1999.

LIN, C. W.; CHEN, H. L.; LIU, J. R. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 14-18, abr. 1999.

MAINVILLE, I., MONTPETIT, D., DURAND, N., FARNWORTH, E.R.. Deactivating the bacteria and yeast in Kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1 e 2, p. 45-49, 2001.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; FARROW, J. A. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 3, p. 503-508, jun. 1984.

MARSHALL, V.M., COLE, W.M. Methods for making Kefir and fermented milks based on Kefir. **Journal of dairy Research**, v.52, p.451-456, 1985.

PINTADO, M.E.; LOPES, J.A.S.; FERNANDES, P.B.M.. Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains. **International Journal of Food science e Technology**, v. 31, n. 1, p. 15-26, 1996.

ROSSI, E. A. Alimentos funcionais. In: DÂMASO, A. (Coord.). **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 335-362.

SANDOVAL, L. A. **Leites fermentados**: yogurte, quefir e coalhada. São Paulo, SP:[s.n.], 1999.12p.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

ZOURARI, A., ANIFANTAKIS, E. M. Lè Kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. **Technologie de production**, v. 68, p.373-392, 1988.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, mar. 2001.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. de; Characterization of kefir grains grown in cow's milk and in soya milk. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 66, n. 2, p. 327-333, maio 1999.

ANDRIGUETTO, J. M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; FLEMMING, J. S.; VINNE, J. U.; FLEMMING, R.; SOUZA, G. A.; ANDRIGUETTO, J. L.; DUTRA, M. J.; SEIFERT, C. R. **Normas e padrões de nutrição e alimentação animal: revisão 92**. Curitiba: Nutrição Editora e Publicitária Ltda, 1992.

ÂNGULO,L., LOPEZ,E., LEMA,C. Microflora present in Kefir grains of the galician region(North west of Spain). **Journal of Dairy Research**, 60, 263-267, 1993.

ANSELMO, R.J., VITORA, S.S., LAUSADA, L.I.. Effect of Kefir bactericide on Salmonella spp.. **Informacion Tecnologica**, v. 12, n. 5, p. 91-95, 2001.

ARIHARA, K.; TOBA, T.; ADACHI, S. Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, São Francisco, v. 11, n. 2, p. 127-134, out. 1990.

ASHWELL, M. **Concepts of functional foods**. Washington: ILSI Press, 2002. 45 p.

ASSADI, M.M., POURAHMAD, R., MOAZAMI, R.. Use of isolated Kefir starter cultures in Kefir production. **World Journal of microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 541-543, 2000.

BELICKOVA, E.; TRACIKOVA, L., NAAS, H.T., VARGOVA, M., ONDRASOVIC, M., ONDRASOVICOVA, O., OBSITNIKOVA,D.. Staphylococci plate counts in foods of milk origin. **Veterinarni Medicina**, v. 46, n. 1, p. 24-27, 2001.

BOTTAZZI, V., BIANCHI, F. A note on scanning electron microscopy of micro-organisms associated with the kefir granule. **Journal of Applied Bacteriology**, v.48, p.265-268,1980.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 15, de 30 de abril de 1999. Institui a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mai. 1999a. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_99.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 dez. 1999b. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/18\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/18_99.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 dez. 1999c. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19_99.htm)>. Acesso em: 15 jun. 2004.

CARDOSO, R.C.; SILVA, A. R.; UCHOA, D.C.; SILVA, D.M. Criopreservação de sêmen canino com um diluidor à base de água de coco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n. 4, págs, jul/ago.2002.

CHIN, W. L., HASLAO, L. C., JE, R. L.. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from Kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 14-18, 1999.

DÂMASO, A. **Nutrição e Exercício na Prevenção de Doenças**. Rio de Janeiro: Thex, 2001.p.335-362.

DIAS, A.B.; CARDOSO, L. G. V.; SILVA, J. M. S. F.; CARVALHO, J. C.T. Parâmetros fisiológicos na administração oral sub-crônica de quefir em ratos. **Manuscrito submetido para apreciação no Brazilian Journal of Microbiology, 2004.**

DIFCO LABORATORIES. **Division of Becton Dickinson and Company**. Maryland-USA: S. Parkes, 1998.

DINIZ, R. O.; GARLA, L. K.; SCHNEEDORF, J. M.; CARVALHO, J. C. T. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsulated into a polysaccharide matrix. **Pharmacological Research**, v. 47, n. 1, p. 49-52, jan. 2003.

DUARTE, A. T.; CARVALHO, J. M. **Cunicultura**. Lisboa: Clássica, p. 265-300, 1979.

FERNANDES, P. C. C.; LADEIRA, I. Q.; FERREIRA, C. L. L. F.; RODRIGUEZ, N. M.; SILVA, A. V. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, n. 31, p. 53-71, 2000.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999. p. 307.

FRANZETTI, L.; GALLI, A.; PAGANI, M. A.; NONI, I. de. Microbiological and chemical investigations on "sugar kefir" drink. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 48, n. 1, p. 67-80, 1998.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, Zurique, v. 30, n. 1, p. 77-84, fev. 1997.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONINI, G. L. de. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 68, n. 4, p. 639-652, nov. 2001.

GATES, D. **We would like to introduce you to our latest super food: Young Green Coconuts.** Disponível em <

[http://www.bodyecologydiet.com/pages\\_new/recipes?coconutkefir.html](http://www.bodyecologydiet.com/pages_new/recipes?coconutkefir.html)>. Acesso em: 15 out.2004

GÜLMEZ, M.; GÜVEN, A. The Effect of Kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. **Veterinary Sciences**. V. 50, n. 54, p. 129, 2003.

HAENLEIN, G. F. W. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2097-2115, 2001.

KOROLEVA, N.S. Technology of kefir and Kumys. **IDF Bull.** v.227, p.96-100. 1988

KUO, C.Y.; LIN, C. W.. Taiwanese kefir grains: Their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 19-23, abr. 1999.

LANZILLOTTI, H. S. Aplicação da Tecnologia de Alimentos em Alimentação Coletiva. **Revista Higiene Alimentar**, v. 6, n.92, p.16-25, jan./fev. 2002.

LEROI, F.; COURCOUX, P. Influence of pH, temperature and initial yeast:bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 2, p. 138-146, fev. 1996.

LIN, C. W.; CHEN, H. L.; LIU, J. R.. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 14-18, abr. 1999.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 104-108, jan./fev. 2002.

LIU, J. R.; LIN, C. W.. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 716-719, maio/jun. 2000.

MAINVILLE, I., MONTPETIT, D., DURAND, N., FARNWORTH, E.R.. Deactivating the bacteria and yeast in Kefir using heat treatment, irradiation and high pressure. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1 e 2, p. 45-49, 2001.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; CORPAS, I.; MUÑOZ, J.; ZAZO, J.; PEINADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, p. 136, ago. 2002.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; FARROW, J. A. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 3, p. 503-508, jun. 1984.

MARSHALL, V.M., COLE, W.M. Methods for making Kefir and fermented milks based on Kefir. **Journal of dairy Research**, v.52, p.451-456,1985.

MARTEAU, P.; SALMINEN, S. A inocuidade dos probióticos. In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION, 46., 1997, Beijing. **Resumo...** Vevey: Nestec, 1998. p. 39-40.

MARQUES, A. L. V.; SILVA, O. P. S. **A água de coco e o cultivo de cogumelos**. Bauru: [s.n.], 1966

MARQUEZ, J. C. El agua de coco verde como base de un cultivo monofásico para Trypanosomatidae, parásitos del hombre en América. **Boletín de la Dirección de Malariología y Saneamiento Ambiental**, v. XXVI, n.14, mar./dez.1986.

MITSUE, T., TACHIBANA, K., FUJIO, Y. Efficient Kefiran production by a mixed of lactobacillus Kefiranofaciens KF-75 and yeast strains. **Seibutsu Kogaku Kaishi**, v. 77, n. 3, p. 99-103, 1999.

OHARA, N., SUZUKI, M., OKADA, S., UCHIMURA, T., KOSAKI, M., KOMAGATA, K.. Identification of lactic acid bacteria isolated from freeze drier Kefir grains (Georgia, Russia). **Japanese Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 165-171, 1997.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frotooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2003.

PICADO, C. El agua de coco como medio de cultivo. **Bol. Ofic. Sanit. Panamer.**, v.21, p.960-965, 1942.

PIDOUX, M.; MARSHALL, V. M.; ZANONI, P.; BROOKER, B. *Lactobacilli* isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and microcell formation. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 3, p. 311-320, set. 1990.

PINTADO, M.E.; LOPES, J.A.S.; FERNANDES, P.B.M.. Microbiological and rheological studies on Portuguese Kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 15-26, 1996.

RABL, W.; LINIGER, B.; SUTTER, K.; SIGRIST, T. Ethanol content of kefir water. **Blutalkohol**, v. 31, n. 2, p. 76-79, mar. 1994.

REA, M.C., LENNARTSSON, T., DILLON, P., DRINAN, F.D., REVILLE, W.J., HEAPES, M., COGAN, T.M.. Irish Kefir like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 1, p. 83-94, 1996.

ROBERFROID, M. Alimentos funcionais: o caso dos pro e prebióticos. In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION, 46., 1997, Beijing. **Resumo...** Vevey: Nestec, 1998. p. 25-28.

ROSSI, E. A. Alimentos funcionais. In: DÂMASO, Ana (Coord.). **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 335-362.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, Edmonton, v. 9, n. 1, p. 69-80, jan. 1999.

SANDOVAL, L. A. **Leites fermentados**: yougurte, quefir e coalhada. São Paulo:[s.n.], 1999. 12p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análises microbiológicas de alimentos**. ITAL. Manual Técnico nº 14. Campinas, 1995.

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

SOTELO, B.; GARCIA, Fontan M. C.; PRIETO, B.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Estudio cuantitativo y cualitativo de la flora acidolactica a lo largo de la elaboracion industrial de kefir a partir de leche de vaca. **Alimentaria**, v. 38, n. 330, p. 111-119, mar. 2002.

SOTELO, B.; GARCIA, Fontan M. C.; PRIETO, B.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Quantitative and qualitative studies on the lactic acid bacterial flora in industrial manufacture of Kefir from cow milk. **Alimentaria**, v. 38, n. 330, p. 111-119, 2002.

TAIPINA, M. S.; FONTES, M. A. de S.; COHEN, Victor Haim. Alimentos funcionais — nutracêuticos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 100, p. 28-29, set. 2002.

TAKIZAWA, S.; KOJIMA, S.; TAMURA, S.; FUJINAGA, S.; BENNO, Y.; NAKASE, T.. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 121-127, 1998.

WATABE, J., IKEDA, N., MITZUTANI, J., JIN, S., HIRAI, T., ARIGA, H.. Comparison of microbiological and chemical characteristics among types of traditionally fermented milk in inner Mongolia In China and Caipis sour milk(sannyuu). **Milk science**, v. 47, n. 1, p. 1-8, 1998.

WYDER, M.T., SPILLMANN, H., PUHAN, Z.. Investigation of the yeast flora in dairy products: a case study of Kefir. **Food Technology and Biotechnology**, v. 35, n. 4, p. 299-304, 1997.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

WSZOLEK, M.; TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; BARCLAY, M. N. I. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

ZINSLY, C. F. **Curso de atualização em cunicultura**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1986. p. 56.

ZOURARI, A., ANIFANTAKIS E. M. Lâ Kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. **Technologie de production**, v. 68, p.373-392, 1988.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, mar. 2001.

