

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADOS A PARTIR DE
KEFIR PRODUZIDOS NA REGIÃO NOROESTE DO
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alice de Souza Ribeiro

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM
POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADOS A PARTIR DE KEFIR
PRODUZIDOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL**

Alice de Souza Ribeiro

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientador: Prof^a Dr^a Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards
Co-orientador: Prof^a Dr^a Leidi Daiana Preichardt

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Ribeiro, Alice de Souza
Caracterização de micro-organismos com potencial
probiótico isolados a partir de kefir produzidos na
região noroeste do estado do Rio Grande do Sul / Alice
de Souza Ribeiro.-2015.
78 f.; 30cm

Orientadora: Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards
Coorientadora: Leidi Daiana Preichardt
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2015

1. Kefir 2. Análises físico-químicas 3. Análises
microbiológicas 4. Antagonismo 5. Potencial probiótico I.
Richards, Neila Sílvia Pereira dos Santos II. Preichardt,
Leidi Daiana III. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Alice de Souza Ribeiro. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: alice.ribeiro@iffarroupilha.edu.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

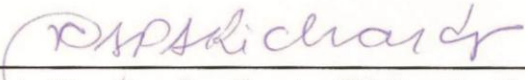
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL
PROBIÓTICO ISOLADOS A PARTIR DE KEFIR PRODUZIDOS NA
REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**


Elaborado por
Alice de Souza Ribeiro

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos


COMISSÃO EXAMINADORA



Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Gislaine Hermanns, Dr^a (IF-Farroupilha)



Leadir Lucy Martins Fries, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, RS, 09 de Março de 2015

“Sonhos determinam o que você quer. Ação determina o que você conquista.”
(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof^a Neila, por ser além de uma excelente profissional, uma grande pessoa. Obrigada.

À minha co-orientadora, prof^a Leidi, pela paciência e dedicação, além da mais pura amizade.

À minha família, que está sempre torcendo por mim e mandando energias positivas, em verdade, posso senti-las!

Ao meu marido, por seu incansável e absoluto apoio e amor.

À Elis, bolsista do projeto que foi fundamental nesse trabalho, obrigada pela dedicação e companheirismo.

Aos colegas do eixo produção alimentícia do IF-Farroupilha campus Santo Augusto, em especial a minha amiga e companheira de todas as horas, Cíntia.

Aos colegas, funcionários e professores do PPGCTA-UFSM.

Ao Instituto Federal Farroupilha, que possibilitou a realização desse trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS COM POTENCIAL PROBIÓTICO ISOLADOS A PARTIR DE KEFIR PRODUZIDOS NA REGIÃO NOROESTE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Autora: Alice De Souza Ribeiro

Orientadora: Prof^a Dr^a Neila Sílvia Pereira Dos Santos Richards

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Leidi Daiana Preichardt

Data e local da defesa: Santa Maria, 09 de março de 2015.

O consumo de alimentos funcionais tem aumentando no decorrer dos anos, pela conscientização da população em adquirir alimentos que tragam benefícios à saúde. Dentre os principais e mais consumidos alimentos funcionais estão os leites fermentados. O kefir é um leite fermentado que tem se destacado pela sua origem funcional natural, com efeitos significativos sobre a saúde quando consumido regularmente, e apesar de não ser comercializado no Brasil é encontrado facilmente de forma artesanal. Dessa forma, o estudo sobre essa fonte importante de alimentação funcional tem ganhado espaço entre pesquisadores, sendo o objetivo desse trabalho avaliar as características físico-químicas e microbiológicas do kefir artesanal da região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, bem como as características probióticas das bactérias ácido lácticas presentes no produto. Foram analisadas oito amostras de kefir produzidos artesanalmente na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras coletadas foram cultivadas em laboratório e os leites fermentados submetidos às análises físico-químicas e microbiológicas. Nas análises físico-químicas foram avaliados os teores de umidade, cinzas, gordura, extrato seco total e desengordurado, proteína, acidez titulável, acidez potenciométrica, pH, atividade de água e cor. Na avaliação microbiológica, as amostras foram submetidas a contagem de bolores e leveduras, análise do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes e contagem de bactérias lácticas (BALs). Também foi avaliado o potencial probiótico dos isolados através da atividade antagônica de BALs em relação a cepas de bactérias patogênicas de referência, além de testes de resistência às condições ácidas e sais biliares. Com a realização deste trabalho, é possível observar que o kefir artesanal da região de estudo tem características semelhantes entre as diferentes amostras, tanto nos parâmetros físico-químicos quanto microbiológicos, além de alguns isolados apresentarem características importantes no que diz respeito ao potencial probiótico. No entanto, sugerem-se mais estudos, especialmente em relação ao comportamento microbiológico para avaliar mais parâmetros que classifique esse alimento como funcional.

Palavras-Chave: Kefir. Análises físico-químicas. Análises microbiológicas. Antagonismo. Potencial probiótico.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduation ProGRAM in Food Sciences and Technology
Federal University of Santa Maria

MICRO- ORGANISMS CHARACTERIZATION WITH POTENTIAL PROBIOTIC THE KEFIR PRODUCED IN THE NORTHWEST FROM RIO GRANDE DO SUL STATE

Author: Alice de Souza Ribeiro

Supervisor: Professor Dr^a Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards

Co-supervisor: Professor Dr^a Leidi Daiana Preichardt

Place and Data of Defense: Santa Maria, March 9, 2015.

The consumption of functional foods has increased over the years, the awareness of the population to purchase foods that benefit health. Among the main and most functional foods are consumed fermented milk. The kefir is fermented milk that has stood out for its natural functional origin, with significant effects on health when consumed regularly, and despite not being marketed in Brazil is easily found by hand. Thus, the study of this important source functional food has gained ground among researchers, and the aim of this study was to evaluate the physicochemical and microbiological characteristics of the craft of kefir northwest region of Rio Grande do Sul State and the characteristics of probiotic lactic acid bacteria in the product. Eight kefir samples were analyzed produced by hand in the northwest region of of Rio Grande do Sul. The samples were cultured in the laboratory and fermented milk subjected to physical, chemical and microbiological analyzes. The physicochemical analyzes the moisture, ash, fat, total and degreased dry extract, protein, acidity, titratable acidity, pH, water activity and color. In the microbiological evaluation, the samples were subjected to counting of yeasts and molds and analysis the most probable numbers of total and fecal coliforms. We also assessed the potential of probiotic the isolated by BALs antagonistic activity against pathogenic bacteria strains of reference and resistance tests to acidic conditions and bile salts. In this work, we can to observe that the handmade kefir of the study area has similar characteristics between the different samples, both in physicochemical as microbiological parameters, and some isolates have important features in regard to the probiotic potential. However, we suggest further studies, especially in relation to microbiological behavior to assess more parameters to classify this as a functional food.

Key-words: Kefir. Physicochemical Analyzes. Microbiological analysis. Antagonism. Probiotic potential.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Padrões físico-químicos do kefir.....	15
Tabela 2:	Composição nutricional do kefir.....	16
Tabela 3:	Microbiota dos grãos de kefir, cultura mãe e bebida kefir.....	17
Tabela 4:	Diferenciação dos principais gêneros das bactérias ácido-láticas.....	18

Manuscrito 2

Tabela 1 –	Caracterização físico-química de amostras de kefir da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.....	36
Tabela 2 –	parâmetros luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) utilizadas para determinação da cor das amostras de kefir da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.....	37
Tabela 3 –	Avaliação microbiológica de amostras de kefir da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.....	38

Manuscrito 3

Tabela 1 –	Atividade antagonista de BALs nativas de kefir de produção artesanal da região Noroeste do RS, frente a patógenos de referência, com base na medida dos halos de inibição (mm).	49
Tabela 2 –	Avaliação da sobrevivência total (%ST) de BALs frente a diferentes pHs, com base na contagem de células viáveis, após quatro horas de incubação.	54
Tabela 3 –	Contagem de BALs nos tempos 0 (sem incubação) e 4 (após quatro horas de incubação), sob exposição a sais biliares.	55
Tabela 4 –	Avaliação da sobrevivência total (%ST) de BALs frente a diferentes concentrações de bile, com base na contagem de células viáveis, após quatro horas de incubação.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grãos de kefir..... 14

Manuscrito 1

Figura I – Grãos de kefir23

Figura II: Produção tradicional de kefir24

Manuscrito 2

Figura 1 – Fluxograma de produção de kefir.....33

Manuscrito 3

Figura 1a – Comportamento dos isolados frente a condições ácidas no tempo zero (sem incubação).50

Figura 1b – Comportamento dos isolados frente a condições ácidas no tempo um (após uma hora de incubação).....50

Figura 2a – Comportamento dos isolados frente a condições ácidas no tempo dois (após duas horas de incubação).....51

Figura 2b – Comportamento dos isolados frente a condições ácidas no tempo três (após três horas de incubação).51

Figura 3 – Comportamento dos isolados frente a condições ácidas no tempo quatro (após quatro horas de incubação).52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Características Químicas do kefir	14
2.2. Características Nutricionais do kefir	15
2.3 Características Microbiológicas do kefir.....	17
2.4 Bactérias do ácido láctico (BALs)	18
2.5. Leveduras	19
3. MANUSCRITOS	20
3.1 Manuscrito 1	21
3.2 Manuscrito 2	30
3.3 Manuscrito 3	43
4. CONCLUSÃO FINAL	63
REFERÊNCIAS	65
ANEXOS	69

1. INTRODUÇÃO

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos na saúde é conhecido há muito tempo. Apesar disso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados funcionais, e de seus componentes responsáveis por tal efeito, tornou-se intenso apenas nos últimos anos.

Os alimentos funcionais, são aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem a saúde. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde via mecanismos não previstos mediante a nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito se restringe à promoção da saúde e não à cura de doenças (OLIVEIRA, 2009).

Devido à preocupação atual da população em consumir alimentos que, além de suprir as necessidades fisiológicas tragam benefícios à saúde, micro-organismos com potencial probiótico têm sido introduzidos na alimentação humana. Nesse contexto, os alimentos funcionais foram incluídos no dia-a-dia da população mundial, dentre eles os probióticos. Os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem ação benéfica à saúde humana, como equilíbrio bacteriano intestinal, redução do colesterol, diarreias e redução do risco de câncer (FAO/WHO, 2001). Para ser considerado um probiótico, o micro-organismo deve habitar naturalmente o trato gastrointestinal, sobrevivendo à passagem pelo estômago e mantendo a viabilidade e atividade metabólica no intestino (LIMA, 2003).

O kefir é considerado um probiótico formado por uma mistura de micro-organismos, predominantemente de bactérias ácido-láticas e de leveduras, podendo conter também bactérias acéticas (MICHELI et al., 1999). Estes micro-organismos estão suspensos em uma matriz de polissacarídeos (grãos). O kefir é um produto fermentado muito utilizado por suas propriedades sensoriais e uso tradicional na medicina popular, contém vitaminas, aminoácidos, peptídeos, carboidratos, etanol e compostos voláteis (DINIZ et al., 2003; BERGMANN et al., 2010).

Diversos autores têm relatado os benefícios que esse produto apresenta, dentre eles: redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, proteção contra micro-organismos patogênicos, balanço da microbiota intestinal, atividade anticarcinogênica, regeneração hepática, entre outros (ORLOVA, NASATKINA, OKHAPKINA, 1980; ALM, 1982; SCHMIDT, VASS, SZAKALY, 1984; KUBO, ODANI, NAKAMURA, 1992; MUNZNER, HOLZAPFEL, 1993; POOL-ZOBEL & SALOFF-COSTE, 1998; OTA, 1999).

Da mesma forma, é constatado que até os dias de hoje o consumo do kefir na sua forma microbiana clássica, não demonstrou características patogênicas e foi capaz de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; ANSELMO, VITORIA e LOUSADA, 2001).

Sabe-se que o kefir é um probiótico e tem efeitos benéficos na saúde, no entanto, sua microbiota é muito variável, dependendo da origem dos grãos e substratos utilizados como açúcar mascavo, leite ou suco de frutas (GUZEL-SEYDIM, KOK-TAS, GRENE, 2011; MICHELI et al., 1999). Os micro-organismos presentes no kefir apresentam uma associação simbiótica, porém a composição total dos grãos ainda não está completamente conhecida. Portanto, o produto apresenta características diferentes de acordo com sua região de origem e diferentes meios de cultivo.

Desta forma, este trabalho tem os seguintes objetivos:

- Isolar e caracterizar fenotipicamente as bactérias ácido-láticas com potencial probiótico a partir de kefir produzidos na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul;
- Caracterizar a qualidade microbiológica do kefir regional quanto a indicadores higiênico-sanitários, presença de patógenos e ao grupo de bactérias ácido-láticas;
- Determinar as características físico-químicas do kefir regional;
- Detectar a atividade antagonista dos micro-organismos isolados do kefir frente a *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.*;
- Verificar possível potencial probiótico das bactérias ácido-láticas isoladas do kefir regional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Entende-se por Kefir o produto incluído na definição cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (BRASIL, 2007).

O kefir é uma suspensão de micro-organismos simbiontes formado por um grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido-láticas – conhecidas pela sigla BALs) e de leveduras, ambos encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelas primeiras. Produz uma bebida fermentada utilizada no ocidente por suas propriedades sensoriais e uso tradicional na medicina popular. Seu produto fermentado resulta em uma solução ácida contendo compostos aromáticos, gás carbônico e etanol (TOBA, ARHARA, ADACHI, 1990).

O kefir deve apresentar as seguintes características: homogeneidade e consistência cremosa; sabor acidulado, picante e ligeiramente alcoólico; acidez menor que 1,0 g de ácido láctico/ 100 g; teor alcoólico entre 0,5 e 1,5 (%v/m); bactérias lácticas totais no mínimo 10^7 UFC/g; leveduras específicas no mínimo 10^4 UFC/g e acondicionamento em frascos com fecho inviolável (AQUARONE, BORZANI e SCHMIDELL, 2001).

O cultivo iniciador do kefir apresenta-se em forma de grãos de forma irregular (às vezes, sua estrutura lembra uma couve-flor), brancos ou amarelados, de consistência elástica, com diâmetro muito variado (1 mm a 3 cm), dependendo das condições de cultivo e manejo, conforme pode ser observado na figura 1. São chamados de grãos de kefir e podem conter uma variável microbiota, com diversas leveduras e bactérias agrupadas de forma muito organizada; nas camadas periféricas predominam as formas bacilares, provavelmente lactobacilos e, à medida que se avança para o centro, vai aumentando a população de leveduras (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

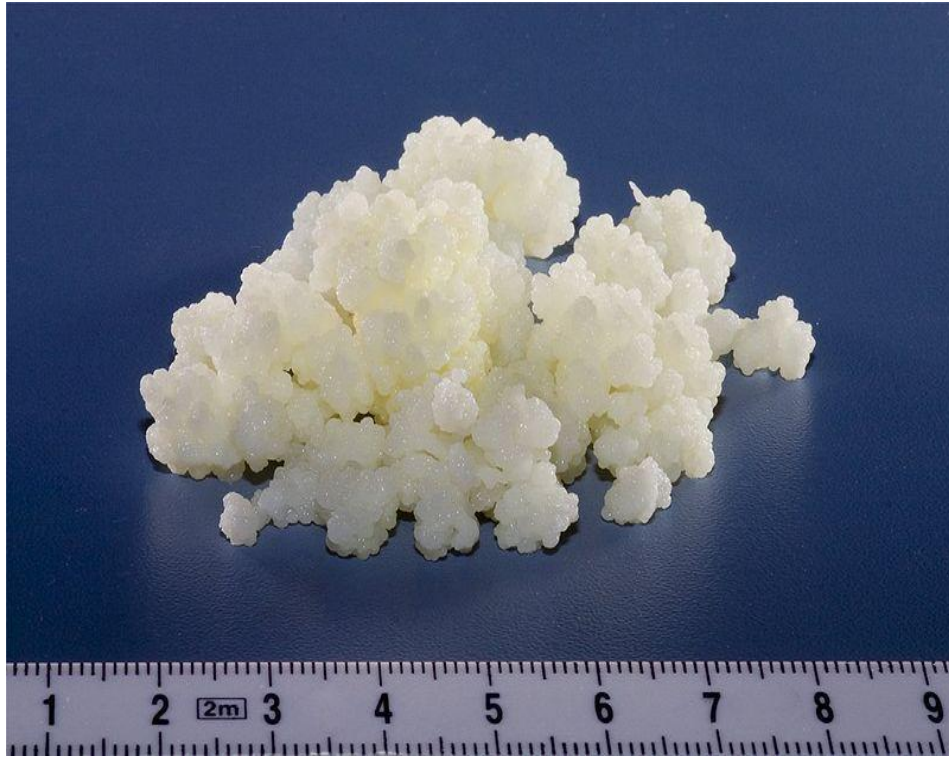


Figura 1: Grãos de kefir (FARNWORTH, 2005).

2.1. Características Químicas do kefir

O kefir geralmente apresenta as seguintes características: pH entre 4,2 e 4,6; cerca de 0,8% (m/m) de ácido lático; álcool na proporção de 0,1 a 2,0% (m/v), conteúdo de gordura depende do leite utilizado, textura macia, sabor ácido, picante e levemente efervescente, resultando numa bebida muito refrescante (MESQUIARI, 1999). A tabela 1 apresenta os padrões físico-químicos do kefir a nível mundial e no Brasil.

O kefir é fonte de vários compostos com propriedades aromáticas tais como, acetaldeído, diacetil, ácidos pirúvico, acético, propiônico e butírico (GUZEL-SEYDIM, SEYDIM, GREENE, 2000; SARKAR, 2007). Estudos realizados por Guzel-Seydim, Seydim e Greene (2000) mostraram que o kefir acondicionado a 4°C por 21 dias apresentou redução nas concentrações de etanol de 0,08%, acetaldeído de 11µg/g e um declínio em acetoína de 16 µg/g. Entretanto, diacetil não foi detectado durante a fermentação ou acondicionamento.

Tabela 1: Padrões físico-químicos do kefir.

Parâmetros	Padrões FAO/WHO	MAPA/Brasil
Proteína (% m/m)	mín. 2,7%	mín. 2,9%
Gordura (% m/m)	< 10,0%	0,5 a 6%
Ácido láctico (% m/m)	mín. 0,6%	0,5 a 1,5%
Etanol (% v/m)	Não mencionado	1,5 a 3%

Fonte: Brasil (2000); FAO/WHO (2003).

2.2. Características Nutricionais do kefir

O kefir contém vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam no tratamento e manutenção das funções do corpo. É rico em vitaminas B₁, B₁₂, cálcio, aminoácidos essenciais, ácido fólico e vitamina K. Considerado uma boa fonte de biotina, a vitamina B que ajuda na assimilação de outras vitaminas do complexo B, tais como ácido fólico, ácido pantotênico e vitamina B₁₂. Os numerosos benefícios das vitaminas do complexo B incluem regulação dos rins, fígado e sistema nervoso, auxilia no tratamento da pele, aumento de energia e promoção da longevidade. Possui proteínas que são parcialmente digeridas, sendo facilmente utilizadas pelo organismo e é ainda, uma boa fonte de fósforo, segundo mineral mais abundante no corpo, que auxilia na utilização dos carboidratos, lipídeos e proteínas para crescimento celular, manutenção e energia (SALOFF-COSTE, 1996; OTLES & CAGINDI, 2003).

Tabela 2: Composição nutricional do kefir

Atributos nutricionais	Componentes nutricionais	Concentração 100g
Vitaminas (mg)	Vitamina B1	< 1
	Vitamina B2	< 0,5
	Vitamina B5	0,3
Aminoácidos (g)	Treonina	0,18
	Lisina	0,38
	Valina	0,22
	Isoleucina	0,26
	Metionina	0,14
	Fenilalanina	0,23
	Triptofano	0,07
Minerais		
Macro elementos (g)	Potássio	1,65
	Cálcio	0,86
	Magnésio	1,45
	Fósforo	0,30
Micro elementos (mg)	Cobre	0,73
	Zinco	9,27
	Ferro	2,03
	Manganês	1,30
	Cobalto	0,02
	Molibdênio	0,03

Fonte: Liut Kevicius e Sarkinas (2004).

2.3 Características Microbiológicas do kefir

A composição microbiológica dos grãos de kefir é ainda incerta, onde encontra-se uma diversidade microbiológica elevada, que inclui espécies de leveduras, bactérias do ácido lático e bactérias do ácido acético, listados na tabela 3. Várias pesquisas indicam que a microbiota do grão de kefir depende fortemente da origem do grão, das condições locais do cultivo e do acondicionamento e processo de fabricação (GARROTE; ABRAHAM, DE ANTONI, 2001 e MOREIRA, 2008).

Em geral, bactérias ácido-láticas (BALs) são mais numerosas ($10^8 - 10^9$ UFC/g) que leveduras ($10^5 - 10^6$ UFC/g) e bactérias ácido-acéticas (BAA) ($10^5 - 10^6$ UFC/g) nos grãos de kefir. Entretanto, as condições de fermentação podem afetar este padrão (GARROTE, ABRAHAM, DE ANTONI, 2001; FARNWORTH, 2005).

Tabela 3: Microbiota dos grãos de kefir, cultura mãe e bebida kefir.

Micro-organismos (UFC/g)	Grãos (UFC/g)	Cultura mãe (UFC/g)	Bebida
<i>Lactococos</i>	10^6	$10^8 - 10^9$	10^9
<i>Leuconostoc</i>	10^6	$10^7 - 10^8$	$10^7 - 10^8$
Lactobacilos termofílicos	10^8	10^5	$10 - 10^8$
Lactobacilos mesofílicos	$10^6 - 10^9$	$10^2 - 10^3$	-
Bactérias ácido acéticas	10^8	$10^5 - 10^6$	$10^4 - 10^5$
Leveduras	$10^6 - 10^8$	$10^5 - 10^6$	$10^4 - 10^5$

Fonte: Rea et al., (1996); Sarkar, (2007).

2.4 Bactérias do ácido láctico (BALs)

As bactérias do ácido láctico compreendem um grupo composto por vários gêneros (tabela 4), dentro do filo *Firmicutes*, classe *Bacilli*, que apresentam alguns fenótipos em comum: são Gram positivo, geralmente imóveis, não produzem esporos, na maioria das vezes catalase negativo e anaeróbios aerotolerantes. Uma importante diferença dentre os subgrupos das BALs são os produtos formados durante a fermentação dos carboidratos. Um grupo, denominado de homofermentativo, produz ácido láctico como único ou principal produto, enquanto o outro grupo, denominado heterofermentativo, produz etanol, CO₂ e lactato em quantidades equimolares. Em geral, são mesofílicas, mas podem crescer em baixas temperaturas como 5°C ou altas como 45°C, em situações específicas. A maioria das linhagens cresce em pH 4 a 4,5 (MADIGAN, MARTINKO, PARKER, 1997; JAY, 2005).

São comumente utilizadas na indústria de laticínios na elaboração de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (MADERA et al., 2003). Produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais modificam gradativamente a textura e o aroma dos alimentos fermentados (PIARD et al., 1999).

Tabela 4: Diferenciação dos principais gêneros das bactérias ácido-láticas.

Gênero	Formato e arranjo	Fermentação
<i>Streptococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo
<i>Leuconostoc</i>	Cocos em cadeias	Heterofermentativo
<i>Pediococcus</i>	Cocos em tétrades	Homofermentativo
<i>Lactobacillus</i>	Bastonetes geralmente em cadeias	Homo/heterofermentativo
<i>Enterococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo
<i>Lactococcus</i>	Cocos em cadeias	Homofermentativo
<i>Paralactobacillus</i>	Bastonetes isolados ou em pares ou cadeias duplas	Homofermentativo

Fonte: Madigan; Martinko; Parker, (1997); Leisner et al., (2000).

2.5. Leveduras

A microbiota de leveduras do kefir varia conforme sua fonte de fabricação, mas tem sido relatada como uma mistura de espécies fermentadoras e não fermentadoras de lactose, identificadas como *Kluyromyces marxianus*, *C. kefir*, *C. pseudotropicalis*, *S. cerevisiae*, *S. exiguus* e *T. holmii*. As leveduras *Kluyromyces marxianus* e *S. cerevisiae* também estão presentes na fermentação de kumys e lebem, outros leites fermentados (ROGINSKI, 1988; FLEET, 1990).

Fleet (1990) descreve algumas propriedades fisiológicas e bioquímicas das leveduras importantes para aplicação em produtos lácteos, como a fermentação ou assimilação da lactose; produção de enzimas proteolíticas extracelulares; produção de enzimas lipolíticas extracelulares; assimilação do ácido láctico e do ácido cítrico e crescimento em temperaturas baixas.

3. MANUSCRITOS

3.1 Manuscrito 1

Manuscrito submetido para revista Higiene Alimentar.

Estruturação conforme normas da revista (Anexo A).

Kefir, bebida fermentada naturalmente funcional

Kefir, fermented drink naturally functional

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

Alice de Souza Ribeiro¹, Leidi Daiana Preichardt², Daniela Buzatti Cassanego³, Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards⁴

¹Departamento de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av. Roraima nº1000, Camobi, CEP 97105-900, Santa Maria – RS. E-mail: alice.ribeiro@iffarroupilha.edu.br. * Autor para correspondência.

²Instituto Federal Farroupilha – Câmpus Santo Augusto.

³⁻⁴Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria.

RESUMO

O consumo de alimentos funcionais tem aumentando no decorrer dos anos, pela conscientização da população em adquirir alimentos que tragam benefícios à saúde. Dentre os principais e mais consumidos alimentos funcionais estão os leites fermentados. O kefir é um leite fermentado que tem se destacado pela sua origem funcional natural, com efeitos significativos sobre a saúde quando consumido regularmente. Dessa forma, o estudo sobre essa fonte importante de alimentação funcional tem ganhado espaço entre pesquisadores.

Palavras-chave: kefir, leites fermentados, alimentos funcionais, probióticos.

ABSTRACT

The consumption of functional foods has increased over the years, the awareness of the population in purchasing foods that bring health benefits. Among the main and most functional foods are consumed fermented milks. The kefir is fermented milk that has stood out for its natural functional origin, with significant effects on health when consumed regularly. Thus, the study on this important source of functional food has gained space among researchers.

Keywords: kefir, fermented milk, functional foods, probiotics.

INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais são aqueles que possuem em sua composição ou são suplementados com nutrientes ou substâncias que proporcionam benefícios à saúde, além do benefício nutricional tradicional (SAAD, CRUZ e FARIA, 2011). Dentro da categoria dos alimentos funcionais destacam-se os chamados probióticos, os quais podem ser definidos como componentes alimentícios que exercem benefícios à saúde do hospedeiro associado com a modulação da microbiota intestinal. Os produtos lácteos são alimentos em destaque nessa categoria e, atualmente, constituem-se no principal veículo de administração de culturas probióticas (SANCHEZ et al., 2009). Os principais produtos

lácteos probióticos são iogurte, leite fermentado ou cultivado, kefir, leite acidófilo, leite *sweet acidófilo*, *buttermilk* fermentado, kumys e coalhada (OLIVEIRA, 2009).

O presente trabalho tem por objetivo fazer uma revisão bibliográfica sobre o kefir, produto lácteo fermentado apontado como potencialmente funcional, elucidando suas características microbiológicas, nutricionais e funcionais.

Alimentos funcionais e leites fermentados

Apontamentos feitos por pesquisadores como *Metchnikoff*, no início do século XX, deram origem à chamada “teoria da longevidade”, a qual afirmava que o consumo de leite fermentado por *Lactobacillus spp.* daria origem a competição deste micro-organismo benéfico com outras bactérias putrefativas do intestino as quais abreviariam a vida humana por produzirem substâncias tóxicas. Essa teoria foi baseada na constatação de que camponeses búlgaros tinham vida longa e sua dieta era rica em leites fermentados (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Dentre aos vários tipos de leites fermentados existentes do mundo inteiro, o kefir destaca-se pelo seu alto potencial como alimento funcional, devido sua microbiota simbiótica ser dotada de características probióticas. Comparado ao iogurte, o kefir além de possuir uma escala maior e mais diversificada de micro-organismos viáveis em sua cultura inicial, também apresenta um nível de atividade da β -galactosidase 60% mais elevado, contribuindo para um aumento significativo da digestão da lactose do leite (HERTZLER & CLANCY, 2003). Também, difere do iogurte tradicional por ser menos viscoso e por conter, além de ácido láctico, etanol e gás carbônico.

Kefir

O kefir tem se destacado pela sua origem funcional natural, com efeitos significativos sobre a saúde quando consumido regularmente. Esse produto é uma bebida fermentada que tem como origem o eslavo *Keif* que significa “bem-estar” ou “bem-viver”. É uma mistura probiótica original das montanhas Caucásicas da Rússia, sendo considerado um alimento potencialmente funcional (MOREIRA et al., 2008).

Segundo Golowczyk et al. (2011), uma grande variedade de micro-organismos com uso potencial como probióticos têm sido isolados de grãos de kefir. Esses micro-organismos produzem ácidos orgânicos e bacteriocinas e têm a capacidade de aderir às células intestinais e causar efeito antagônico aos patógenos intestinais.

O kefir é um produto lácteo com característica única, em virtude da combinação do ácido láctico e fermentação alcoólica da lactose no leite. É produzido pela atividade microbiana simbiótica dos grãos de kefir que têm um equilíbrio relativamente estável e específico de bactérias do ácido láctico e leveduras (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; LEITE et al., 2013). O leite é fermentado com uma microbiota mista confinada a uma matriz de grãos de kefir descontínuos, que são recuperados depois da fermentação (KOLLING & RICHARDS, 2004).

Os grãos de kefir de leite são irregulares apresentando formato de couve-flor, de tamanho variável entre três a 35 mm no diâmetro, com grânulos semelhantes à ervilha ou noz, conforme

ilustrado pela figura I. É composto por uma massa amarelada, firme, gelatinosa e branca (GUZEL-SEYDIM et al., 2011). São constituídos pela ação de uma suspensão de micro-organismos simbioses formando uma mistura única e específica de, pelo menos, seis grupos funcionalmente diferentes de micro-organismos (ÖZDESTAN & ÜREN, 2010). O kefir é constituído de grande número de cepas de bactérias (predominantemente ácido-láticas - BALs), bactérias do ácido acético, leveduras e fungos, todos encapsulados em uma matriz de polissacarídeos secretados pelos próprios micro-organismos (DINIZ et al., 2003; MOREIRA et al., 2008).



Figura I – Grãos de kefir de leite. Fonte: arquivo pessoal.

A composição total dos grãos ainda não está completamente conhecida, no entanto é sabido que microbiota dos grãos de kefir depende primariamente da sua fonte de obtenção, pois os grãos de kefir podem ser cultivados em água com açúcar mascavo, leite ou sucos de frutas, sendo que sua coloração depende diretamente do substrato utilizado, onde os grãos amarelados são os cultivados no leite e os cultivados em água com açúcar mascavo tem o aspecto de pardos e arredondados, já quando cultivados em suco de uva, por exemplo, os grãos apresentam coloração púrpura (GUZEL-SEYDIM, 2000; KOLLING & RICHARDS, 2004; GUZEL-SEYDIM et al., 2011).

A fermentação ocorre incubando o leite com os grãos de kefir, gerando como produtos o ácido láctico, ácido acético, CO₂ e álcool. O kefir pode ser produzido com utilização de leite de diferentes espécies, incluindo vaca, cabra, ovelha, camela, búfala ou inclusive substitutos do leite como extrato aquoso de soja, arroz ou coco (IRIGOYEN et al., 2005).

O kefir é utilizado no Brasil como um produto da medicina popular, tendo hoje diversos efeitos probióticos relacionados à sua utilização. No entanto, o kefir, como bebida fermentada, tem consumo recente no Brasil, sua fabricação e consumo são exclusivamente artesanais, sendo obtido pela fermentação do grão em leite ou em água adicionada de açúcar mascavo. A maioria das pessoas em nosso país desconhece o produto, bem como os possíveis benefícios da inclusão deste alimento probiótico na dieta (CARNEIRO, 2010).

Produção tradicional de kefir

O método tradicional de produção de kefir se dá pela inoculação direta dos grãos de kefir no leite. O leite pode ser integral, desnatado ou semidesnatado e deve ter sofrido tratamento térmico equivalente a pasteurização (63°C/ 30 min.; e/ou 75°C/15 seg. e/ou tratamento equivalente). Após o leite é resfriado a temperatura de 20-25°C e então ocorre a inoculação com 2 a 10% (normalmente 5%) de grãos de kefir. Após o período de fermentação, 18 a 24 horas a temperatura de 20-25°C, os grãos são separados do leite por filtração, lavados com água isenta de cloro ou leite e acondicionados em temperatura de refrigeração ($\pm 8^{\circ}\text{C}$) para posterior inoculação, o leite fermentado produzido é estocado em refrigeração (4°C) e maturado por aproximadamente 12 horas para estabilização, estando pronto para o consumo (OTLES & CAGINDI, 2003). O processo tradicional de fabricação de kefir está demonstrado na Figura II.

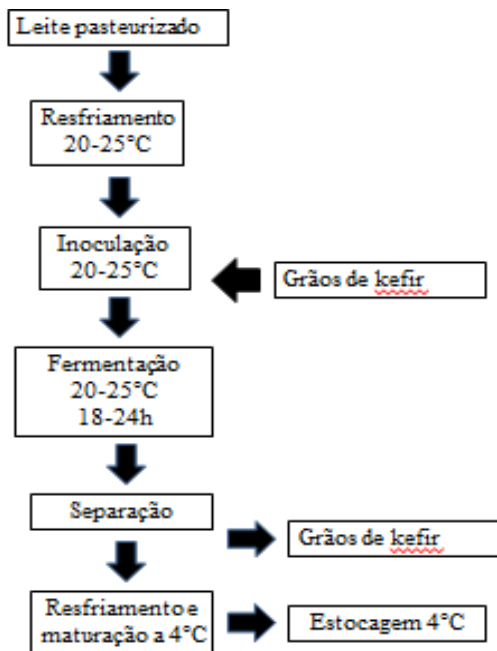


Figura II: Fluxograma da produção tradicional de kefir (GUZEL-SEYDIM; KÖK-TAS; GREENE , 2010).

Kefir e suas propriedades probióticas

Devido a sua composição microbiológica e química, o kefir vem sendo considerado um produto probiótico complexo, ou seja, possui em sua composição micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Vários estudos vêm comprovando os benefícios do consumo desse produto para o consumidor (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA et al., 2005).

Propriedade antibacteriana

Um dos efeitos probióticos do kefir é sua propriedade antibacteriana que apresenta frente a vários patógenos, que pode ser atribuída à produção de metabólitos como ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil e peptídeos

(bacteriocinas), produzidos pelas bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e leveduras presentes no kefir (FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007). Estudos recentes vêm mostrando o efeito antagonista do kefir frente a bactérias patogênicas como *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* (CHIFIRIUC et al., 2011), *Shigella sp.* (KAKISU et al., 2013), *Bacillus cereus* (MEDRANO et al., 2008), e também sobre toxinas originadas da ação de *Clostridium difficile* (CARASI et al., 2012).

Sistema trato gastrointestinal

Leites fermentados são capazes de restaurar a microbiota intestinal por inibir micro-organismos indesejáveis. A atividade antibacteriana é influenciada pela atividade da cultura, temperatura e tempo de armazenamento e nível inicial de contaminação. Segundo Rattary & O'Connell (2011), o efeito causado pelo consumo de kefir no intestino depende da composição da microbiota e de uma combinação de fatores, como a inibição do patógeno direto por ácidos e produção de bacteriocinas, além da exclusão do patógeno competitivo na mucosa intestinal. Mais estudos apontam que o kefir é útil no tratamento pós-operatório de pacientes ou de pacientes com doenças gastrointestinais (SARKAR, 2007).

Estudos apontam, ainda, as propriedades do kefir em aumentar a digestão da lactose, pela maior atividade da enzima β -galactosidase (HERTZLER & CLANCY, 2003; USTOK ; TARI; HARSA, 2010). A capacidade de diminuir a concentração de lactose e a presença da enzima β -galactosidase em produtos lácteos fermentados os torna adequados para o consumo por pessoas intolerantes à lactose (FARNWORTH & MAINVILLE, 2008; SARKAR, 2007).

Propriedade anticarcinogênica

Pesquisadores afirmam que o kefir possui ação anticarcinogênica, tal efeito pode ser atribuído, em geral pela prevenção do câncer e pela supressão de tumores em estágio inicial, pelo decréscimo de atividade das enzimas que convertem compostos pró-carcinogênicos a agentes cancerígenos, ou pela ativação do sistema imunológico (SARKAR, 2007). Güven et al. (2003), mostraram que camundongos expostos ao tetracloreto de carbono (uma hepatotoxina que induz danos oxidativos) e recebendo kefir por gavagem, tiveram os níveis de tumores do fígado e rim diminuídos, indicando que o kefir agiu como antioxidante. Além disso, o kefir foi mais eficaz do que a vitamina E (conhecida por suas propriedades antioxidantes) na proteção contra danos oxidativos. Estudos atuais vêm demonstrando que micro-organismos típicos de leites fermentados, como os lactobacilos estão sendo aplicados em tratamento de prevenção de câncer (AMER et al., 2013).

Efeito hipocolesterolêmico

Os possíveis mecanismos propostos para tentar explicar a ação exercida pelas bactérias ácido-láticas (BALs) na redução do nível de colesterol são a ligação direta e incorporação das células bacterianas ao colesterol, assimilação do colesterol, impedindo sua absorção pelo organismo bem como a desconjugação dos sais biliares e produção de ácidos biliares livres em função da atividade da enzima hidrolase (WANG et al., 2009).

Estudos realizados com ratos alimentados com dieta rica em colesterol e suplementados com *Lactobacillus plantarum* MA2 isolado de kefir apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, lipoproteínas de baixa densidade ou *low density lipoproteins* (LDL) e triacilgliceróis, enquanto não houve mudança no nível de lipoproteínas de alta densidade ou *high density lipoprotein* (HDL). Além disso, o colesterol total e triacilgliceróis do fígado também foram reduzidos. Já o colesterol e triacilgliceróis das fezes dos animais aumentaram significativamente (WANG et al., 2009).

Sistema imunológico

Outro benefício que o consumo de kefir pode trazer é em relação ao sistema imunológico, em virtude da possível ação de exopolissacarídeos encontrados nos grãos de kefir. Estudos realizados por pesquisadores na década de 80 relatam que ao extrair kefirano (soro obtido na fermentação) dos grãos de kefir e alimentarem os camundongos, observaram que a redução do crescimento do tumor tinha ligação com uma resposta mediada por célula, e pareceu que a dose total de polissacarídeo determinou sua efetividade (FARNWORTH, 2005). Vinderola et al. (2006) observaram que frações do sobrenadante de kefir, obtido após centrifugação, administradas a camundongos da linhagem BALSb/c induziram resposta a mucosa intestinal, onde o kefir foi capaz de manter a homeostasia intestinal, aumentando a produção do anticorpo imunoglobulina A, tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso.

CONCLUSÃO

Através da revisão feita é possível observar o potencial funcional da bebida fermentada kefir e seus efeitos no organismo. Sua microbiota simbiótica e probiótica proporciona a formação de diferentes metabólitos como ácidos orgânicos (ácidos láctico e acético), peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil e peptídeos (bacteriocinas) promovendo uma ação antibacteriana frente a vários patógenos, além de outros efeitos benéficos que são atribuídos ao consumo do kefir de leite como a redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, efeito hipocolesterolêmico, balanço da microbiota intestinal, atividade anticarcinogênica e regeneração hepática.

No entanto, a composição total dos grãos ainda não está completamente conhecida e sua microbiota depende primariamente da sua fonte de obtenção. Portanto, é importante o desenvolvimento de estudos que caracterizem o kefir oriundo de várias fontes e regiões, tanto no que diz respeito à composição química quanto à microbiota e os possíveis efeitos que esse alimento pode trazer quando consumido.

REFERÊNCIAS

AMER, M.N.; MANSOUR, N.M.; AHMED, I.; EL-DIWANY; INSAF, E.D.; FERIAL, M.R. Isolation of probiotic lactobacilli strains harboring L-asparaginase and arginine deiminase genes from human infant feces from their potential application in cancer prevention. **Ann. Microbiol.**, v.63, p. 1121-1129, 2013.

- CARASI, P.; TREJO, F.M.; PÉREZ, P.F.; DE ANTONI, G.L. Surface proteins from *Lactobacillus kefir* antagonize in vitro cytotoxic effect of *Clostridium difficile* toxins. **Anaerobe**, v. 18, p. 135-142, 2012.
- CARNEIRO, R.P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir**. 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- CHIFIRIUC, M.C.; CIOACA, A.B.; LAZAR, V. In vitro assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. **Anaerobe**, v. 17, p. 433-435, 2011.
- DINIZ, R.O.; PERAZZO F.F; CARVALHO, J.C.T.; SCHNEEDORF, J.M. Atividade anti-inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.13, p. 19-21, 2003.
- FARNWORTH, E.R. kefir- a complex probiotic. **Food Science and Technology Bulletin**, v. 2, p. 1-17, 2005.
- FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE, I. Kefir – A fermented milk product. Apud: FARNWORTH, E.R. (2ª ed.), **Handbook of Fermented Functional Foods** (2 ed.) CRC Press Taylor & Francis Group, p.89-127, 2008.
- GOLOWCZYC, M.A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G.; ABRAHAM, A.G. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir and their impact on probiótica properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 556-560, 2011.
- GÜVEN, A.; GÜVEN, A; GÜLMEZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 50, p. 412-416, 2003.
- GUZEL-SEYDIM, Z.; SEYDIM, A.C.; GREENE, A.K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. **Journal Dairy Sci.** v. 83, p. 275, 2000.
- GUZEL-SEYDIM, Z.; KÖK-TAS, T.; GREENE, A.K. Kefir and koumiss: microbiology and technology. **Development and Manufacture of Yogurt and Functional Dairy Products**. Ed. Yildiz, p. 143-163, 2010.
- GUZEL-SEYDIM, Z., KOK-TAS, T.; GRENE, A.K. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 51, n. 3, p. 261-268, 2011.
- HERTZLER, S.R.; CLANCY, S. *M. kefir* improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, p. 582-587, 2003.
- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBANEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 613-620, 2005.

- KAKISU, E.; BOLLA, P.; ABRAHAM, A.G.; URRAZA, P.; DE ANTONI, G.L. *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir: Protection of cultures Hep-2 cells against *Shigella* invasion. **International Dairy Journal**, v. 33, p. 22-26, 2013.
- KOLLING, F. F.; RICHARDS, N.S.P. Kefir - um alimento milagroso? **Food Ingredients**, São Paulo, v. 6, n.33, p. 62-71, 2004.
- LEITE, A.M.O.; LEMOS, M.A.M.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p. 341-349, 2013.
- MEDRANO, M.; PÉREZ, P.F.; ABRAHAM, A.G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 122, p. 1-7, 2008.
- MOREIRA, M.E.C. e col. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, Vol. 31, No. 7, 2008.
- OLIVEIRA, M.N. **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009.
- OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, p. 54-59, 2003.
- ÖZDESTAN, Ö.; ÜREN, A. Biogenic amine content of kefir: a fermented dairy product. **Eur. Food Technol**, v. 231, p. 101-107, 2010.
- RATTRAY, F.P.; O'CONNELL Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), **Encyclopedia of Dairy Sciences** Academic Press, San Diego, USA, v. 2, p.518-524, 2011.
- SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas..** São Paulo: Livaria Varela, 2011.
- SANCHEZ, B.; REYES-GAVILAN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p.1-10, 2009.
- SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.
- USTOK, F.I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and thermal properties of β -galactosidase enzymes produced by artisanal yoghurt cultures. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1114-1120, 2010.
- VASELJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – from *Metchnikoff* to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, p. 714-728, 2008.
- VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **J. Dairy Res.**, v.72, p. 195-202, 2005.

VINDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflo on immune stimulation. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 472-479, 2006.

WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; ZHANG, B.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 341-3472009.

3.2 Manuscrito 2

Manuscrito submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, enviado em 16 de outubro de 2014.

Estruturação conforme normas da revista (Anexo B).

Caracterização físico-química e microbiológica de Kefir produzido artesanalmente na região Noroeste do Rio Grande de Sul

Physico-chemical and microbiological characterization of kefir handmade in the northwestern region of Rio Grande do Sul

Alice de Souza Ribeiro¹, Leidi Daiana Preichard², Elis Cristina Costa Gubert², Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards³

¹Mestranda Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria. E-mail: alice.ribeiro@iffarroupilha.edu.br. ²Instituto Federal Farroupilha – Câmpus Santo Augusto.

³ Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria.

RESUMO

Foram analisadas oito amostras de kefir produzidos artesanalmente na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras coletadas foram cultivadas em laboratório e os leites fermentados submetidos às análises físico-químicas e microbiológicas. Nas análises físico-químicas foram avaliados os teores de umidade, cinzas, gordura, extrato seco total e desengordurado, proteína, acidez titulável, acidez potenciométrica, pH, atividade de água e cor. Na avaliação microbiológica, as amostras foram submetidas a contagem de bolores e leveduras, bactérias lácticas e análise do número mais provável de coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella sp.*, bactérias lácticas e leveduras. Com a realização deste trabalho, é possível observar que o kefir artesanal da região de estudo tem características semelhantes entre as diferentes amostras, tanto nos parâmetros físico-químicos quanto microbiológicos. No entanto, sugerem-se mais estudos, especialmente em relação ao comportamento microbiológico do kefir.

Palavras-Chave: kefir, análises físico-químicas, análises microbiológicas.

ABSTRACT

Eight kefir samples were analyzed produced by hand in the northwest region of Rio Grande do Sul State. The samples were grown in the laboratory and fermented milks subjected to physicochemical and microbiological analyzes. The physicochemical analyzes determined the moisture, ash, fat, total and degreased dry extract, protein, acidity, titratable acidity, pH, water activity and color. The microbiological evaluation, the samples were subjected to of yeasts and molds counts, analysis the most probable numbers of total and fecal coliforms, *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella sp.*, Lactic acid bacteria and yeasts.

With this work, it is possible to observe that the handmade kefir of the study area has similar features between the different samples, both in the physical - chemical and microbiological parameters. However, further studies suggest themselves, especially with respect to behavior of microbiological kefir.

Keywords: kefir, physicochemical analysis, microbiological analyzes.

INTRODUÇÃO

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos na saúde é conhecido há muito tempo. Apesar disso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados funcionais, e de seus componentes, tornou-se intenso apenas nos últimos anos (MOREIRA et al., 2008)..

Entende-se por kefir o produto cuja fermentação se realiza com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), e bactérias *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (BRASIL, 2007).

O kefir é um produto fermentado que contém vitaminas, aminoácidos, peptídeos, carboidratos, etanol e compostos voláteis. É muito utilizado por suas propriedades sensoriais e uso tradicional na medicina popular, (DINIZ et al., 2003; BERGMANN et al., 2010), deve apresentar as seguintes características: homogeneidade e consistência cremosa; sabor acidulado, picante e ligeiramente alcoólico; acidez menor que 1,0 g de ácido láctico/ 100 g; teor alcoólico entre 0,5 e 1,5 (%v/m); bactérias lácticas totais no mínimo 10^7 UFC/ g; leveduras específicas no mínimo 10^4 UFC/g e acondicionamento em frascos com fecho inviolável (AQUARONE, 2001). Além disso, o kefir é considerado um alimento probiótico por conter uma mistura de micro-organismos, predominantemente de bactérias ácido-láticas e de leveduras, podendo conter também bactérias acéticas (MICHELI et al., 1999). Estes micro-organismos estão suspensos em uma matriz de polissacarídeos (grãos).

O cultivo iniciador do kefir de leite apresenta-se em forma de grãos de forma irregular (às vezes, sua estrutura lembra uma couve-flor), brancos ou amarelados, de consistência elástica, com diâmetro muito variado (1 mm a 3 cm), dependendo das condições de cultivo e manejo. São chamados de grãos de kefir e podem conter uma variável microbiota, com

diversas leveduras e bactérias agrupadas de forma muito organizada; nas camadas periféricas predominam as formas bacilares, provavelmente lactobacilos e, à medida que se avança para o centro, vai aumentando a população de leveduras (ORDÓÑEZ PEREDA, 2005).

Diversos autores têm relatado os benefícios que esse produto apresenta, dentre eles: redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, proteção contra micro-organismos patogênicos, balanço da microbiota intestinal, atividade anticarcinogênica, regeneração hepática, entre outros. Da mesma forma, é constatado que até os dias de hoje o consumo do kefir na sua forma microbiana clássica, não demonstrou características patogênicas e foi capaz de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; ANSELMO et al., 2001).

Sabe-se que o kefir tem efeitos benéficos a saúde, no entanto, sua microbiota é muito variável, dependendo da origem dos grãos e substratos utilizados como açúcar mascavo, leite ou suco de frutas (MICHELI et al. 1999; GUZEL-SEYDIM, 2011). Os micro-organismos presentes no kefir apresentam uma associação simbiótica, porém a composição total dos grãos ainda não está completamente conhecida. Portanto, o produto vai apresentar características diferentes de acordo com sua região de origem e diferentes meios de cultivo.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar o kefir produzido na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, a fim de estabelecer características iniciais da “house flora” dos grãos de kefir e avaliar sua característica físico-química.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias primas:

Foram coletados oito amostras de kefir, oriundo de produção artesanal da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Fabricação do leite fermentado:

A fabricação dos leites fermentados foi realizada no laboratório de microbiologia do Instituto Federal (IF) Farroupilha – Campus Santo Augusto. Para a fabricação dos mesmos, pasteurizou-se leite integral (65°C/ 30 min), após o resfriamento (20°C) inoculou-se os grãos de kefir na proporção de 10% do volume de leite. Em seguida, os leites foram incubados em estufa bacteriológica a 27°C em *over night*, monitorando por medida em potenciômetro digital até pH $4,5 \pm 2$ após transcorrido 8 horas de fermentação, conforme figura 1. É importante destacar que foram utilizados leites diferentes na produção dos mesmos.

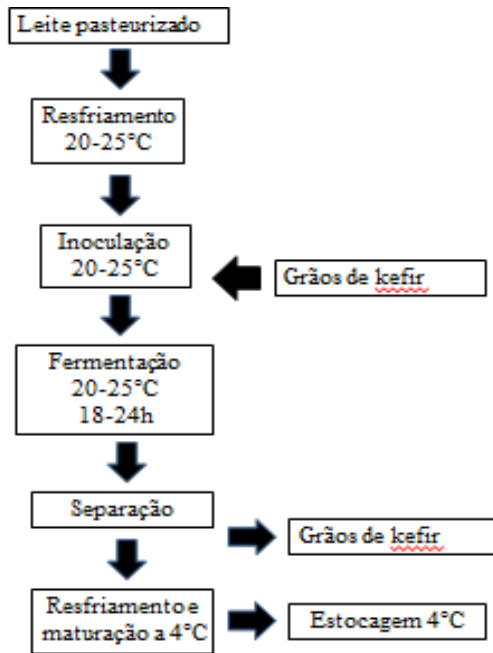


Figura 1 – Fluxograma de produção de kefir.

Determinações físico-químicas:

Foram realizadas análises físico-químicas de composição centesimal. As análises foram feitas em triplicatas em três repetições (n=9). As determinações de teor de umidade, extrato seco total e desengordurado, gordura, fração mineral (cinzas), acidez potenciométrica, acidez titulável, pH, nitrogênio total (NT) e proteína total foram realizadas através dos métodos propostos pela AOAC (2005) e IAL (2008). A cor foi avaliada conforme a Comissão Internacional de Iluminação (CIE, 1986) através do colorímetro Minolta® CR 310 (iluminante C ou D65 e ângulo 10°), pelos parâmetros de cor: L* (luminosidade), a* e b* (coordenadas de cromaticidade), medidos no próprio aparelho. Atividade de água foi determinada em aparelho medidor de atividade de água Aqualab®.

Análises Microbiológicas:

As análises microbiológicas foram realizadas segundo APHA (2002) para coliformes totais, coliformes termotolerantes, *E. coli*, bactérias ácido-láticas (BALs), leveduras, *Salmonella sp.* e *Staphylococcus aureus* coagulase positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização físico-química

Os valores obtidos na determinação da composição físico-química das amostras de kefir estão apresentados na tabela 1.

Os valores de acidez titulável, acidez potenciométrica e pH apresentaram diferença estatística entre as amostras, uma vez que as mesmas são oriundas de diferentes fontes. No entanto, todas as amostras se encontram de acordo com a legislação vigente, a Resolução nº 5 de novembro de 2000, do Ministério da Agricultura. Segundo a resolução o valor de acidez para kefir varia entre 0,5 e 1,5% de ácido láctico (BRASIL, 2000). Quanto ao pH, os valores também estão de acordo, pois ficam em torno de 4,5, conforme encontrado por Souza et al. (1984). Condições de alta acidez e baixo pH contribuem para inibir o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos e deteriorantes que podem vir a representar risco a sanidade do alimento (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Os valores de umidade não apresentaram diferença significativa entre as amostras, onde todas obtiverem valores próximos a 89%, valores estes encontrados também por Jardim et al., (2012). Para os valores de cinzas, da mesma forma não houve diferença significativa entre as amostras, uma vez que todas elas obtiveram valores médios de 0,76%. Resultados encontrados na literatura apresentam variação de 0,3% a 1% de matéria mineral (SANTOS et al., 2012; JARDIM et al., 2012). Garrote, Abraham e De Antoni (1996), encontraram teor 0,7% de cinzas em kefir, valor muito semelhante ao encontrado no presente trabalho. Os valores de gordura das amostras analisadas apresentaram diferença significativa, fato este explicado pela origem do leite utilizado para a produção dos kefires em laboratório, uma vez que o leite utilizado era integral e não foi padronizado, processo este importante na produção de alimentos, uma vez que permite classificar as bebidas de origem lácteas em integrais quando as mesmas apresentam teor mínimo de 3,0% de gordura, semi-desnatadas com teor de gordura entre 2,9 e 0,6% e desnatadas com teor de gordura máximo de 0,5% (BRASIL, 2000).

A Resolução Nº 5 de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, que estabelece os padrões de identidade e qualidade para leites fermentados não contempla os requisitos físico-químicos como umidade, cinzas, extrato seco total (EST) e extrato seco desengordurado (ESD), apresentando somente teor de gordura (g/100g), acidez (g de ácido láctico/100g) e proteínas lácteas (g/100g) (BRASIL, 2000). De acordo com o artigo 476 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, o leite para ser considerado normal deve apresentar EST mínimo

de 11,5% e ESD mínimo de 8,5% (BRASIL, 1952). Desta forma, os valores de extrato seco total e extrato seco desengordurado apresentados nas amostras analisadas (10,72 e 6,68% respectivamente) encontram-se dentro do estipulado na legislação existente, sem apresentar diferença significativa entre as amostras.

Os teores de proteína também não apresentaram diferença significativa, onde o valor médio foi de 4,40%, valores de acordo com o proposto por Garrote, Abraham e De Antoni, (1996) onde o autor apresenta valores de proteína para kefires na faixa de 3,4 a 4,2%, estando em consonância com a IN 62 de 2011 do Ministério da Agricultura, que estipula valores mínimos para a proteína do leite em 2,9% (BRASIL, 2011).

A água é o componente mais abundante no leite e na maioria dos produtos lácteos (TRONCO, 2010). A atividade de água do leite fluído apresenta valor $\geq 0,98$, enquanto os iogurtes e leites fermentados, em geral, apresentam teores de atividade de água entre 0,93 – 0,97% (JAY, 1973). Os valores de atividade de água das amostras de kefir apresentaram uma média de 0,99% sem diferença significativa entre as amostras, valores similares aos encontrados por Oliveira & Damin (2003), que ao analisarem leites fermentados obtiveram valores médios de atividade de água em 0,98%, já Tavares et al., (2011) encontraram valores médios de atividade de água em kefir de 0,98%.

Determinação de cor

Na tabela 2 estão apresentados os resultados referentes aos valores médios dos parâmetros luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) utilizadas para determinação da cor das amostras de kefir.

O valor médio de L^* das amostras de kefir foi de 93,61, e não houve diferença significativa entre as amostras. O parâmetro L^* indica luminosidade e pode determinar valores entre zero (0) e cem (100), sendo denominados preto e branco, respectivamente. Os altos valores de L^* apresentados pelas amostras podem ser justificados pela formulação dos leites fermentados, uma vez que os mesmos foram produzidos a partir de leite com conteúdo integral de gordura e isentos de demais ingredientes como açúcar, por exemplo, os quais aumentam o conteúdo de sólidos nas amostras, o que resulta em uma menor sinérese durante a estocagem do produto e conseqüente menor reflexão da luz (GARCÍA-PÉREZ et al., 2005).

Tabela 1 – Caracterização físico-química de amostras de kefir (leite fermentado) da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul, 2014.

Amostra	Acidez Titulável (%HLA)	Acidez Potenciométrica (%HLA)	pH	Umidade (%)	Cinzas (%)	Gordura (%)	EST (%)	ESD (%)	Proteína (%)	Aa (%)
KO1	0,72±0,04 ^b _c	0,72±0,04 ^c	4,40±0,05 ^c	88,56±0,70 ^a	0,75±0,01 ^a	3,35±0,69 ^c	10,56±0,57 ^a	6,48±0,47 ^a	4,52±0,60 ^a	0,99±0,00 ^a
KO2	0,88±0,03 ^a	0,85±0,02 ^a	4,50±0,01 ^{bc}	89,10±0,73 ^a	0,77±0,00 ^a	4,25±0,66 ^{ab}	10,89±0,73 ^a	6,50±0,26 ^a	4,380,10 ^{±a}	0,99±0,00 ^a
KO3	0,84±0,01 ^a	0,85±0,00 ^a	4,45±0,05 ^{bc}	89,40±0,35 ^a	0,71±0,08 ^a	4,45±0,81 ^a	10,59±0,35 ^a	6,45±0,88 ^a	4,51±0,89 ^a	0,98±0,00 ^b
KN1	0,80±0,00 ^a _b	0,79±0,02 ^{abc}	4,54±0,04 ^{abc}	89,14±0,39 ^a	0,80±0,03 ^a	3,41±0,47 ^c	10,86±0,39 ^a	6,96±0,67 ^a	4,48±0,36 ^a	0,99±0,00 ^{ab}
KN2	0,65±0,14 ^c	0,72±0,11 ^c	4,70±0,23 ^a	89,22±0,10 ^a	0,73±0,01 ^a	4,00±0,26 ^{abc}	10,78±0,10 ^a	6,59±0,22 ^a	4,20±0,61 ^a	0,99±0,00 ^{ab}
KN3	0,82±0,01 ^a	0,77±0,10 ^{bc}	4,55±0,28 ^{abc}	89,18±0,35 ^a	0,75±0,03 ^a	3,81±0,64 ^{abc}	10,82±0,35 ^a	6,86±0,56 ^a	4,45±0,42 ^a	0,99±0,00 ^{ab}
KD1	0,86±0,04 ^a	0,81±0,02 ^{ab}	4,43±0,04 ^{bc}	89,30±0,71 ^a	0,78±0,02 ^a	4,00±0,63 ^{abc}	10,69±0,71 ^a	6,78±0,76 ^a	4,35±0,46 ^a	0,99±0,00 ^{ab}
KD2	0,72±0,01 ^b _c	0,72±0,02 ^c	4,58±0,06 ^{ab}	89,41±0,26 ^a	0,77±0,10 ^a	3,65±0,63 ^{bc}	10,58±0,26 ^a	6,82±0,88 ^a	4,33±0,52 ^a	0,99±0,00 ^{ab}

¹ Os dados são as médias e desvio padrão das amostras.

^{a-c} As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, para cada variável, não diferem entre si a $P < 0,05$ de significância pelo Teste de Tukey.

Tabela 2 – parâmetros luminosidade (L^*) e coordenadas de cromaticidade (a^* e b^*) utilizadas para determinação da cor das amostras de kefir da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Amostra/ Parâmetros de cromaticidade	L^*	a^*	b^*
KO1	94,14 ^a	-3,76 ^a	+7,92 ^a
KO2	93,23 ^a	-3,68 ^a	+7,98 ^a
KO3	93,00 ^a	-3,58 ^{ab}	+7,80 ^a
KN1	94,26 ^a	-3,76 ^{ab}	+8,15 ^a
KN2	93,46 ^a	-3,43 ^{ab}	+8,15 ^a
KN3	93,94 ^a	-3,56 ^{abc}	+8,96 ^a
KD1	94,25 ^a	-3,31 ^{bc}	+10,56 ^a
KD2	92,60 ^a	-3,07 ^c	+8,83 ^a

¹ Os dados são as médias das amostras.

^{a-c} As médias seguidas de uma mesma letra na coluna, para cada variável, não diferem entre si a $P < 0,05$ de significância pelo Teste de Tukey.

** L^* variando de 0 (preto) a 100 (branco); a^* variando do vermelho ($+a^*$) ao verde ($-a^*$) e b^* variando do amarelo

($+b^*$) ao azul ($-b^*$).

As coordenadas de cromaticidade a^* e b^* indicam as direções das cores, desta forma, $a^* > 0$ é a direção do vermelho, $a^* < 0$ é a direção do verde; $b^* > 0$ é a direção do amarelo e $b^* < 0$ é a direção do azul. O valor médio de a^* foi de $-3,52$ e houve variação entre as amostras em relação a esse atributo, porém em todas elas é possível afirmar que o valor a^* negativo indica a ausência de coloração vermelha e também que há pouca participação da cor verde, o que confirma altos valores de L^* . Em relação aos valores de b^* , o valor médio das amostras foi de $8,54$, e não houve diferença significativa entre as amostras. Valores de b^* positivos indicam uma tendência ao amarelo, o que pode ser justificado devido ao teor integral de gordura das amostras. Formulações integrais apresentam maior luminosidade (L^*), menor valor de a^* e maior valor de b^* (MONTANUCI, 2010).

Avaliação Microbiológica

Na tabela 3 estão apresentados os resultados da avaliação microbiológica de amostras de kefir da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Tabela 3 – Avaliação microbiológica de amostras de kefir da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Micro-organismo/Amostra	KO1	KO2	KO3	KN1	KN2	KN3	KD1	KD2
Coliformes Totais Log ₁₀ .NMP/mL	6,09 ^a	7,33 ^a	6,94 ^a	6,89 ^a	7,93 ^a	8,11 ^a	6,09 ^a	6,09 ^a
Coliformes Termotolerantes Log ₁₀ . NMP/mL	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Salmonella sp.</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BALS Log ₁₀ . UFC/mL	7,87 ^c	8,14 ^d	7,88 ^c	8,13 ^d	8,43 ^b	8,34 ^c	8,17 ^d	8,79 ^a
Leveduras Log ₁₀ . UFC/mL	6,31 ^c	6,31 ^c	6,70 ^{ab}	6,70 ^{ab}	6,77 ^a	5,0 ^e	5,4 ^d	6,43 ^{bc}

¹ Os dados são as médias das amostras.

^{a-e} As médias seguidas de uma mesma letra na linha, para cada variável, não diferem entre si a $P < 0,05$ de significância pelo Teste de Tukey.

O grupo coliforme é um agente indicativo das condições higiênico-sanitárias dos produtos lácteos. Populações maiores que $2 \log_{10}$ UFC/mL são indicativos de más práticas de higiene e contaminação ambiental (ORTOLANI, 2009). Quanto à contagem de coliformes totais, todas as amostras analisadas se encontraram fora do máximo estipulado pela legislação brasileira ($0,6 \log_{10}$ UFC/mL) que estabelece os Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, IN nº5 e, portanto, com condições higiênico-sanitárias insatisfatória (BRASIL,2000). No entanto, nenhuma das amostras apresentou contagem de coliformes termotolerantes, o que é importante do ponto de vista sanitário e indica que o processo fermentativo das amostras de kefir exerce uma função de bioconservação e estabilização microbiológica no produto, sendo necessários estudos mais aprofundados para elucidação desse fenômeno.

A contagem de bactérias ácido-láticas e leveduras é de grande importância no kefir, visto que, a legislação brasileira estipula que para esse produto a contagem mínima das BALs deve ser de 10^7 UFC/mL e para leveduras 10^5 UFC/mL (BRASIL, 2000). Todas as amostras avaliadas apresentaram contagem superiores a 10^7 UFC/mL. Entre as amostras houve diferença significativa para a contagem dessas bactérias. Fato este, justificado pela origem variada das amostras, pois foram coletadas em diferentes produtores que possuem formas de cultivo diversas, possibilitando variação quanto a quantidade da microbiota. Da mesma forma, todas as amostras avaliadas quanto a contagem de leveduras, apresentaram contagem superior a 10^5 UFC/mL e também apresentaram diferenças significativas entre as amostras.

Magalhães et al. (2011), ao analisarem kefir da região sul do estado de Minas Gerais, obtiveram valores entre 5 e $10 \log_{10}$ UFC/mL para bactérias ácido-láticas e valores entre 6 e $8 \log_{10}$ UFC/mL para leveduras, o que indica semelhança entre os resultados obtidos nesse estudo, mesmo que em regiões geográficas diferentes.

CONCLUSÕES

De acordo com os dados obtidos nesse trabalho é possível verificar as características físico-químicas e microbiológicas do kefir produzido artesanalmente na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. O kefir consumido na região é produzido de forma artesanal, e mesmo apresentando indicativos de falta de higiene e de tecnologia de fabricação, não apresentou risco sanitário, o que pode ser justificado devido às características das bactérias ácido-láticas presentes naturalmente nesse alimento e seu potencial efeito antagônico frente às bactérias patogênicas. Dessa forma, é preciso mais estudos para a verificação do potencial funcional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, Washington, 2002.

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

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U. A. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Blucher, v. 4, 2001.

BERGMAN, R.S.O. ; PEREIRA, M.A.; VEIGA, S.M.O.M.; SCHNEEDORF, J.M. OLIVEIRA, N.M.S.; FIORINI, J.E. Microbial profile of a kefir sample preparations grains in natura and lyophilized and fermented suspension. **Cien. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, n.4: 1022-1026, out.- dez. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. **Inspeção industrial e sanitária do leite e derivados**. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução – nº 5. **Padrões de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados**, de 13 de Novembro de 2000.

_____. Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**, de 23 de Outubro de 2007.

_____.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 62. **Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite**. de 29 de Dezembro de 2011.

COMISSION INTERNACIONALE DE L'ECLAIRAGE – CIE, **CIE Publication 15.2**. Viena: Central Bureau of the CIE, 1986.

DINIZ, R.O; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T.; SCHNEEDORF, J.M. Atividade Antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Ver. Bras. Farmacon**, v. 13, supl., p. 19-21, 2003.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

GARCÍA-PÉREZ, F.J.; LARIO, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; SAYAS, E.;PÉREZ-ALVAREZ, J.A.; SENDRA, E. Effect of Orange fiber addition on yogurt color during fermentation and cold storage. **Industrial Applications**, v. 30, n.6, p. 457-463, 2005.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **LWT – Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, 77 – 84, jan. 1996.

GUZEL-SEYDIM, Z., KOK-TAS, T.; GRENE, A.K. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 51, n. 3, p. 261-268, 2011.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1ª edição digital. São Paulo. 1020 p. 2008.

JARDIM, F.B.B.; SANTOS, E.N.F.; ROSSI, D.A.; MELO, R.T.; MIGUEL, D.P.; ROSSI, E.A.; SYLOS, C.M. Desenvolvimento de bebida láctea potencialmente probiótica carbonatada: características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.23, n. 2, p. 275-286, abr./jun. 2012.

JAY, M. Janes. **Microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza (Espana): Acribia, 1973.

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

MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, G.V.M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R.F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42, p.693-702,

MICHELI, L. UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** p.53-69, 1999.

MONTANUCI, F.D. **Bebidas de kefir com e sem inulina em versões integral e desnatada: elaboração e caracterização química, física, microbiológica e sensorial**. 2010. 142 p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Curso de Pós Graduação em Ciência de Alimentos – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2010.

MOREIRA, M.E.C. e col. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, Vol. 31, No. 7, 2008.

OLIVEIRA, M.N.; DAMIN, M.R. Efeito do teor de sólidos e da concentração de sacarose na acidificação, firmeza e viabilidade de bactérias do iogurte e probióticas em leite fermentado. **Ciênc. Tecn. Aliment.**, Campinas, v. 23, p. 172-176, dez. 2003.

ORDÓÑEZ PEREDA, J.A. et al. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal**. Vol. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005.

ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bactericinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

SANTOS, G.; COSTA, J.A.M.; CUNHA, V.C.M.; BARROS, M.O.; CASTRO, A.A. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do leite fermentado probiótico desnatado adicionado de jenipapo desidratado osmoticamente. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, set./out., v. 67, n° 388, p.61-67, 2012.

SOUZA, G.; GARCIA,S. VALLE, J.L. Kefir e sua tecnologia: aspectos gerais. **Boletim Ital**, v. 21, p. 137-155, 1984.

TAVARES, I. M. C.; SILVA, L. M.; TAVARES, M. G. C.; GONZAGA, J. L.; FERRÃO, S. P. B. Desenvolvimento e análises físico-químicas de bebida láctea fermentada com grãos de kefir. **Higiene Alimentar**, v. 25, p. 339-341, 2011.

TRONCO, V.M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Santa Maria: Editora da Universidade Federal de Santa Maria, 2010, 294 p.

3.3 Manuscrito 3

Estudo das características de potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isoladas de Kefir produzido artesanalmente na região Noroeste do Rio Grande de Sul
Study of potential probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kefir produced by hand in the Rio Grande de Sul Northwest

RESUMO

Foram analisadas oito amostras de kefir produzidos artesanalmente na região noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. As amostras coletadas foram cultivadas em laboratório e de cada amostra foram realizadas contagens de bactérias ácido-láticas e isoladas cinco colônias. Posteriormente foram realizados testes fenotípicos de morfologia, coloração de Gram e catalase. Os isolados que apresentaram características de bactérias ácido-láticas foram submetidas aos testes de atividade antagonista frente a bactérias patogênicas, resistência a sais biliares e condições de pH ácido. Com a realização deste trabalho, é possível observar que o kefir artesanal cultivado e consumido na região de estudo tem características semelhantes entre as diferentes amostras, onde os isolados apresentarem um incipiente potencial probiótico. No entanto, sugerem-se mais estudos, especialmente em relação ao comportamento microbiológico para avaliar mais parâmetros que classifique esse alimento como funcional.

Palavras-Chave: kefir, antagonismo, resistência a sais biliares, resistência a pH ácido, probiótico.

ABSTRACT

Eight kefir samples were analyzed produced by hand in the northwest of Rio Grande do Sul. The samples were cultured in the laboratory and each sample of lactic acid bacteria isolated and five colonies counts were performed. Later tests were performed phenotypic morphology, Gram stain and catalase. The isolates with characteristics of lactic acid bacteria were submitted to the antagonistic activity against testing the pathogenic bacteria, resistance to bile salts and acid pH conditions. With this work, is possible to observe that the grown handmade kefir and consumed in the study area have similar characteristics between different samples, where isolates have an incipient potential probiotic. However, we suggest further studies, especially in relation to microbiological behavior to assess more parameters to classify this as a functional food.

Keywords: kefir, antagonism, resistance to bile salts, the pH acid resistance, probiotic.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as exigências dos consumidores de alimentos mudaram consideravelmente. Os consumidores acreditam cada vez mais que os alimentos contribuem diretamente para a sua saúde (YOUNG, 2000; MOLLET & ROWLAND, 2002). Alimentos hoje não se destinam apenas em satisfazer a fome e fornecer os nutrientes necessários aos seres humanos, mas também, para prevenir doenças relacionadas à nutrição e melhorar o físico e o bem-estar mental dos consumidores (ROBERFROID, 2000; MENRAD, 2003). Desta forma, os alimentos funcionais desempenham um papel importante no aumento da procura destes produtos devido ao aumento do custo dos cuidados de saúde, o aumento constante da expectativa de vida e do desejo das pessoas com idade mais avançada de melhorar sua qualidade de vida (KOTILAINEN et al., 2006). Apesar dos benefícios a saúde devido à ingestão de alguns alimentos já ser conhecido há muito tempo, os estudos sobre esses alimentos, denominados de funcionais, é recente.

O kefir é um produto lácteo com característica única, em virtude da combinação do ácido láctico e fermentação alcoólica da lactose no leite. É produzido pela atividade microbiana simbiótica dos grãos de kefir que têm um equilíbrio relativamente estável e específico de bactérias do ácido láctico e leveduras (GUZEL-SEYDIM et al., 2011; LEITE et al., 2013). O leite é fermentado com uma microbiota mista confinada a uma matriz de grãos de kefir descontínuos, que são recuperados depois da fermentação (KOLLING & RICHARDS, 2004).

Diversos autores têm relatado os benefícios que esse produto apresenta, dentre eles: redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, proteção contra microorganismos patogênicos, balanço da microbiota intestinal, atividade anticarcinogênica, regeneração hepática, entre outros. Da mesma forma, é constatado que até os dias de hoje o consumo do kefir na sua forma microbiana clássica, não demonstrou características patogênicas e foi capaz de suprimir o crescimento de alguns patógenos como *Salmonella* e *Shigella* (KOROLEVA, 1988; ANSELMO et al., 2001).

O kefir é utilizado no Brasil como um produto da medicina popular, tendo hoje diversos efeitos probióticos relacionados à sua utilização. No entanto, o kefir, como bebida fermentada, tem divulgação recente no Brasil, sua fabricação e consumo são exclusivamente artesanais, sendo obtido pela fermentação do grão em leite ou em água adicionada de açúcar mascavo. A maioria das pessoas em nosso país desconhece o produto, bem como os possíveis benefícios da inclusão deste alimento probiótico na dieta (CARNEIRO, 2010).

As BALs são encontradas em abundância no kefir e constituem sua microbiota natural. Trata-se de um grupo de micro-organismos Gram-positivos comumente utilizados na indústria de laticínios na elaboração de produtos lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (MADERA et al., 2003). Produzem um grande número de enzimas glicolíticas, proteolíticas e lipolíticas, transformando os nutrientes do meio em compostos com propriedades sensoriais complexas, os quais modificam gradativamente a textura e o aroma dos alimentos fermentados (PIARD et al., 1999).

Atividades antagônicas de cepas probióticas são essenciais para prevenir a infecção ou invasão de bactérias patogênicas. As cepas do gênero *Bacillus*, por exemplo, são conhecidas por produzir uma ampla gama de substâncias antimicrobianas, incluindo antibióticos peptídicos e lipopeptídicos (ABRIOUEL et al., 2011). É reconhecido o papel da alimentação na promoção da saúde e proteção contra doenças. A comunidade científica já reconhece que os efeitos da alimentação inadequada em etapas precoces da vida podem acarretar consequências na saúde na vida adulta (MOREIRA, 2008).

Desta forma, este trabalho tem como objetivos estudar as características do kefir produzido na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, a fim de estabelecer uma identidade inicial da “*house flora*” dos grãos de kefir, avaliando seu potencial probiótico, através de teste de antagonismo frente a bactérias patogênicas e testes de resistência a condições ácidas e sais biliares, para selecionar cepas que servirão de starter na elaboração de produtos lácteos funcionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matérias-primas:

Foram coletadas oito amostras de kefir, oriundas de produção caseira da região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.

Fabricação do leite fermentado:

A fabricação dos leites fermentados foi feita no laboratório de microbiologia do IF Farroupilha – Câmpus Santo Augusto. Para a fabricação dos mesmos, utilizou-se leite UHT “*Ultra High Temperature*” padronizado, após o resfriamento inoculou-se os grãos de kefir na proporção de 10% do volume de leite. Em seguida, os leites foram incubados em estufa a 27°C em *over night* (aproximadamente 12 horas), até pH 4,5, monitorando através de medida em potenciômetro digital de hora em hora, após as 8 primeiras horas de fermentação.

Determinação da atividade antagonista das BALs frente a micro-organismos patogênicos:

A partir dos 8 isolados de bactérias lácticas foram coletadas cinco colônias aleatoriamente totalizando quarenta, estes foram purificadas em ágar MRS (Oxoid®) e avaliadas quanto à morfologia, coloração de Gram e catalase. Posteriormente, os isolados identificados como Gram positivos e catalase negativa, foram transferidos para caldo MRS (Oxoid®), onde foram cultivadas por 18 – 24h e, ainda com a cultura fresca, foi realizada a determinação da atividade antagonista.

A atividade antagonista foi testada frente a linhagens de referência Gram positivas: *Listeria monocytogenes* ATCC 7466 e *Staphylococcus aureus* ATCC 1901, bem como Gram negativas: *E. coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 13076 e *Salmonella enteritidis* ATCC 13076.

O teste de antagonismo e a leitura dos halos de inibição foram realizados de acordo com o teste da gota (*spot-on-the-lawn*) proposto por Jacobsenet al. (1999). Uma alíquota de 5 µL de cada cultivo, em caldo MRS (Oxoid®), foi inoculada, em forma de gotas, em placas contendo ágar MRS (Oxoid®). Após a absorção das gotas, as placas foram incubadas a 35 °C em jarra de anaerobiose por 24 h. Decorrido este período, cada placa recebeu uma sobre camada de 10 mL de ágar BHI (Oxoid®) semi-sólido (0,8%) contendo aproximadamente 10⁶ UFC/mL da cultura de referência previamente cultivada em caldo BHI (Oxoid®) por 24 h. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas, em aerobiose, a 35 °C por 24 h. O resultado positivo para atividade antagonista em relação à cultura de referência e controle positivo foi determinado pela formação de halo de inibição. O diâmetro dos halos foi medido utilizando um paquímetro digital 200 MM⁸ (Marca Marberg® – China).

Resistência a condições ácidas e sais biliares

A resistência dos isolados sob diferentes condições ácidas foi utilizada como critério de seleção dos isolados mais resistentes para realização sequencial dos demais experimentos, já que inicialmente as BALs probióticas devem resistir às condições ácidas estomacais. Ressalta-se que esta se torna condição essencial quando os micro-organismos não são protegidos por meio de encapsulação. Assim, a resistência dos isolados foi avaliada em caldo MRS (pH 6,5) (Oxoid) ajustado a pH 2 e 2,5 com HCl concentrado e ainda a pH 2,5 + pepsina (Sigma) (3mg/mL).

A avaliação da tolerância bacteriana a sais biliares foi realizada em caldo MRS (Oxoid) suplementado com bile bovina (Sigma) a 0,3% e 1,0% (m/v). Após preparação dos caldos, conforme tratamentos mencionados acima, culturas de 24 h com concentração final

entre 10^6 e 10^7 UFC/mL foram inoculadas. A sobrevivência sob diferentes condições foi avaliada por contagem em placas com limite de detecção de $1,7 \log_{10}$ UFC/mL, ambas as avaliações seguiram o protocolo de Perelmuter et al. (2008). O percentual de sobrevivência dos isolados frente às diferentes condições ácidas e aos sais biliares foi calculado com base nas contagens de células viáveis iniciais, anterior ao período de incubação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolamento

Foram selecionadas e purificadas 40 colônias características de BALs das placas de ágar MRS utilizadas para o isolamento. Destas, 100% sobreviveram e foram submetidos à caracterização morfológica e teste da catalase. Observou-se, então, que todos os isolados apresentaram morfologia de cocobacilo, Gram positivos e catalase negativos.

Segundo Moraes et al. (2010), a população microbiana de cada produto lácteo varia de acordo com a região geográfica onde este é produzido, podendo se atribuir variações em razão do leite utilizado, do clima predominante e dos métodos empregados no processamento. Sabe-se que a microbiota nativa encontrada em produtos provenientes de fermentação natural de alimentos de origem animal é bastante diversificada.

Determinação da atividade antagonista das BALs frente a micro-organismos patogênicos:

Foram testados cinco isolados de cada amostra, conforme tabela 1, onde foi possível observar a formação de halos de inibição em todos os isolados. Os resultados demonstram que a sensibilidade às substâncias produzidas pelas bactérias lácticas e liberadas no meio extracelular varia de acordo com o patógeno e com o isolado do kefir. Muitas espécies de BALs são capazes de produzir uma variedade de compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, polissacarídeos e bacteriocinas que apresentam potencial no controle de patógenos e bactérias de deterioração durante a produção e armazenamento dos alimentos (SANTOS et al., 2012).

A ação antagonista de BALs nativas já foi descrita por diversos autores (SCHILLINGER e LUCKE, 1999; JONES et al., 2008; NERO et al., 2008; ORTOLANI, 2009; SAWITZKI et al., 2009), principalmente em relação a patógenos Gram positivos. A presença da dupla camada lipídica (membrana externa) de bactérias Gram negativas impede a interação das substâncias antagonistas específicas, como bacteriocinas, com a parede e a membrana plasmática. Porém, outros trabalhos demonstram a existência de BALs nativas com

potencial antagônico também contra patógenos Gram negativos (NERO et al., 2008 ; MEIRA et al., 2010).

As médias dos halos de inibição observadas frente ao *Clostridium sp.*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* foram, respectivamente 19,76 mm, 26,38 mm, 25,60 mm, 19,57 mm e 20,67 mm. A diferença nas medidas dos halos de inibição dos isolados é sugestiva de que os micro-organismos pertencem a diferentes espécies ou linhagens, onde houve variação inclusive em cepas isoladas da mesma amostra de leite fermentado.

Em estudos similares, Santos et al. (2012), trabalhando com micro-organismos de grãos de kefir, isolaram *Lactobacillus* com atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis* observaram maiores halos de inibição contra *L. monocytogenes*. Já Dias (2011), em estudo similar obteve maiores halos de inibição contra *Salmonella enteritidis*, enquanto no presente estudo foi observado maiores halos de inibição das cepas de BALs isoladas frente à bactéria *Salmonella typhimurium*, o que pode ser justificado pela ampla diversidade dessas bactérias, que se diferenciam pelo modo de cultivo, origem geográfica, entre outros fatores.

Resistência a condições ácidas e sais biliares

Para a triagem inicial de potenciais bactérias probióticas, testes *in vitro* são recomendados pela FAO/WHO (2001).

As bactérias probióticas fornecidas por meio de sistemas alimentares devem primeiramente sobreviver durante a passagem pelo trato gastrointestinal para, então, persistirem no intestino e promover efeitos benéficos ao hospedeiro. Para isso, devem apresentar como critérios funcionais: tolerância à acidez e a sais biliares e capacidade de adesão à mucosa intestinal. Adicionalmente, atividade antagonista é outro requisito fundamental para a sobrevivência no intestino (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; HUANG; ADAMS, 2004; SCHILLINGER et al., 2005).

Tolerância ao pH ácido

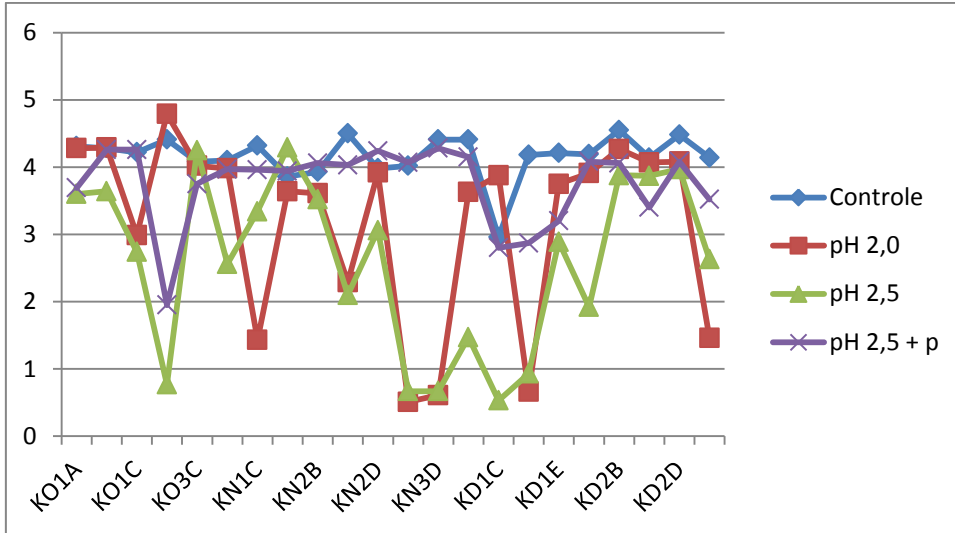
Antes das culturas probióticas serem capazes de exercer efeito no intestino, devem permanecer vivas durante a ingestão em ambientes agressivos do trato gastrointestinal, que inclui condições ácidas do estômago. A sobrevivência dos micro-organismos no suco gástrico depende de sua capacidade de tolerar pH ácido. Nas figuras que seguem (1a, 1b, 2a, 2b e 3)

estão apresentados o comportamento somente dos isolados que suportaram os tratamentos frente aos diferentes tempos e pHs.

Tabela 1 – Atividade antagonista de BALs nativas de kefir de produção artesanal da região Noroeste do RS, frente a patógenos de referência, com base na medida dos halos de inibição (mm).

Cepa	<i>Clostridium</i> <i>sp.</i>	<i>Salmonella</i> <i>typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> <i>enteritidis</i>	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	<i>Stafilococcus</i> <i>aureus</i>
KO1A	18,72±0,51	22,19±0,03	19,85±0,14	13,07 ±0,00	26,73 ±0,12
KO1B	25,25±0,71	27,09±0,23	17,76±0,28	13,00 ±0,50	16,32 ±0,45
KO1C	27,11±0,21	25,28±0,31	19,46±0,04	12,81 ±0,20	22,72 ±0,54
KO1D	25,02±0,92	32,20±0,01	16,54±0,63	14,22 ±0,10	26,52 ±0,78
KO1E	24,66±0,25	20,51±0,98	13,86±0,35	13,96 ±0,10	23,95 ±0,08
KO2A	15,73±0,20	24,24±0,57	34,84±0,09	22,15 ±0,47	24,48 ±0,36
KO2B	17,12±0,01	32,43±0,51	33,03±0,73	21,47 ±0,25	22,61 ±0,11
KO2C	16,21±0,72	30,88±0,62	33,52±0,56	19,82 ±0,90	23,12 ±0,01
KO2D	14,12±0,02	15,20±0,05	27,25±0,53	16,76 ±0,15	21,80 ±0,14
KO2E	11,90±0,04	27,40±0,78	34,01±0,65	17,19 ±0,53	19,85 ±0,28
KO3A	21,79±0,20	30,77±0,05	25,25±0,11	27,84 ±0,15	19,67 ±0,28
KO3B	18,12±0,83	33,01±0,18	33,57±0,48	28,98 ±0,26	29,32 ±0,62
KO3C	23,26±0,36	34,45±0,55	30,94±0,31	28,42 ±0,71	14,45 ±0,39
KO3D	27,67±0,32	37,70±0,42	32,55±0,67	32,95 ±0,13	16,82 ±0,85
KO3E	23,36±0,25	34,73±0,74	37,25±0,14	25,89 ±0,32	13,13 ±0,86
KN1A	20,13±0,32	34,74±0,56	24,57±0,83	20,13 ±0,14	12,47 ±0,75
KN1B	24,54±0,61	36,72±0,49	26,40±0,38	24,54 ±0,65	23,30 ±0,31
KN1C	23,32±0,62	24,02±0,17	28,02±0,04	23,32 ±0,96	21,59 ±0,93
KN1D	14,61±0,14	32,49±0,52	25,11±0,13	14,61 ±0,56	17,34 ±0,69
KN1E	15,32±0,26	37,37±0,51	22,03±0,80	18,41 ±0,94	23,11 ±0,84
KN2A	19,01±0,51	27,24±0,65	28,52±0,59	19,53 ±0,46	27,71 ±0,35
KN2B	16,06±0,19	24,19±0,57	30,14±0,12	24,54 ±0,65	28,34 ±0,28
KN2C	16,48±0,23	18,14±0,25	27,92±0,44	16,39 ±0,86	24,98 ±0,67
KN2D	15,56±0,02	19,14±0,57	29,65±0,13	15,12 ±0,05	20,70 ±0,13
KN2E	16,34±0,05	25,29±0,73	32,67±0,66	15,86 ±0,14	17,01 ±0,38
KN3A	21,45±0,98	23,90±0,81	21,45±0,98	18,83 ±0,20	17,21 ±0,34
KN3B	18,06±0,27	24,27±0,24	22,67±0,35	22,06 ±0,28	17,10 ±0,08
KN3C	17,85±0,85	24,80±0,40	21,56±0,14	21,16 ±0,02	14,72 ±0,39
KN3D	21,20±0,25	23,53±0,08	21,20±0,25	20,40 ±0,29	18,41 ±0,79
KN3E	21,45±0,09	20,18±0,08	21,76±0,40	15,47 ±0,20	19,10 ±0,17
KD1A	16,04±0,91	13,36±0,17	26,92±0,82	21,08 ±0,71	21,97 ±0,23
KD1B	14,52±0,13	14,07±0,14	29,85±0,09	20,74 ±0,23	10,67 ±0,26
KD1C	15,46±0,49	13,83 ±0,14	18,69±0,55	21,69 ±0,05	14,88 ±0,19
KD1D	15,11±0,26	16,40 ±0,84	25,58±0,80	21,17 ±0,37	15,39 ±0,83
KD1E	15,23±0,25	16,38 ±0,14	14,40±0,24	22,52 ±0,07	13,60 ±0,01
KD2A	27,76±0,53	31,30 ±0,73	31,59±0,89	15,29 ±0,81	29,61 ±0,04
KD2B	23,80±0,00	34,22 ±0,92	30,51±0,18	14,15 ±0,04	17,93 ±0,89
KD2C	26,51±0,57	30,64 ±0,56	18,04±0,33	15,05 ±0,21	28,61 ±0,52
KD2D	19,77±0,47	32,23 ±0,93	16,71±0,68	16,24 ±0,03	27,31 ±0,02
KD2E	24,96±0,52	28,82 ±0,43	18,19±0,73	15,78 ±0,52	29,00 ±0,15

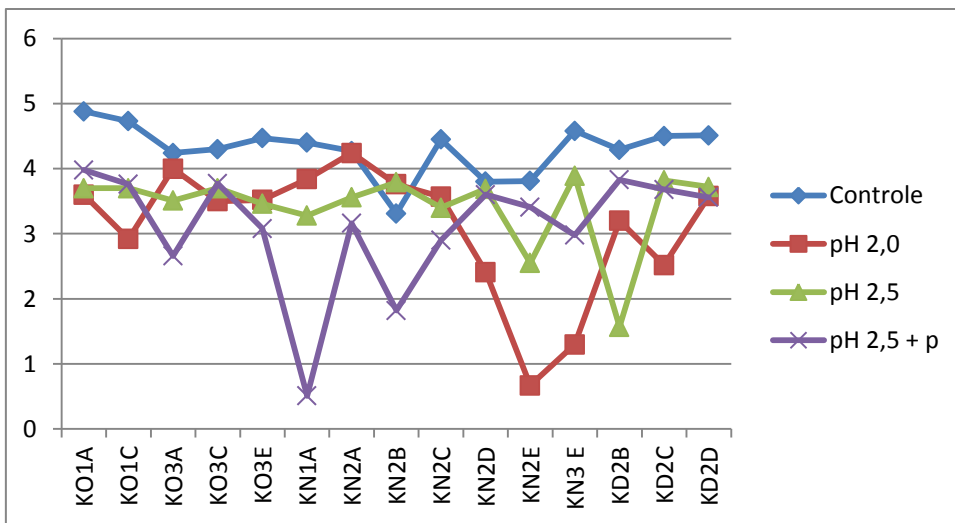
Valores expressos como médias e desvio padrão de triplicatas.



Controle: amostra sem tratamento.

pH 2,5 + p: tratamento com pH 2,5 e enzima pepsina.

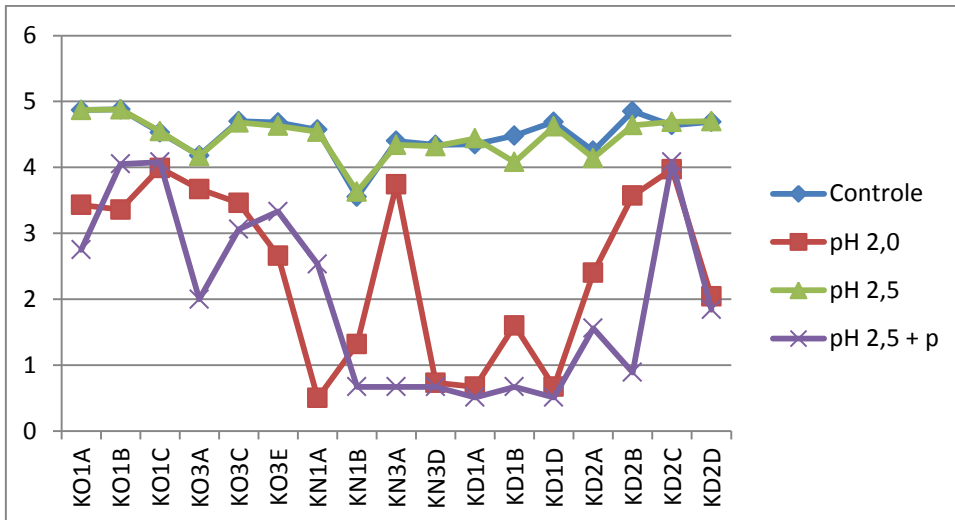
Figura 1a – Comportamento dos isolados de BALs frente a condições ácidas no tempo zero (sem incubação).



Controle: amostra sem tratamento.

pH 2,5 + p: tratamento com pH 2,5 e enzima pepsina.

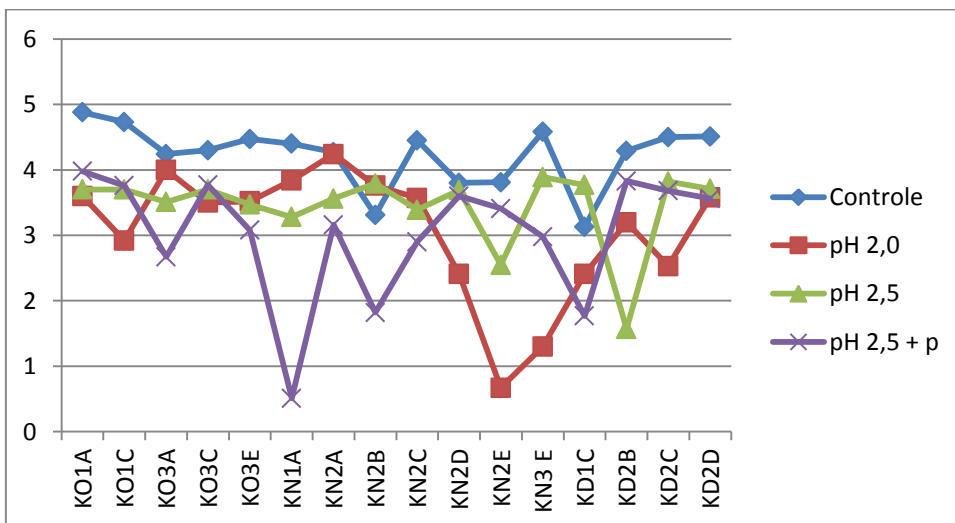
Figura 1b – Comportamento dos isolados de BALs frente a condições ácidas no tempo um (após uma hora de incubação).



Controle: amostra sem tratamento.

pH 2,5 + p: tratamento com pH 2,5 e enzima pepsina.

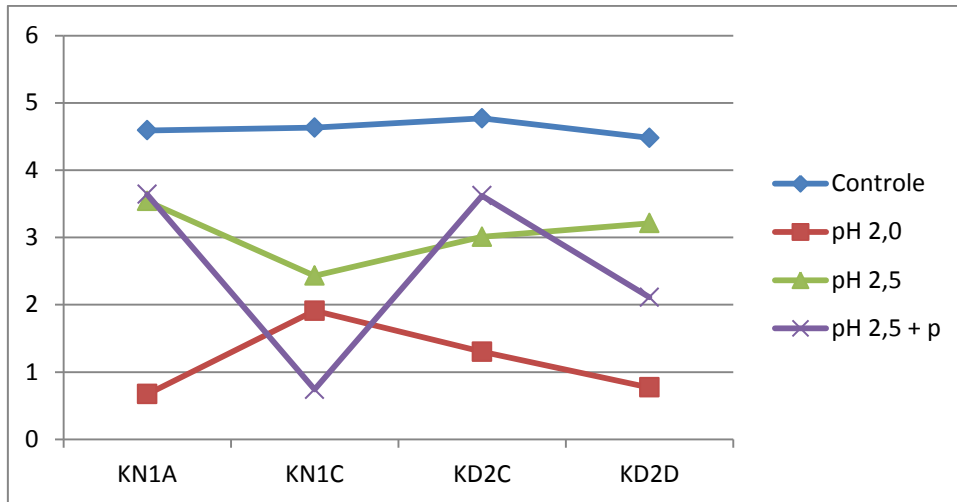
Figura 2a – Comportamento dos isolados de BALs frente a condições ácidas no tempo dois (após duas horas de incubação).



Controle: amostra sem tratamento.

pH 2,5 + p: tratamento com pH 2,5 e enzima pepsina.

Figura 2b – Comportamento dos isolados de BALs frente a condições ácidas no tempo três (após três horas de incubação).



Controle: amostra sem tratamento.

pH 2,5 + p: tratamento com pH 2,5 e enzima pepsina.

Figura 3 – Comportamento dos isolados de BALs frente a condições ácidas no tempo quatro (após quatro horas de incubação).

Conforme as figuras 1a, 1b, 2a, 2b e 3, é possível observar que parte dos isolados avaliados apresentaram comportamento similar nos tratamentos, onde 4 deles resistiram em até 4 horas de exposição aos diferentes pHs ácidos. Isso indica que os isolados avaliados, foram capazes de suportar condições ácidas, o que é uma importante característica probiótica.

De acordo com Charteris et al. (1997), o percentual de redução inferior a 30% da população inicial, torna-se condição essencial para classificação de um micro-organismo como resistente às condições de estresse estomacal. Redondo (2008), investigando características probióticas *in vitro* de *E. faecium* CRL 183, encontrou perda de viabilidade, deste isolado, de aproximadamente 20% ao final das 3 horas, similarmente ao comportamento obtido pelos isolados desse estudo.

A tabela 3 apresenta a porcentagem de sobrevivência de 27 isolados que apresentaram-se mais viáveis ao longo dos testes. De acordo com os dados apresentados pode-se observar que houve maior taxa de sobrevivência nos pHs 2,5 e 2,5 com pepsina, onde de um total de 27 isolados, 44% sobreviveram em pH 2,5 e 40% em pH 2,5 com pepsina. Dados similares foram encontrados por Carasi et al., 2014, onde ao submeterem seis isolados de bactérias ácido-láticas de kefir obtiveram 50% de sobrevivência nas mesmas condições de pH. Santos et al. (2003) ao submeterem isolados de bactérias ácido-láticas de kefir ao pH 2,5 observaram que houve sobrevivência dos mesmos, porém sem apresentarem crescimento. Já Zatini et al. (2015) ao aplicarem a mesma avaliação em 52 isolados de bactérias ácido-láticas de kefir em pH 2,5, obtiveram apenas 19% de sobrevivência dos mesmos.

Tolerância a sais biliares

Outra barreira que as bactérias probióticas devem transpor no organismo é a bile presente no intestino delgado, no qual o tempo de trânsito do alimento é geralmente entre 1 a 4 horas. Os sais biliares são os principais componentes da bile, capazes de desorganizar a estrutura de membranas celulares e, dessa forma, tóxicos às células vivas (BEGLEY et al., 2006). Na Tabela 4 é possível observar a tolerância dos isolados de BALs frente à bile bovina a 0,3% e 1,0%, após uma e quatro horas de incubação.

De acordo com os dados obtidos, verifica-se que os isolados avaliados quanto à resistência aos sais biliares obtiveram comportamento semelhante entre si, em relação à capacidade de sobrevivência a essas condições nos tempos avaliados. Estes resultados são promissores e demonstram o potencial de tais isolados serem utilizados como probióticos, já que a concentração de sais biliares entre 0,15 e 0,3% tem sido recomendada para a avaliação *in vitro* da passagem pelo intestino delgado (HUANG; ADAMS, 2004).

Na tabela 3, é possível observar a contagem das BALs de 27 isolados selecionados frente aos diferentes tratamentos com bile bovina, onde apenas o isolado KN2D não sobreviveu aos tratamentos. No tratamento com bile a 0,3%, 48% dos isolados, além de resistirem a essa condição, ainda apresentaram crescimento. Já no tratamento com 1% de bile bovina, 30% dos isolados apresentaram crescimento. Destaca-se o isolado KN2B que apresentou crescimento nos dois tratamentos, o que indica uma grande resistência a essas condições. Carasi et al. (2014) ao submeterem 52 isolados de bactérias ácido-láticas de kefir ao teste de resistência às condições biliares, observaram 79% de sobrevivência das mesmas, resultado muito semelhante à Santos et al. (2003), onde obtiveram 80% de sobrevivência ao submeterem 58 isolados de bactérias ácido-láticas de kefir aos mesmos tratamentos.

Tabela 2 – Avaliação da sobrevivência total (%ST) de BALs frente a diferentes pHs, com base na contagem de células viáveis, após quatro horas de incubação.

Isolado	Controle	pH 2,0		pH 2,5		pH 2,5 + pepsina	
	log/UFC	log/UFC	%ST	log/UFC	%ST	log/UFC	%ST
KO1A	4,87	0	0,00	3,83	78,64	0	0,00
KO1B	4,88	4,1	84,02	3,53	72,34	0	0,00
KO1C	4,53	4,1	90,51	3,53	77,92	0	0,00
KO3A	4,95	0	0,00	0	0,00	0,74	14,94
KO3C	4,7	0,71	15,11	2,23	47,45	0	0,00
KO3E	4,74	0	0,00	3,39	71,52	3,65	77,00
KN1A	4,57	0,67	14,66	3,54	77,46	3,64	79,64
KN1B	3,95	0	0,00	0	0,00	3,02	76,45
KN1C	4,4	1,91	43,41	2,43	55,23	0,74	16,81
KN2A	4,39	0	0,00	0	0,00	2,28	51,93
KN2B	4,42	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KN2C	4,37	0	0,00	1,85	42,33	0,81	18,54
KN2D	4,18	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KN2E	4,41	0	0,00	0	0,00	0,67	15,19
KN3B	4,35	0	0,00	3,39	77,93	0,84	19,31
KN3C	4,39	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KN3D	4,34	0	0,00	0	0,00	1,19	27,42
KN3 E	4,4	0	0,00	3,38	76,82	0	0,00
KD1A	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KD1B	4,48	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KD1C	4,32	0	0,00	0	0,00	0,81	18,75
KD1D	4,69	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KD1E	4,23	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KD2A	4,25	0	0,00	0	0,00	0	0,00
KD2B	4,85	1,3	0,00	0	0,00	1,95	40,21
KD2C	4,64	0,77	26,80	3,01	64,87	3,62	78,02
KD2E	4,68	0	0,00	0	64,32	0	0,00

Tabela 3 – Contagem de BALs nos tempos 1 (após 1 hora de incubação) e 4 (após quatro horas de incubação), sob exposição a sais biliares.

Amostras	Tempo	Bile 0,3% log ₁₀ UFC/mL	Bile 1,0% log ₁₀ UFC/mL	Amostras	Tempo	Bile 0,3% log ₁₀ UFC/mL	Bile 1,0% log ₁₀ UFC/mL
KO1 A	T0	3,04 ^b	Inc. ^a	KO1 A	T4	5,43 ^b	3,20 ^a
KO1 B	T0	3,15 ^b	Inc. ^a	KO1 B	T4	3,88 ^{cd}	3,64 ^a
KO1 C	T0	3,23 ^b	3,98 ^{ef}	KO1 C	T4	3,93 ^{bcd}	3,53 ^a
KO1 D	T0	3,91 ^b	Inc. ^a	KO1 D	T4	3,92 ^{bcd}	3,52 ^a
KO1 E	T0	3,97 ^b	Inc. ^a	KO1 E	T4	Inc. ^a	4,22 ^a
KO2 D	T0	4,16 ^b	2,10 ^g	KO2 D	T4	3,65 ^{cd}	3,50 ^a
KO3 A	T0	4,95 ^b	4,60 ^{bcdef}	KO3 A	T4	4,79 ^{bc}	3,32 ^a
KO3 B	T0	2,44 ^b	4,84 ^{bcde}	KO3 B	T4	4,27 ^{bcd}	4,16 ^a
KO3 C	T0	3,59 ^b	4,80 ^{bcdef}	KO3 C	T4	4,27 ^{bcd}	4,25 ^a
KO3 D	T0	5,05 ^b	5,00 ^{bcde}	KO3 D	T4	4,50 ^{bcd}	0,00 ^b
KO3 E	T0	4,74 ^b	4,80 ^{bcdef}	KO3 E	T4	4,27 ^{bcd}	4,02 ^a
KN1 A	T0	4,24 ^b	5,01 ^{bcde}	KN1 A	T4	3,16 ^d	3,95 ^a
KN1 B	T0	3,95 ^b	5,97 ^b	KN1 B	T4	Inc. ^a	3,24 ^a
KN1 C	T0	4,40 ^b	5,57 ^{bcd}	KN1 C	T4	3,85 ^{cd}	4,10 ^a
KN1 D	T0	4,02 ^b	5,12 ^{bcde}	KN1 D	T4	3,90 ^{cd}	0,00 ^b
KN1 E	T0	3,48 ^b	0,52 ^h	KN1 E	T4	Inc. ^a	4,62 ^a
KN2 A	T0	3,67 ^b	Inc. ^a	KN2 A	T4	3,89 ^{cd}	4,16 ^a
KN2 B	T0	3,67 ^b	Inc. ^a	KN2 B	T4	Inc. ^a	4,63 ^a
KN2 C	T0	3,71 ^b	Inc. ^a	KN2 C	T4	Inc. ^a	3,52 ^a
KN2 D	T0	3,57 ^b	0,00 ^h	KN2 D	T4	0,00 ^e	0,00 ^b
KN2 E	T0	4,32 ^b	5,17 ^{bcde}	KN2 E	T4	Inc. ^a	3,89 ^a
KN3 A	T0	Inc. ^a	Inc. ^a	KN3 A	T4	4,21 ^{bcd}	3,67 ^a
KN3 B	T0	4,40 ^b	4,67 ^{bcdef}	KN3 B	T4	4,37 ^{bcd}	3,04 ^a
KN3 C	T0	4,58 ^b	5,45 ^{bcde}	KN3 C	T4	3,73 ^{cd}	2,97 ^a
KN3 D	T0	4,03 ^b	5,53 ^{bcd}	KN3 D	T4	4,01 ^{bcd}	2,69 ^a
KN3 E	T0	3,45 ^b	5,31 ^{bcde}	KN3 E	T4	3,98 ^{bcd}	3,47 ^a
KD1 A	T0	4,25 ^b	4,98 ^{bcde}	KD1 A	T4	4,11 ^{bcd}	3,53 ^a
KD1 B	T0	4,49 ^b	5,20 ^{bcde}	KD1 B	T4	5,10 ^{bc}	3,69 ^a
KD1 C	T0	3,82 ^b	5,23 ^{bc}	KD1 C	T4	4,19 ^{bcd}	3,24 ^a
KD1 D	T0	5,00 ^b	5,67 ^{fg}	KD1 D	T4	3,82 ^{cd}	3,21 ^a
KD1 E	T0	5,04 ^b	3,31 ^{fg}	KD1 E	T4	4,28 ^{bcd}	3,89 ^a
KD2 A	T0	5,02 ^b	4,36 ^{cdef}	KD2 A	T4	4,65 ^{bcd}	3,75 ^a
KD2 B	T0	4,32 ^b	4,08 ^{def}	KD2 B	T4	Inc. ^a	4,37 ^a
KD2 C	T0	4,52 ^b	4,14 ^{def}	KD2 C	T4	Inc. ^a	4,21 ^a
KD2 D	T0	Inc. ^a	5,00 ^{bcde}	KD2 D	T4	Inc. ^a	4,00 ^a
KD2 E	T0	3,84 ^b	4,53 ^{bcdef}	KD2 E	T4	Inc. ^a	4,41 ^a

Valores de contagem de células viáveis expressos como médias de triplicatas (log₁₀UFC/mL).

Médias seguidas de letras distintas, na coluna, diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Tabela 4 – Avaliação da sobrevivência total (%ST) de BALs frente a diferentes concentrações de bile, com base na contagem de células viáveis, após quatro horas de incubação.

Isolado	Controle log/UFC	Bile bovina 0,3%		Bile bovina 1%	
		log/UFC	%ST	log/UFC	%ST
KO1A	4,87	5,43	>100	3,2	65,71
KO1B	4,88	3,88	79,51	3,64	74,59
KO1C	4,53	3,93	86,75	3,53	77,92
KO3A	4,95	4,79	96,77	3,32	67,07
KO3C	4,7	4,27	90,85	4,25	90,43
KO3E	4,74	4,27	90,08	4,02	84,81
KN1A	4,57	3,16	69,15	3,95	86,43
KN1B	3,95	Inc.	>100	3,24	82,03
KN1C	4,4	3,85	>100	4,1	93,18
KN2A	4,39	3,89	87,50	4,16	94,76
KN2B	4,42	Inc.	>100	4,63	>100
KN2C	4,37	Inc.	>100	3,52	80,55
KN2D	4,18	3,57	85,40	0	0,00
KN2E	4,41	Inc.	>100	3,89	88,21
KN3B	4,35	4,37	>100	3,04	69,89
KN3C	4,39	3,73	>100	2,97	67,65
KN3D	4,34	4,01	84,97	2,69	61,98
KN3 E	4,4	3,98	92,40	3,47	78,86
KD1A	4,35	4,11	90,45	3,53	81,15
KD1B	4,48	4,19	94,48	3,69	82,37
KD1C	4,32	3,82	93,53	3,24	75,00
KD1D	4,69	4,28	88,43	3,21	68,44
KD1E	4,23	4,65	91,26	3,89	91,96
KD2A	4,25	Inc.	>100	3,75	88,24
KD2B	4,85	Inc.	>100	4,37	90,10
KD2C	4,64	Inc.	>100	4,21	90,73
KD2E	4,68	Inc.	>100	4,41	94,23

CONCLUSÕES

Os isolados de bactérias ácido lácticas avaliados nesse estudo apresentaram características fenotípicas idênticas, o que é um indicativo de que se trata de um mesmo grupo de micro-organismos apresentando sobrevivência a condições extremas de estresse, como o sistema intestinal que tem como características o baixo pH e presença de sais biliares, além de apresentarem formação de halo de inibição frente a cepas de bactérias patogênicas, o que é

uma importante potencialidade probiótica e torna esses isolados uma interessante fonte de estudos, para que posteriormente possam servir de cultura *starter* e serem introduzidos em produtos láteos.

Dos 40 isolados inicialmente, apenas 27 sobreviveram até o final das avaliações, no entanto, todos possuem a propriedade de formar halos de inibição frente aos patógenos testados. Dos 27 isolados, 48% resistiram até os testes finais, além de sobreviverem ao tratamento de 0,3% de bile bovina, ainda apresentaram crescimento nesse condição, bem como 30% cresceram no tratamento com 1% de bile bovina. Já para a condição de pH ácido os mesmo 27 isolados, apresentaram pouca resistência ao tratamento com pH 2,0, onde apenas 6 isolados sobreviveram, porém 44% sobreviveram aos tratamentos em pH 2,5 e 2,5 com pepsina. Vale ressaltar que os isolados que não apresentaram condições favoráveis de desenvolvimento em pH ácido, bem como os isolados que apresentaram atividade antagônica à bactérias patogênicas, porém não sobreviveram até o final das avaliações, não devem ser descartados como potenciais probióticos, visto que podem ser inseridos em alimentos através de técnicas de proteção, como a microencapsulação. Mais estudos são necessários para a verificação dessa potencialidade probiótica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIOUEL, H.; FRANZ, C.M.A.P.; OMAR, N.B.; GÁLVEZ, A. Diversity and applications of *Bacillus bacteriocinas*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 201-232, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. APHA, Washington, 2002.

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

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

BEGLEY, M.; HILL, C.; GAHAN, C. G. M. Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 3, p. 1729–1738, 2006.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal – RIISPOA. **Inspeção industrial e sanitária do leite e derivados.** Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Resolução – nº 5 de 13 de novembro de 2000. **Padrões de identidade e qualidade (PIQ) de leites fermentados.** 2000.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 46, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados,** de 23 DE Outubro de 2007.

_____. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução normativa nº 62 de 29/12/11.** Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite.

CAPLICE, E.; FITZGERALD, G.F. **Int. J. of Food Microbiol.** v. 50, p.131, 1999.

CARASI, P.; JACQUOT, C.; ROMANIN, D.E.; ELIE, A.; DE ANTONI, G.L.; URDACI, M.C.; SERRADELL, M.A. Safety and potential beneficial properties of Enterococcus strains isolated from kefir. **International Dairy Journal.** v. 39, p. 193-200, 2014.

CARNEIRO, R.P. **Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir.** 2010. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology,** 35: 1-27, 1997.

DIAS, P.A., **Atividade Antimicrobiana de Microrganismos Presentes em Grãos de Kefir.** 2011. 44 f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

FAO/WHO, 2001. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, Córdoba, Argentina.

GOLOWCZYC, M.A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G.; ABRAHAM, A.G. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir and their impact on probiótica properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 556-560, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z., KOK-TAS, T.; GRENE, A.K. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 51, n. 3, p. 261-268, 2011.

HANSEN, E.B. Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **Int. J. of Food Microbiol.** v. 78, p. 119, 2002.

HELANDER, I.M.; WRIGHT, A. von; MATILLA-SANDHOLM, T.M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against GRAM-negative bacteria. **Trends in Food Science & Technology**. v. 8, p. 146-150, 1997.

HUANG, Y.; ADAMS, M. C. *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 253– 260, 2004.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1^a edição digital. São Paulo. 1020 p. 2008.

JACOBSEN, C. N.; NIELSEN, V.R.; HAYFORD, A.E.; MØLLER, P.L.; MICHAELSEN, K.F.; PÆRREGAARD A.; SANDSTRÖM, B.; TVEDE, M.; JAKOBSEN, M. Strains in humans the colonization ability of five selected by in vitro techniques and evaluation of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. screening of probiotic activities of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4949-4956, 1999.

JONES, R. J.; HUSSEIN, H. M.; ZAGOREC, M.; BRIGHTWELL, G.; TAGG, J. R. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. **Food Microbiology**, v. 25, p. 228–234, 2008.

KOLLING, F.F.; RICHARDS, N.S.P.S. Kefir - um alimento milagroso? **Food Ingredients**, São Paulo, v. 6, n.33, p. 62-71, 2004.

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

KOTILAINEN, L., RAJALAHTI, R., RAGASA, C., & PEHU, E. Health enhancing foods: Opportunities for strengthening the sector in developing countries. **Agriculture and Rural Development Discussion**. v. 30, 2006.

- LEITE, A.M.O.; LEMOS, M.A.M.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M.F. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.44, p. 341-349, 2013.
- MADERA, C.; GARCÍA, P., JANZEN, T., RODRÍGUEZ, A., SUÁREZ, J.E. Characterization of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, n.3, p.213-222, 2003.
- MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; MEDINA, L. F. C.; BRANDELLI, A. Atividade antagonística de *Lactobacillus* frente a bactérias de importância em alimentos. In: 3º Simpósio de Segurança Alimentar, 2010, Florianópolis. **Anais do 3º Simpósio de Segurança Alimentar**. Florianópolis: SBCTA, 2010.
- MENRAD, K. Market and marketing of functional food in Europe. **Journal of Food Engineering**, v. 56, p. 181–188, 2003.
- MOLLET, B., & ROWLAND, I. Functional foods: At the frontier between food and pharma. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 483–485, 2002.
- MORAES, P. M.; PERIN, L. M.; ORTOLANI, M. B. T.; YAMAZI, A. K.; VIÇOSA, G. N.; NERO, L. A. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. **LWT - Food Science and Technology**, v.43, p. 1320-1324, 2010.
- MOREIRA, M.E.C. e col. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, Vol. 31, No. 7, 2008.
- NERO, L. A.; Mattos, M. R. de; Barros, M.A. F.; Ortolani, M. B. T.; Beloti, V.; Franco, B. D. G. M. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. **Zoonoses Public Health**, v. 55, p. 299–305, 2008.
- ORTOLANI, M. B. T. **Bactérias ácido-láticas autóctones de leite cru e queijo minas frescal: Isolamento de culturas bacteriocinogênicas, caracterização da atividade antagonista e identificação molecular**. 2009. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- PERELMUTER, K.; FRAGA, M.; ZUNINO, P. In vitro activity of potential probiotic *Lactobacillus murinus* isolated from the dog. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 1718- 1725, 2008.

PIARD, J-C. et al. Bactérias lácticas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.II, n.8, p.80-84, 1999.

REDONDO, N. C. **Avaliação *in vitro* de características probióticas do *Enterococcus faecium* CRL183 e do *Lactobacillus helveticus* ssp*jugurti***. 2008. Dissertação. (Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, Brasil). 109p.

ROBERFROID, M. B. An European consensus of scientific concepts of functional foods. **Nutrition**, v. 16, p.689–691, 2000.

SANTOS, G.; COSTA, J.A.M.; CUNHA, V.C.M.; BARROS, M.O.; CASTRO, A.A. Avaliação sensorial, físico-química e microbiológica do leite fermentado probiótico desnatado adicionado de jenipapo desidratado osmoticamente. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, set./out., v. 67, n° 388, p.61-67, 2012.

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

SAWITZKI, M. C.; FIORENTINI, A. M.; BERTOL, T. M.; SANT’ANNA, E. S. *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 340-345, 2009.

SCHILLINGER, U.; LUCKE, F. K. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from Meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 1901-1906,1999.

SCHILLINGER, U., GUIGAS, C., HOLZAPFEL, W. H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **International Dairy Journal**. 2005.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895–904, 2003.

YOUNG, Y. **Functional foods and the European consumer**. In J. Buttriss & M. Saltmarsh (Eds.), *Functional foods. II. Claims and evidence*. London, UK: The Royal Society of Chemistry, 2000.

ZANIRATI, D.F.; ABATEMARCO, M.; SANDES, S.H.C.; NICOLI, J.R.; NUNES, A.C.; NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**. v. 32, p. 70-76, 2015.

4. CONCLUSÃO FINAL

As oito amostras de kefir produzidos de forma artesanal na região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul apresentaram características higiênico-sanitárias semelhantes, apesar de indicativos de falhas no processo de fabricação e/ou higiene, as amostras não apresentam riscos sanitários aos consumidores e não houve presença de patógenos. Em relação à contagem de bactérias lácticas e leveduras, as mesmas se encontraram na quantidade necessária para que o produto seja classificado como tal. Na avaliação físico-química, todas as amostras apresentaram-se com as mesmas características não havendo diferença significativa entre elas nos atributos avaliados.

Foram isoladas cinco colônias de cada uma das oito amostras, totalizando 40 isolados que apresentaram características fenotípicas idênticas, como coloração de Gram positiva, catalase negativa e morfologia de cocobacilo, o que indica a possibilidade das bactérias ácido-láticas isoladas de diferentes origens serem do mesmo gênero.

Todos os 40 isolados apresentaram efeito antagônico às cepas de bactérias patogênicas de referência, sendo que o diâmetro dos halos foi variável, de acordo com o isolado e a cepa patogênica de referência. A característica dos isolados em apresentarem ação antagônica à bactérias patogênicas é um fator muito importante para a ciência de alimentos, especialmente no que tange a segurança alimentar e tecnologias de bioconservação.

Dos 40 isolados inicialmente, apenas 27 sobreviveram até a conclusão das avaliações de resistência a condições adversas como presença de sais biliares e pH ácido. Em relação à resistência a sais biliares nas concentrações de 0,3 e 1%, 48% dos isolados sobreviveram ao tratamento de 0,3% e ainda apresentaram crescimento nessa condição, bem como 30% cresceram no tratamento com 1%, no entanto sem apresentar crescimento. Para os testes de resistência ao pH ácido, apenas 22% isolados apresentaram sobrevivência no tratamento com pH 2,0, porém 44% sobreviveram aos tratamentos em pH 2,5 e 2,5 com pepsina. Vale ressaltar que esses isolados que não apresentam condições favoráveis de desenvolvimento em pH ácido não devem ser descartados como potenciais probióticos, visto que podem ser inseridos em alimentos através de técnicas de microencapsulação. Mais estudos ainda são necessários para a verificação do potencial probiótico encontrado nos estudos iniciais.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Identificar molecularmente os isolados que apresentam melhor comportamento probiótico.

- Identificar outras características potencialmente probióticas, como atividade antioxidante e regulação do colesterol sanguíneo.
- Formular cultura starter para aplicação em produtos lácteos voltados para a merenda escolar.

REFERÊNCIAS

ALM, L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in Milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individual. *J. of Dairy Science*, v. 65, n. 3, p. 346-353, 1982.

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

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

BERGMAN, R. S. O.; PEREIRA, M. A.; VEIGA, S. M. O. M.; SCHNEEDORF, J. M. OLIVEIRA, N. M. S.; FIORINI, J. E. Microbial profile of a kefir sample preparations grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Cien. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 30, n. 4: 1022-1026, out.- dez. 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa N° 46, **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados**, de 23 de Outubro de 2007.

DINIZ, R. O.; PERAZZO, F. F; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Atividade anti- inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 13, p. 19-21, 2003.

FAO/WHO. **Codex Standard for Fermented Milks**, 2003.

_____. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2001.

FARNWORTH, E. R. Kefir- a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*, v. 2, p. 1-17, 2005.

FLEET, G. H. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 68, p. 199-211, 1990.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 275-277, 2000.

GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; GRENE, A. K. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 51, n. 3, p. 261-268, 2011.

JAY, J. M. Fermentação e produtos lácteos fermentados. In: JAY, J. M. (6. ed) **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 131-147.

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

KUBO, M.; ODANI, T.; NAKAMURA, S. Pharmacological study on kefir – a fermented Milk product in caucasus. I. On tumor activity. **Yakugaku Zsshi**, v. 112, n. 7, p. 489-495, 1992.

LEISNER, J. J. et al. Description of *Paralactobacillus selangorensis* gen. nov., sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from chili bo, a Malaysian food ingredient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 50, p. 19-24, 2000.

LIMA, A. C. F. Efeito do uso do probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frango de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 200-27, 2003.

LIUT KEVICIUS, A.; SARKINAS, A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. **Dairy Science Abstracts**, v. 66, p. 903, 2004.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. 8. ed. **Prentice Hall International**. 986 p., 1997.

MESQUIARI, M. **Desenvolvimento tecnológico de um sucedâneo de quefir - Iofir®**. 1999. 142 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** p. 53-69, 1999.

MOREIRA, M. E. C. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, v. 31, n. 7, 2008.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais**. São Paulo: Atheneu, 2009.

ORDÓÑEZ PEREDA, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal**. v. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005.

ORLOVA, Z. N.; NASATKINA, T. N.; OKHAPKINA, V. F. Use of Robolact and Linolac dry Milk mixtures in the overall the overall therapy of infants with acute intestinal infections. **Vopr. Pitan.**, v. 4, p. 45-47, 1980.

OTA, A. Protection against na infectious disease by enterohaemorrhagic E. coli 0-157. **Med. Hypotheses**, v. 53, n. 1, p. 87-88, 1999.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, p. 54-59, 2003.

PIARD, J-C. et al. Bactérias lácticas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. II, n. 8, p. 80-84, 1999.

POOL-ZOBEL, B. L.; MUNZNER, R.; HOLZAPFEL, W. H. Antigenotoxic properties of lactic acid bacteria in the S. typhimurium atagenicity assay. **Nutri. Câncer**, v. 20, n. 3, p. 261-270, 1993.

REA, M. C. et al. Irish kefir – like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, p. 83-94, 1996.

ROGINSKI, H. Fermented milks. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 43, p. 37-46, 1988.

SALOFF-COSTE, C. J. **Kefir Danone Newsletter**, p. 11, 1996.

SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Food Journal**, v. 109, p. 280-290, 2007.

SCHMIDT, P.; VASS, A.; SZAKALY, S. Effect of fermented milk diets on regeneration of the rat liver. **Acta Med. Hung.**, v. 41, n. 2-3, p. 163 – 169, 1984.

TOBA, T.; ARHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated characters of fermented milks. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 10, n. 3-9, p. 219-224, 1990.

ANEXOS

ANEXO A

Normas de Publicação

Normas de Publicação



ORIENTAÇÃO AOS NOSSOS COLABORADORES,

PARA REMESSA DE MATÉRIA TÉCNICA

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, atualizações bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do proGRAMa*; gráficos em *Winword, Power Point* ou *Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw* nas mais variadas versões do proGRAMa (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *PhotoShop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. O trabalho deverá constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem,
05. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.
06. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).
07. Arquivos que excederem a 1 MB deverão ser enviados zipados (Win Zip ou WinRAR)
08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados
09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.
10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.
11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.
12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail autores@higienealimentar.com.br.
13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada declaração de recebimento ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail autores@higienealimentar.com.br.
14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista.

17. Por ocasião da publicação dos trabalhos aprovados será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diaGRAMada.

18. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do e-mail autores@higienealimentar.com.br

ANEXO B

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

(Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação on-line do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.

Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.

Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.

Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi),

zipado, inserido no campo próprio.

Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.

É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.

O ABMVZ comunicará, via eletrônica, a cada autor, a sua participação no artigo. Caso pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

Tipos de artigos aceitos para publicação: **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

 Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

 Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto **NÃO** deve conter subitens em qualquer das seções do artigo e deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
 2. o texto do artigo em pdf **NÃO** deve conter o nome dos autores e filiação.
- Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
 - Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
 - Introdução.** Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para BALsizá-la.
 - Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
 - Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da

tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando se referir a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é 8). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

□ **Figura.** Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é referida no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se referir a mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviadas no formato jpg com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão na tela de registro do artigo. As figuras devem ser, obrigatoriamente, inseridas no corpo do texto preferencialmente após a sua primeira citação.

Nota:

□ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

□ **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes e sem subitens).

□ **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

□ **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

□ **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

□ A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

□ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)

□ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)

□ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)

□ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

□ **Citação de citação.** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

□ **Comunicação pessoal.** Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a gloBALs market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerd-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.

O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência e/ou “Aguardando liberação do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

Taxa de submissão. A taxa de submissão de R\$50,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.

Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.

Taxa de publicação. A taxa de publicação de R\$95,00, por página impressa em preto e R\$280,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br.