

THATIANA LOPES DE OLIVEIRA

**VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR
ADICIONADO DE MEL E RESISTÊNCIA ÀS CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

**RIO POMBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018**

THATIANA LOPES DE OLIVEIRA

**VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR
ADICIONADO DE MEL E RESISTÊNCIA ÀS CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Aurélia Dornelas de Oliveira Martins

**RIO POMBA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – IFET/RP
Bibliotecária: Tatiana dos Reis Maciel CRB 6 / 2711

O48v Oliveira, Thatiana Lopes de.
 Viabilidade de microrganismos presentes no Kefir adicionado de mel e resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. / Thatiana Lopes de Oliveira. – Rio Pomba, 2018.
 43f. : il.

 Orientadora: Prof.^a Dsc. Aurélia Dornelas de Oliveira Martins.

 Trabalho de Conclusão de Curso em Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais. - Campus Rio Pomba.

 1. Bebida fermentada - Kefir. 2. Cultura probiótica. 3. Bactéria láctica. I. MARTINS, Aurélia de Oliveira (orient.). II. Título.

CDD: 664

THATIANA LOPES DE OLIVEIRA

**VIABILIDADE DE MICRORGANISMOS PRESENTES NO KEFIR
ADICIONADO DE MEL E RESISTÊNCIA ÀS CONDIÇÕES
GASTROINTESTINAIS SIMULADAS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA:

Prof^ª. Dr^ª. Eliane Maurício Furtado Martins
Coorientadora

Prof. Dr. Maurílio Lopes Martins
Coorientador

Prof. Dr. Roselir Ribeiro da Silva

Dr. Welliton Fagner da Cruz

Prof^ª. Dr^ª Aurélia Dornelas de Oliveira Martins
Orientadora

Dedico este trabalho ao amor da minha vida meu marido Diego, à minha mãe por todo apoio e compreensão, às minhas irmãs, Priscila, Laís e Patrícia, minhas melhores amigas, às minhas sobrinhas, Sabrina e Ludimila, anjos de Deus em minha vida, e ao meu sobrinho Pedro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda força e coragem que concedeu à mim durante todo o tempo do Mestrado, as dificuldades foram muitas, mas minha fé me ajudou a superá-las.

Agradeço ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de MG – Campus Rio Pomba, pela oportunidade dada. O Mestrado engrandece a cidade, o Instituto, mas sobretudo proporciona a nós alunos a realização de sonhos e a possibilidade de vislumbrar novos caminhos.

À minha orientadora, Aurélia Dornelas de Oliveira Martins, por toda sua sabedoria, por exercer sua profissão com tanto amor e dedicação, por ter me orientado com tanta paciência e humildade. Você, minha querida orientadora, me ensinou o tipo de profissional que me esforço tanto para ser, seu amor ao próximo será para mim seu maior ensinamento.

À minha coorientadora, professora Eliane Maurício Furtado Martins, sempre atenciosa e disposta a ajudar. Obrigada pelos ensinamentos e sobretudo pelas palavras de apoio nos momentos de indecisão.

Ao meu coorientador, professor Maurilio Lopes Martins. Agradeço por dedicar seu tempo ao ensino, sua inteligência e dedicação são fascinantes. Sem dúvida o Mestrado fica bem mais interessante e desafiante com suas aulas, suas sugestões e seu exemplo! Obrigada pelo desafio, foi muito gratificante conhecê-lo.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, por seus ensinamentos e dedicação. A disposição em nos ajudar nos momentos mais difíceis foi essencial durante a caminhada.

Aos técnicos do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Renata, Jonathan, e em especial meu querido amigo Rosélio. Sem vocês não seria possível realizar minha pesquisa. O conhecimento e habilidade de vocês me fizeram ver a ciência com outros olhos. A amizade e o carinho com que me trataram foi ímpar! Obrigada, de coração.

Agradeço aos meus amigos Sebastião, Mariane e Ítalo, que tanto colaboraram para que minha pesquisa fosse adiante. A experiência de vocês foi essencial, mas, as risadas, as piadas e a descontração tornaram o caminho menos árduo e sem dúvida muito mais proveitoso. Vocês fizeram com que tudo valesse mais à pena e estarão pra sempre no meu coração! Muito obrigada!

Às minhas colegas de turma, Rosana, Mariana, Marcela, Sâmya e Rose por todo companheirismo! Estar com vocês foi experiência de vida para mim! Levarei um pouco de cada uma por onde eu for. Aprendi muito com vocês, obrigada!

À minha tia Maria Lamas por seu exemplo de vida. Crescer aprendendo o dom da vida com você me fez ser quem sou. Seu exemplo me ensinou que é preciso lutar, ajudar o próximo e sobretudo que devemos sempre buscar as Coisas do Alto. Amo você!

Às minhas avós Gezilda e Lourdes por todo carinho. Vocês são guerreiras, exemplo de vida e coragem! Amo vocês incondicionalmente.

À minha mãe Silmara, exemplo de amor que expulsa, que é a verdadeira forma de amor, aquele que não prende nem sufoca mas que impulsiona a buscar o novo, a buscar o que a vida reserva de melhor. Nem todas as palavras do mundo seriam capazes de expressar o meu orgulho em ser sua filha. Sua vida é minha inspiração, suas lágrimas mostraram-me o melhor caminho. Sua luz me ilumina, suas palavras adoçam o amargor das minhas dificuldades. Sua fé abre meus caminhos e meu coração. Te amarei eternamente!

Ao meu pai Jânder, que me ensinou que é preciso lutar sempre, que as dificuldades não podem nos impedir de sonhar! Por isso estou aqui hoje! Sonho realizado! Obrigada meu pai!

Às minhas irmãs, Priscila, Laís e Patrícia, vocês são minhas melhores amigas. Minha vida sem vocês não teria sentido. Minha força vem de vocês. Obrigada por ouvirem meu desabafo quando eu não suportei mais o silêncio! Obrigada por serem tão sinceras e simples de coração, por não me cobrarem por minha ausência e por compreenderem que tudo o que faço tem um objetivo maior! Vocês são meus amores!

Aos anjos de Deus Sabrina, Ludimila e Pedro. Meu amor por vocês é incondicional! Sou a tia e madrinha mais apaixonada desse mundo. Vocês são a luz da minha vida.

Finalmente, agradeço ao amor da minha vida, Diego. As lágrimas são inevitáveis. Lembrar de tudo o que passamos juntos e saber que ao final do dia era seu abraço que me fazia esquecer de tudo, que todos os problemas pareciam nada ao ouvir sua voz me consolando. Você é o melhor presente, o melhor amigo, meu eterno amor. Te amo muito!

“Às vezes é preciso partir, buscar os
longe do mundo para descobrir que o
que buscávamos estava no lugar de
onde partimos”

Padre Fábio de Melo

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivo geral.....	2
2.2. Objetivos específicos	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	3
3.1. Bactérias probióticas e colonização intestinal.....	3
3.2. Kefir: definição, composição e características funcionais.....	7
3.2.1. Características nutricionais de kefir.....	11
3.3. Prebióticos.....	13
3.4. Mel: composição e propriedades funcionais.....	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Cultivo do Kefir.....	17
4.2. Preparo da bebida com adição de mel.....	19
4.3. Avaliação microbiológica das bebidas fermentadas.....	19
4.3.1. Determinação do Número Mais Provável de coliformes e identificação de <i>E. coli</i>	19
4.3.2. Determinação de <i>Salmonella</i> sp.....	19
4.3.3. Determinação de estafilococos coagulase positiva.....	20
4.3.4. Contagem de microrganismos em ágar MRS.....	20
4.4. Caracterização físico-química das bebidas fermentadas.....	20
4.4.1. Determinação de pH.....	20
4.4.2. Determinação da acidez em ácido lático.....	21
4.5. Simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais.....	21
4.6. Avaliação da aceitação sensorial.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Avaliação microbiológica das bebidas fermentadas.....	23
5.2. Caracterização físico-química das bebidas fermentadas.....	26
5.3. Viabilidade de microrganismos em ágar MRS após simulação <i>in vitro</i> das Condições Gastrointestinais.....	28
5.4. Avaliação da aceitação sensorial.....	30
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

8. ANEXOS	40
------------------------	-----------

RESUMO

OLIVEIRA, Thatiana Lopes de, Mestrado Profissional, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, maio de 2018. **Viabilidade de Microrganismos Presentes no Kefir Adicionado de Mel e Resistência às Condições Gastrointestinais Simuladas *in vitro***. Orientadora: Aurélia Dornelas de Oliveira Martins. Coorientadores: Eliane Maurício Furtado Martins e Maurilio Lopes Martins.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial prebiótico do mel na viabilidade de microrganismos presentes no kefir e avaliar sua resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Grãos de kefir (5%) foram inoculados no leite e preparadas quatro amostras (kefir puro e kefir com 1, 3 e 5% de mel). Após a inoculação e adição de mel, as amostras foram armazenadas em B.O.D. a 25°C por 24h para fermentação e, posteriormente armazenadas por 21 dias a 8°C. As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias. A simulação das condições gastrointestinais *in vitro* foi feita com o kefir puro (KP) e com o kefir a 3% de mel (K3) nos tempos 0, 7 e 14 dias. Ambas amostras também foram utilizadas para análise sensorial nos tempos 0 e 7 dias. Em relação à qualidade microbiológica todas as amostras apresentaram conformidade com a legislação brasileira. Em relação à viabilidade de microrganismos em ágar MRS não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras (KP e K3) e em relação ao tempo. As amostras não diferiram entre si ($p > 0,05$) quanto aos parâmetros de pH e acidez. Em relação à simulação das condições gastrointestinais, observou-se que KP e K3 apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na viabilidade antes e após a simulação da bebida às condições gástricas. Como a porção diária mínima de microrganismos probióticos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos terapêuticos é de 10^8 a 10^9 UFC.g⁻¹, implica em um consumo de 100g diárias do produto contendo 10^6 UFC.g⁻¹ ou mL. As amostras de KP e K3 tiveram a mesma aceitação sensorial ($p > 0,05$) nos atributos avaliados. Concluiu-se que o mel não apresentou efeito prebiótico para os microrganismos do kefir, porém, os mesmos apresentaram resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, sugerindo possível efeito probiótico.

Palavras-chave: Bebida fermentada, bactéria láctica, probiótico.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Thatiana Lopes de, Professional Master, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, May 2018. **Viability of lactobacilli in kefir with honey and survival *in vitro* gastrointestinal conditions.** Advisor: Aurélia Dornelas de Oliveira Martins. Co-advisors: Eliane Maurício Furtado Martins and Maurilio Lopes Martins.

This work evaluated the prebiotic potential of honey in the viability of lactobacilli present in kefir and the resistance of the microorganisms contained in the product simulating gastrointestinal conditions *in vitro*. Kefir granules were inoculated in milk and four treatments were prepared (pure kefir and kefir with 1, 3 and 5 % of honey). After inoculation and honey addition, samples were kept in B.O.D. at 25 °C for 24 h, for fermentation, and then were storage for 21 days at 8 °C. With respect to microbiological quality, all samples were in agreement with Brazilian legislation. In relation to viability of microorganisms and time in MRS agar there was no significant difference ($p > 0.05$) between the samples (KP e K3). There was no significant difference ($p > 0.05$) between all samples when pH and acidity were evaluated. With respect to gastrointestinal conditions, KP e K3 showed significant difference ($p < 0.05$) in viability before and after simulation, however, they were in agreement with sensory acceptance ($p > 0.05$) for the evaluated characteristics. Toward therapeutic effects, a portion (10^8 until 10^9 UFC.g⁻¹) of feasible probiotic microorganisms must be ingested daily. In other words, 100 g of the prebiotic, with 10^6 UFC.g⁻¹ or mL, must be consumed. This work shows that honey have no prebiotic effect for kefir microorganisms. However, probably there is a probiotic effect, because kefir microorganisms showed resistance for gastrointestinal conditions when a simulation were made *in vitro*.

Key words: Fermented drink, lactic acid bacteria, probiotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fluxograma da ativação dos grãos de kefir.....	18
Figura 2.	Viabilidade de microrganismos em ágar MRS em kefir puro e adicionado de mel com 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento.....	25
Figura 3.	Sobrevivência de bactérias lácticas e leveduras presentes no kefir puro (KP) e no kefir com 3% de mel (K3) durante 14 dias de armazenamento sob refrigeração a 8 °C.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características físico-químicas e composição centesimal de kefir.....	11
Tabela 2.	Perfil de aminoácidos essenciais presentes no kefir.....	12
Tabela 3.	Macro e micro elementos presentes nos grãos de Kefir.....	13
Tabela 4.	Resultados de pH e acidez da amostra de kefir puro e kefir adicionado de 1, 3 e 5% de mel.....	26
Tabela 5.	Resultados da análise sensorial das amostras.....	30

1. INTRODUÇÃO

Quefir ou kefir é um produto originário da Rússia, mais especificamente das montanhas do Cáucaso (LEITE et al., 2015; SANTOS et al., 2012). Caracteriza-se por ser uma bebida fermentada, apresentando diversos efeitos probióticos (MOREIRA et al., 2008). Seus grãos são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*), leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (BRASIL, 2007).

A presença de uma microbiota diversificada torna-se a principal característica do kefir. Os lactobacilos, lactococos, bactérias do ácido acético e leveduras presentes nos grãos são mantidos unidos pela matriz de polissacarídeos, proteínas e gorduras. As leveduras proporcionam características singulares ao produto tanto pelo aroma como pela síntese de vitaminas do complexo B e ainda pela produção de etanol e CO₂, mesmo após refrigeração (COSTA; ROSA, 2016).

Segundo Leite et al. (2015), estudos *in vitro* e com animais, associam o consumo de kefir com benefícios à saúde como, melhora da intolerância à lactose, imunomodulação, inibição de microrganismos patogênicos e regulação da microbiota intestinal.

O cultivo do kefir pode ocorrer em diferentes substratos, como leite, suco de frutas ou açúcar mascavo (MOREIRA et al., 2008), além de outros alimentos como por exemplo o mel.

O mel é um oligossacarídeo, que exerce efeito prebiótico, estimulando o crescimento seletivo de bactérias desejáveis no intestino (MACEDO et al., 2008). Os oligossacarídeos, os fruto-oligossacarídeos, a inulina e oligofrutose apresentam grande relevância nutricional e tecnológica, propiciando aumento no teor de fibras dos produtos, e exercendo atividade bifidogênica quando inseridos no alimento (COSTA et al., 2013).

Dentre os benefícios do mel, podem ser citados efeito na regulação do trânsito intestinal, regulação da pressão arterial, redução do risco de câncer e também redução dos níveis de colesterol (MACEDO et al., 2008). Outra funcionalidade do mel é o de agregar sabor, devido às características de doçura e sabor peculiares (MARIN et al., 2014).

Tendo em vista os benefícios que o kefir e o mel podem promover à saúde, há necessidade de estudos que tornem viável a combinação desses alimentos, além de verificar a viabilidade dos microrganismos presentes no kefir combinado com mel e a resistência destes à passagem pelo trato gastrointestinal, objeto de estudo deste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar o potencial prebiótico do mel na viabilidade de microrganismos presentes no kefir em ágar MRS e avaliar a resistência dos mesmos às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- Desenvolver bebidas fermentadas de kefir com diferentes concentrações de mel;
- Avaliar as características microbiológicas e físico-químicas dos produtos elaborados;
- Determinar a contagem de microrganismos nos produtos antes e após a adição de mel;
- Avaliar a aceitabilidade sensorial dos produtos;
- Verificar por meio de ensaio *in vitro*, a viabilidade de microrganismos presentes no kefir após simulação das condições gastrointestinais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bactérias probióticas e colonização intestinal

O termo probiótico, que significa para vida, designa bactérias que apresentam efeitos benéficos tanto para seres humanos como para animais. As primeiras observações acerca dos benefícios intestinais dos probióticos, foram atribuídos ao russo Eli Metchnikoff, com trabalhos realizados no Instituto Pasteur em 1907, que sugeriu a possibilidade de adoção de medidas capazes de substituir microrganismos intestinais nocivos por benéficos (FAO/WHO, 2001).

A definição de probióticos mais aceita internacionalmente é a adotada pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) e pela World Health Organization (WHO) as quais os definem como microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

A legislação brasileira define que as bactérias aprovadas para utilização como probióticos são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus defens*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animallis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

Alguns critérios deverão ser seguidos para a seleção de bactérias probióticas como gênero; origem (deverá ser humana); estabilidade em relação à passagem pelo ambiente ácido do estômago e ao contato com sais biliares; capacidade de adesão à mucosa intestinal; capacidade de colonização do intestino, mesmo que esta seja passageira; inibição de patógenos (RAIZEL et al., 2011) e ainda apresentar atividade metabólica, como síntese de ácidos graxos de cadeia curta, produção de vitaminas e substratos energéticos (PEREZ; MENEZES; d'ACÂMPORA, 2014).

A utilização de culturas bacterianas probióticas reforça os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro, uma vez que elas estimulam a multiplicação de bactérias benéficas em detrimento das potencialmente prejudiciais, além de inibirem a multiplicação de patógenos (MACEDO et al., 2008).

Aos probióticos são atribuídos três possíveis mecanismos de atuação. O primeiro diz respeito à supressão de células viáveis por meio de produção de compostos que apresentam atividade antimicrobiana, competição pelos nutrientes e também por sítios de adesão. O

segundo mecanismo trata de uma possível alteração do metabolismo microbiano, por intermédio do aumento ou diminuição da atividade enzimática. O terceiro mecanismo de ação seria o estímulo da imunidade do hospedeiro, por meio do aumento dos níveis de anticorpos e aumento da atividade dos macrófagos (SAAD, 2006).

Em relação a resposta imune, os efeitos dos probióticos ocorrem por meio da mediação de macrófagos, por elevação nos níveis de citocinas, aumento da atividade das células *natural killer* (NK) e/ou aumento nos níveis de imunoglobulinas. É importante ressaltar que todos estes benefícios dos probióticos perante o sistema imunológico ocorrem sem que haja desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (OLIVEIRA, 2009).

Como exemplo dos principais mecanismos de ação atribuídos aos probióticos encontram-se: 1 – Atividade antimicrobiana por meio da diminuição do pH luminal, secreção de substâncias antimicrobianas e bloqueio da adesão bacteriana às células epiteliais; 2 – Função de barreira por meio do aumento na produção de muco, o que melhora a integridade da barreira; 3 – Imunomodulação através do efeito nas células epiteliais, nas células dendríticas, nos monócitos e macrófagos e nos linfócitos (COSTA et al., 2013).

É necessário que haja sobrevivência dos probióticos ao passarem pelo ambiente adverso que o estômago propicia, chegando íntegros ao intestino, colonizando-o, mesmo sendo por período determinado (OLIVEIRA et al., 2002).

O trato gastrointestinal (TGI) humano é densamente povoado por micro-organismos comensais e simbióticos, na maioria bactérias, mas também são encontrados fungos, archaea e vírus. Abriga dez vezes mais bactérias que o número de células que formam nosso organismo. A composição bacteriana dos indivíduos é distinta, tendo influência genética bem como características individuais e ambientais, como: tipo de nascimento (parto normal ou cesariana), idade e hábitos alimentares. O tipo de alimentação pós-natal apresenta grande impacto na composição da microbiota intestinal dos indivíduos. Os lactentes apresentam maior variabilidade da composição microbiana quando comparado à microbiota intestinal adulta, abrigando menos espécies com menor estabilidade. Por volta do 2º e 3º ano de idade, a microbiota passa a ser estável, podendo ser comparável à de um adulto. Ao longo da vida, a microbiota intestinal passará por várias mudanças, decorrentes do meio ambiente, estilo de vida e alimentação, patologias e envelhecimento (MORAES et al., 2014; PEREZ; MENEZES; d'ACÂMPORA, 2014).

A multiplicação das espécies bacterianas ao longo do TGI é heterogênea, sendo menor no estômago e intestino delgado devido à ação bactericida do suco gástrico, da bile, secreção

do pâncreas e peristaltismo intenso do intestino. No cólon, concentra-se a maior parte da microbiota, fato que se deve à ausência de secreção enzimática e oferta de nutrientes aliados ao baixo peristaltismo. A capacidade de adesão aos receptores da mucosa intestinal é o fator predominante para a colonização das bactérias no trato gastrointestinal. É possível que microrganismos pioneiros exerçam um papel fundamental na seleção da microbiota, impedindo o crescimento de outros microrganismos. Após a adesão à mucosa intestinal, os microrganismos estabelecem colônias permanentes, constituindo a microbiota autóctone que, torna-se cada vez mais estável a partir do amadurecimento da relação simbiótica com o hospedeiro. Microrganismos introduzidos posteriormente podem associar-se à mucosa, porém sem adesão a receptores, constituindo a microbiota alóctone (LEITE et al., 2014).

Apenas espécies bacterianas dominantes (entre 10^9 e 10^{11} UFC/g) e subdominantes (10^6 e 10^8 UFC/g) estão presentes em quantidades suficientes para desempenharem uma função no hospedeiro. Os principais benefícios da microbiota podem ser divididos em três níveis: 1- escudo biológico: função de barreira ativa contra patógenos; 2 -atividade trófica: estímulo à angiogênese, ao sistema imune local e sistêmico; 3 -metabólicas: fermentação de alimentos que não foram absorvidos, matéria orgânica advinda do próprio hospedeiro, como por exemplo, células descamadas de epitélios e secreções, e metabólitos produzidos pela microbiota, ocasionando a produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas (K, B12, folato, biotina, riboflavina) e carotenoides, substratos energéticos como ácido butírico, propiônico e acético para o consumo de colonócitos, hepatócitos e tecidos periféricos, respectivamente (PEREZ; MENEZES; d'ACÂMPORA, 2014).

O intestino humano é colonizado por inúmeras estirpes de bactérias, a maioria anaeróbias estritas. A microbiota intestinal influencia as reações bioquímicas que ocorrem no hospedeiro. Se a microbiota encontra-se íntegra e em equilíbrio, impede a ação de microrganismos patogênicos, porém, os mesmos exercerão patogenicidade com consequente infecção caso haja desequilíbrio na microbiota.

Embora a ausência ou a presença de uma matriz alimentar possa determinar o perfil de pH ao qual a estirpe probiótica está sujeita e apesar das condições de acidez inicial serem menos rigorosas, devido ao efeito protetor inicial de pH conferido pelos alimentos, uma digestão mais demorada no estômago pode expor o probiótico a um ambiente mais ácido por um período mais longo. A presença dos sais biliares induz a propriedades que afetam as membranas dos microrganismos, em decorrência da sua natureza antifílica (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

Comumente no intestino humano são encontrados microrganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, sendo encontrados também em produtos lácteos fermentados e suplementos alimentares (OLIVEIRA, 2009).

As bifidobactérias são microrganismos Gram positivos e não formadores de esporos. Neste gênero estão incluídas 30 espécies, sendo 10 de origem humana, encontrada nas fezes, cáries dentárias e vagina. As de origem animal contabilizam 17, duas têm sua origem em águas residuais e uma origina-se do leite fermentado. Ao contrário do que ocorre com a maior parte das bactérias deste gênero, a que tem origem no leite fermentado apresenta boa tolerância ao oxigênio. As bifidobactérias são microrganismos que sintetizam ácido acético e ácido láctico na proporção de 3:2, a partir de dois moles de hexose, não havendo produção de CO₂. Todas as bifidobactérias de origem humana são capazes de utilizar, além da glicose, a galactose, lactose e a frutose como fontes de carbono. A temperatura ótima de crescimento está entre 37 e 41 °C, sendo que o pico de crescimento está em torno de 43 – 45 °C e com o mínimo entre 25 – 28 °C, com pH ideal entre 6 e 7 (RAIZEL et al., 2011).

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, são caracterizados como Gram positivos, não formadores de esporos, sem flagelos, apresentando-se na forma de bastonetes ou cocobacilos. Podem ser anaeróbios ou aerotolerantes (SANTOS; BARBOSA; BARBOSA, 2011).

As bactérias deste gênero são amplamente distribuídas, sendo encontradas por todo sistema gastrointestinal e geniturinário, tendo grande relevância na microbiota de homens e animais. Sua distribuição pode sofrer interferência por vários fatores ambientais, tais como: pH, disponibilidade de oxigênio, concentração do substrato específico, presença de secreções e interações bacterianas. *L. acidophillus* apresenta baixa tolerância à salinidade do meio, e é um microrganismo microaerofílico, sendo que o crescimento em meios sólidos é favorecido pela ausência de oxigênio (anaerobiose), ou pressão reduzida de oxigênio. São capazes de degradar amidalina, celobiose, frutose, galactose, lactose, glicose, maltose e manose. A partir da degradação de glicose, produz quase que exclusivamente ácido láctico e uma pequena quantidade de acetaldeído. A temperatura ótima de crescimento está em torno de 35 e 40 °C. Em relação a acidez do meio, sua tolerância varia entre 0,3 e 1,9% (v/v) de ácido láctico (RAIZEL et al., 2011).

É essencial a manutenção da microbiota intestinal, seja por suplementação de probióticos, prebióticos ou simbióticos, tendo em vista que o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro é possível graças ao microecossistema que compõe o trato

gastrointestinal (OLIVEIRA, 2009). Além disso, Vandenplas; Huys e Daube (2015) reportaram que os probióticos apresentam a importância não apenas em relação ao trato gastrointestinal, mas também a outros órgãos como boca, pele e trato urogenital, prevenção de infecções do trato reprodutivo e urinário.

Leão et al. (2015) avaliaram a influência de *L. rhamnosus* na expressão de fatores de virulência de *Candida albicans in vitro* e observaram significativa redução no crescimento dessa levedura após 24, 48 ou 72 horas na presença de lactobacilos em comparação ao crescimento na ausência desses microrganismos, verificado em condições tanto de anaerobiose como de microaerofilia. Tais resultados promoveram uma dificuldade de recuperação de *Candida* para os ensaios subsequentes da investigação dos fatores de virulência. Ressalta-se ter sido realizado estudo *in vitro*, sendo que condições *in vivo* são mais dinâmicas havendo interferência de outras espécies e também do sistema imune do hospedeiro.

Os probióticos também apresentam eficácia na prevenção da diarreia causada por bactérias patogênicas e por vírus. Os efeitos benéficos foram comprovados utilizando-se *L. rhamnosus* GG e *Bifidobacterium lactis* BB-12 para a prevenção e tratamento da diarreia aguda em crianças, causada principalmente, por rotavírus (FAO/WHO, 2001).

É importante ressaltar também que a administração de probióticos não se limita apenas na forma de alimentos ou suplementos farmacêuticos. Pomadas específicas e sprays nasais têm sido desenvolvidos, o que demonstra a importância de ampliação do controle das alegações, não se restringindo apenas aos alimentos (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

3.2. Kefir: definição, composição e características funcionais

Kefir constitui-se de um agregado de microrganismos simbióticos, dentre eles, bactérias acidófilas e leveduras, que podem promover diversos benefícios à saúde (SANTOS; BASSO, 2013). Dertli; Çon (2017) ao avaliarem quatro amostras de kefir, constataram que bactérias do gênero *Lactobacillus* foram as predominantes. As bactérias ácido lácticas (BAL) desempenham um papel importante na conversão do leite em produtos lácteos fermentados. Nesse sentido suas propriedades mais importantes são a de acidificar o leite, gerando sabor e textura característicos (WIDYASTUTI; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, 2014). Em relação às leveduras, *K. marxianus* contribui para as principais características do kefir tais

como a sua estabilidade microbiana, propriedades químicas, sensoriais, e estruturais dos grãos de kefir (CHO et al., 2018).

Foi comprovado que *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces cerevisiae* isolados de kefir são capazes de resistir às condições ácidas e aos sais biliares do trato gastrointestinal (simuladas *in vitro*), apresentando taxa de sobrevivência de 50 e 90%, respectivamente (CHO et al., 2018).

A Instrução Normativa nº 46 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), menciona que os grãos de kefir compõem-se por leveduras fermentadoras de lactose e também pelas não fermentadoras, respectivamente *Kluyveromyces marxianus* e *Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus*. Também fazem parte da constituição dos grãos, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (BRASIL, 2007).

O número total de microrganismos do kefir e sua composição é variável, dependendo da origem, dos métodos de cultura e do substrato utilizado (MOREIRA et al., 2008; WESCHENFELDER et al., 2011). A microbiota dos grãos de kefir não é distribuída uniformemente, sendo que no seu interior há uma maior diversidade de microrganismos quando comparado com o exterior (HAMET et al., 2013).

Uma característica que difere o kefir de outros produtos lácteos fermentados é a possibilidade de recuperação dos grãos após a fermentação com um leve acréscimo no bioma dos grãos (SATIR; ZEYNEP B.; GUZEL-SEYDIM, 2016).

No Brasil, kefir é utilizado como um produto da medicina popular, devido aos efeitos probióticos conferidos ao produto obtido a partir da sua fermentação. Os meios de cultivo do kefir podem variar, podendo a cultura ser realizada no leite, açúcar mascavo ou suco de fruta. A coloração dos grãos obterá tonalidades diferentes, de acordo com o meio onde se deu o cultivo. Quando os grãos forem cultivados no leite, apresentarão tonalidade amarela, ocre e pardos se cultivados no açúcar mascavo e ainda coloração púrpura quando cultivados no suco de uva (MOREIRA et al., 2008).

O produto obtido a partir da fermentação do kefir constitui-se de uma solução ácida, contendo etanol, gás carbônico e compostos aromáticos (DINIZ et al., 2003; LEITE et al., 2013). São constituintes também da bebida produzida a partir dos grãos, ácidos láctico, fórmico, succínico e propiônico, aldeídos, traços de álcool isoamílico e acetona. São encontrados ainda, uma variedade de folatos (SANTOS; BASSO, 2013).

Os grãos de kefir encontram-se encapsulados por uma matriz de polissacarídeos, os

quais são secretados pelas bactérias ácido-láticas (DINIZ et al., 2003). Esses polissacarídeos são conhecidos como quefirano, ou fator de crescimento kefir – KGF. Este composto é parcialmente solúvel em água. Fazem parte de sua composição os monossacarídeos galactose e glicose (MOREIRA et al., 2008). O quefirano apresenta quantidades iguais de glicose e galactose (DAILIN et al., 2016), além de apresentar vários efeitos benéficos à saúde.

Estudo realizado por Jeong et al. (2017) isolou 22 estirpes de bactérias do ácido láctico, das quais, oito estirpes eram de *Lactobacillus kefiranofaciens*, duas estirpes eram de *Lactobacillus kefiri*, sete estirpes eram de *Lactococcus lactis* e cinco estirpes de *Leuconostoc mesenteroides*, com o objetivo de avaliar qual estirpe produzia a maior quantidade de exopolissacarídeo (EPS) kefirano. Além disso, os autores objetivaram isolá-lo e avaliar sua atividade antimicrobiana contra dois importantes patógenos, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*. A partir do DNA das bactérias isoladas, sequências parciais do RNA ribossômico 16S foram amplificadas. Para avaliar a produção de EPS pelas estirpes isoladas, tomaram como base a característica das colônias; formação de cápsulas dependentes de fontes de carbono e rendimento de EPS em caldo MRS. Eles concluíram que *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 era a estirpe com maior produção de EPS (EPS_DN1) e que a uma concentração de 1%, houve efeito bactericida contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*. Concluíram ainda que o EPS_DN1 não é kefirano, sugerindo então, que trata-se de um novo composto bioativo presente no kefir.

Hamet et al. (2013) relataram ainda que o quefirano apresenta atividade imunomoduladora de proteção das células epiteliais da ação de *Bacillus cereus*. Outras propriedades terapêuticas são atribuídas ao kefir, como diminuição dos efeitos da intolerância à lactose, imunomodulação, efeitos antimicrobianos, atividade anticarcinogênica e também regeneração hepática (SANTOS et al., 2012).

Em estudo realizado com ratos, com hipertensão induzida, observou-se a supressão do aumento da pressão sanguínea após 30 dias de tratamento com quefirano. Verificou-se atividade sobre a produção de β -interferon, cortisol e noradrenalina, o que possibilitou a redução do estresse, atividade antitumoral e antimicrobiana (MOREIRA et al., 2008).

Diniz et al. (2003) realizaram estudo *in vivo* para avaliar a possível atividade anti-inflamatória do kefir por meio de indução de tecido granulomatoso e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Foram utilizados ratos da raça Wistar e camundongos albinos, ambos machos. Por meio do método de indução de tecido granulomatoso foi possível avaliar se haveria atividade anti-inflamatória sobre processos crônicos. Para o cultivo do kefir

utilizou-se como substrato açúcar mascavo diluído em água mineral. Constatou-se que a administração de 1mL de kefir diariamente, durante seis dias, foi capaz de inibir a formação de tecido granulomatoso em 42% em comparação ao grupo controle. A inibição por dexametasona de aplicação tópica foi de 51%. A indução de contorções abdominais por ácido acético, resulta na produção de prostaglandinas, principalmente PGE_2 e PGF_2 , as quais são mediadores essenciais no processo inflamatório. Acredita-se que a inibição destas contorções possam estar envolvidas com a inibição da formação das prostaglandinas, tendo atividade sobre os processos inflamatórios. O grupo de ratos e camundongos que recebeu o kefir como parte do tratamento apresentou inibição de 28% e a inibição relativa à indometacina representou 36% quando comparado ao controle. Com base nesses resultados, os autores sugeriram que o kefir possui atividade anti-inflamatória.

Kim et al. (2017), a fim de avaliarem os efeitos do kefir sobre a obesidade e esteatose hepática em ratos alimentados com dieta rica em lipídeos (60% do total de calorias), verificaram que o grupo que recebeu a dieta hiperlipídica associada ao consumo de kefir (0,2 mL duas vezes ao dia) teve um ganho de peso menor quando comparado ao grupo controle, o qual recebeu a dieta hiperlipídica e leite (0,2 mL duas vezes ao dia). Em relação ao colesterol total e ao LDLc, verificaram que o grupo que recebeu kefir apresentou níveis plasmáticos mais baixos comparando-se ao controle. Os autores não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos nas concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β e TNF- α . Porém em relação à IL-6, o grupo do kefir apresentou níveis plasmáticos mais baixos, sugerindo uma melhora da inflamação sistêmica promovida pela dieta hiperlipídica.

Já Fernandes et al. (2017) avaliaram os teores de isoflavonas e compostos fenólicos presentes no leite de soja fermentado com kefir após armazenamento e simulação das condições gastrointestinais *in vitro*. Para obtenção do extrato, 250g de soja foram maceradas em 300mL de água, ficando sob armazenamento a 5 °C durante 15 horas. Kefir liofilizado foi inoculado no extrato de soja a 25 °C, fermentando durante 15 horas, sendo em seguida mantido sob refrigeração a 4 °C, em frascos estéreis, durante quatro dias. Os autores verificaram que a fermentação proporcionou aumento das bactérias ácido lácticas e que as leveduras permaneceram viáveis durante todo o período de armazenamento. No entanto, após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, a contagem padrão em placas de microrganismos foi inferior a 6 log UFC/g. Quanto às isoflavonas e aos compostos fenólicos, verificaram que os mesmos aumentaram, mesmo após o teste *in vitro*.

Fiorda et al. (2016) avaliaram diferentes tipos de substratos funcionais com o objetivo

de desenvolver bebidas probióticas utilizando kefir como cultura inicial. Os substratos analisados foram a soja, o colostro (bovino) e o mel. Da soja, foi obtido o extrato. Já o mel foi diluído em água estéril até que fosse obtido um mosto de 40 °Brix e o colostro foi coletado nas primeiras 12 horas pós-parto. Foram utilizados kefir tibetano (cultivados em leite) e kefir mexicano (cultivados em açúcar). Kefir tibetano foi inoculado no extrato de soja e colostro, e kefir mexicano foi inoculado no mel, deixando-se fermentar por 24 horas a 30 °C. Foram analisadas as características físico-químicas, características funcionais e sensoriais das bebidas. Após análises, foi constatado que kefir melhorou a qualidade funcional de todos o substratos avaliados. No entanto, a bebida à base de mel apresentou maior poder antioxidante, apresentando proteção aos danos do DNA. Em relação à análise sensorial, a bebida à base de mel apresentou melhor aceitação comparando-se ao cultivo tradicional no açúcar mascavo. Os autores concluíram que o mel seria o substrato ideal para produção de bebida fermentada, com alto poder antioxidante, baixos teores de lactose e boa composição de microrganismos probióticos.

Estudo realizado por Weschenfelder et al. (2011) avaliou características físico-químicas e composição centesimal (Tabela 1) do kefir.

Tabela 1. Características físico-químicas e composição centesimal de kefir.

COMPONENTES	VALORES
pH	3,60
Acidez (°D)	141,95
Umidade (%)	79,39
Proteína (%)	9,23
Gordura (%)	8,29
Cinzas (%)	0,89
Cálcio (%)	0,11
Lactose (%)	ausência

Fonte: Weschenfelder et al. (2011).

3.2.1. Características nutricionais de kefir

O valor nutricional de um leite fermentado depende da disponibilidade e da digestibilidade de nutrientes e das alterações decorrentes da fermentação e crescimento microbiano. Geralmente, o valor energético do leite fermentado é similar ao do leite em que foi preparado (KHEDKAR; KALYANKAR; DEOSARKAR, 2016).

Dentre as características nutricionais encontradas no kefir, é importante salientar que este apresenta boa digestibilidade e é considerado a melhor fonte natural de probióticos

(SATIR; ZEYNEP B.; GUZEL-SEYDIM, 2016). Recentes descobertas confirmaram que kefir foi capaz de digerir β e α - caseína, porém não hidrolisou a β -lactoglobulina, mesmo com tempo prolongado de fermentação. A maior digestibilidade no kefir poderia melhorar a saúde intestinal por limitar a produção de metabólitos inflamatórios por bactérias putrefativas no cólon (DALLAS et al., 2016).

Kefir contém aminoácidos essenciais, vitaminas (B1, B2, B5, C, A, K e carotenos) e minerais. É importante destacar que a composição vitamínica de kefir é influenciada pelo tipo de leite e também pela microbiota dos grãos (ARSLAN, 2015).

Satir; Zeynep; Guzel-Seydim (2016) afirmaram que o tipo de manejo nutricional ao qual a espécie animal (bovina ou caprina) é submetida também exerce influência nas características nutricionais do kefir. Eles destacaram que kefir produzido do leite de animais mantidos sob o sistema de alimentação extensiva apresentaram parâmetros nutricionais melhores quando comparados com kefir produzido a partir do leite de animais mantidos sob o sistema de alimentação intensiva. Componentes nutricionalmente benéficos estavam presentes em níveis significativamente superiores em kefir produzidos de leite de animais mantidos sob manejo à pasto em comparação a um sistema de alimentação intensivo.

O perfil aminoacídico de kefir (Tabela 2) sofre alterações durante a fermentação do leite, sendo maiores os níveis de treonina, lisina, serina e alanina (ARSLAN, 2015). Dallas et al. (2016) demonstraram que peptídeos funcionais são liberados pela hidrólise de proteínas pelos microrganismos de kefir, podendo melhorar a funcionalidade do produto.

Tabela 2. Perfil de aminoácidos essenciais presentes no kefir.

Aminoácidos	Quantidade no Kefir (mg/100g)
Valina	220
Isoleucina	262
Metionina	137
Lisina	376
Treonina	183
Fenilalanina	231
Triptofano	70

Fonte: Arslan (2015).

Além de macroelementos, microelementos são encontrados nos grãos de kefir. Este também é uma boa fonte de cálcio, magnésio e fósforo (Tabela 3). O fósforo é o segundo mineral em maior quantidade no corpo humano. Suas funções no organismo são auxiliar na utilização de carboidratos, proteínas e gorduras para o crescimento celular, manutenção e energia.

Tabela 3. Macro e micro elementos presentes nos grãos de Kefir.

Macro elementos	Valores encontrados (%)	Micro elementos	Valores encontrados (mg/kg)
Potássio	1,65	Cobre	7,32
Cálcio	0,86	Zinco	92,7
Fósforo	1,45	Ferro	20,3
Magnésio	0,3	Manganês	13,0
		Cobalto	0,16
		Molibdênio	0,33

Fonte: Arslan, (2015).

Estudo conduzido por Satir; Zeynep; Guzel-Seydim (2016) ao avaliarem como a fermentação do kefir poderia afetar a composição do produto e correlacionaram os valores de algumas vitaminas e minerais encontrados no kefir produzido a partir de leite de cabra com os valores da *recommended dietary allowances* (RDA). Os autores verificaram que o consumo de 1 copo de 200 mL de kefir supriria, em relação ao percentual da RDA, os seguintes valores de recomendação: 15% de vitamina A; 30% de vitamina B2; 23% de cálcio; 33% de fósforo e 14% de zinco.

3.3. Prebióticos

Prebióticos são definidos como componentes alimentares não digeríveis, capazes de estimular seletivamente a multiplicação ou atividade das bactérias desejáveis no intestino (MACEDO et al., 2008; MONA et al., 2015) conferindo efeitos benéficos ao hospedeiro, devido à sua capacidade em estimular o crescimento e a atividade de um número limitado de bactérias, usualmente lactobacilos e bifidobactérias (MONA et al., 2015).

A maior frequência de atuação dos prebióticos é no intestino grosso, embora possam apresentar certo impacto sobre os microrganismos encontrados no intestino delgado (OLIVEIRA, 2009). Para que um alimento possa ser classificado como prebiótico, precisa ser carboidrato e atender aos seguintes critérios: não sofrer hidrólise ou ser absorvido no trato intestinal e que sua fermentação se dê por um número limitado de microrganismos, como pelas bifidobactérias e pelos lactobacilos (COSTA et al., 2013). São considerados prebióticos: inulina (frutanos), frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e também a lactulose, álcoois de açúcar, amido resistente e polissacarídeos complexos, como por exemplo

a goma de acácia. Muitos substratos não digeríveis, especialmente os carboidratos, são fermentados no intestino grosso (SCHOLZ-AHRENS et al., 2016).

A associação entre probiótico e prebiótico origina os produtos denominados simbióticos. A interação *in vivo* entre probiótico e prebiótico pode ser favorecida através de uma adaptação, anterior ao consumo, do probiótico ao substrato prebiótico. Tal adaptação pode resultar em vantagem competitiva para o probiótico, caso este seja consumido juntamente com o prebiótico. Esse efeito simbiótico pode ser, alternativamente, direcionado ao intestino delgado e grosso, regiões alvo do trato gastrointestinal. O estímulo de estirpes probióticas conhecidas, propicia a escolha dos pares simbióticos substrato–microrganismo ideais. Portanto, o consumo de pro e prebióticos selecionados apropriadamente, pode aumentar os efeitos benéficos de cada um deles (OLIVEIRA, 2009). A combinação entre um prebiótico específico e um probiótico, exerce um efeito benéfico que vai além do seu efeito individual, o que presume-se ocorrer através da otimização da sobrevivência e atividade de microrganismos benéficos no trato gastrointestinal (SCHOLZ-AHRENS et al., 2016). No entanto, Vandenplas; Huys; Daube (2015) relataram que após um tratamento com probióticos e prebióticos, simultaneamente, por meio de uma mistura de quatro estirpes e galactoligossacarídeos, realizado com gestantes por duas a quatro semanas pré-parto e aos neonatos durante seis meses, não obteve efeito, comparado ao placebo, sobre a incidência acumulada de doenças alérgicas aos dois anos. Todavia, mostrou uma tendência na diminuição das doenças relacionadas à IgE (atópica), por ter sido observada uma diminuição significativa do eczema (atópico).

A administração de prebióticos aumenta a microbiota intestinal benéfica do indivíduo, em particular, as bifidobactérias. Além de contribuir para elevação dos níveis de citocinas anti-inflamatórias e diminuição nos níveis das citocinas pró-inflamatórias, o que resulta em diminuição da inflamação intestinal em idosos (PATEL et al., 2014).

A inulina, um frutooligossacarídeo não digerível, comumente extraída da raiz de chicória, é considerada um prebiótico por ter a capacidade de elevar o número de probióticos no cólon (MAESTRI et al., 2014). Os FOS podem ser extraídos de vegetais como alcachofra, raiz da chicória, dália, alho, cebola, dente de leão, banana, dentre outros. Embora a quantidade existente nestes alimentos seja pequena e, em contrapartida, a quantidade exigida para se obter efeito funcional seja elevada, os FOS podem ser extraídos e concentrados (THAMER; PENNA, 2005).

Há um consenso de que os FOS alteram o habitat intestinal, promovendo aumento no bolo fecal e em consequência a normalização da frequência fecal. Seus efeitos prebióticos são percebidos com o aumento no número e atividade de bifidobactérias e bactérias ácido lácticas no intestino humano. Em função disso, os FOS assumem importância tecnológica por serem utilizados na fabricação de uma grande variedade de alimentos como, por exemplo, iogurte, queijo, leite, extrato de soja, cereais, dentre outros (THAMER; PENNA, 2005).

Tem sido demonstrado que prebióticos e simbióticos podem aumentar a absorção de minerais, especialmente de cálcio e magnésio. Os mecanismos relacionados são: maior solubilidade dos minerais, decorrente do aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta pelas bactérias, devido à maior oferta de substrato; alargamento da superfície de absorção em razão da multiplicação de enterócitos, mediados pelos produtos da fermentação bacteriana, em especial, lactato e butirato; maior expressão das proteínas de ligação de cálcio; melhoria das condições intestinais; degradação de mineral complexante de ácido fítico; estabilização da microbiota intestinal (PATEL et al., 2014).

O metabolismo e composição dos prebióticos são diferentes embora possuam mecanismos de atuação em comum, especialmente no que diz respeito à modulação da microbiota endógena. Enquanto não sofrem fermentação, os prebióticos exercem um efeito osmótico no trato gastrointestinal, como todo carboidrato não digerível.

A inulina e a oligofrutose apresentam resistência à digestão na parte superior do trato intestinal, sofrendo fermentação ao chegarem no cólon. A fermentação promove um aumento na biomassa microbiana, em consequência, aumento de volume, promovendo um aumento na frequência das evacuações. Tais efeitos justificam sua classificação como fibras dietéticas (SAAD, 2006).

3.4. Mel: composição e propriedades funcionais

A Instrução Normativa nº11, de 20 de outubro de 2000, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define mel como produto alimentício produzido por abelhas melíferas, obtido do néctar das flores ou de secreções provenientes de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, as quais são recolhidas pelas abelhas, que transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia (BRASIL, 2000).

O mel é considerado um alimento funcional por exercer função prebiótica, tendo como efeitos a regulação do trânsito intestinal, controle da pressão arterial, diminuição do risco de câncer e redução da colesterolemia (MACEDO et al., 2008). Por apresentar doçura e sabor característico, o mel agrega sabor à bebida quando adicionado, tendo em vista que é composto de uma solução concentrada de açúcares, predominantemente glicose e frutose. Contém ainda uma mistura complexa de outros carboidratos, enzimas, aminoácidos, ácidos orgânicos, minerais, substâncias aromáticas e grãos de pólen, e pode conter cera de abelhas proveniente do processo de extração. A produção de ácido é favorecida na presença do mel, por conter alto teor de carboidratos fermentáveis (MARIN et al., 2014).

O mel contém tipos e níveis mínimos de microrganismos. A eles são atribuídas as propriedades naturais e também o controle realizado pela indústria, geralmente relacionado à fatores físicos e químicos, tais como osmolaridade e concentração de peróxido de hidrogênio e voláteis, respectivamente. Compostos fenólicos e a enzima glicose oxidase presentes no mel proporcionam uma barreira ao desenvolvimento de microrganismos em razão da forte característica oxidante destes compostos. A quantidade de bactérias presentes no mel pode variar de acordo com os seguintes fatores: tipo de mel; idade; tempo de colheita e a técnica de análise empregada (GOIS et al., 2013).

Além de ser utilizado como prebiótico, o mel possui outros benefícios. Em estudos realizados por Silva et al. (2014), foi verificado e comprovado o efeito antioxidante do mel, por meio da análise do perfil de compostos fenólicos e também da atividade sequestradora de radical livre do mel. Foram identificadas e quantificadas as substâncias 4-quinolona, ácido (2E, 4E)-abscísico e ácido (2Z, 4E)-abscísico.

Mercês et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana do mel produzido por diferentes espécies de abelhas e verificaram que todos os tipos de mel avaliados apresentaram ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*. O método de análise utilizado foi o teste de difusão em poço. O estudo sugere que o efeito de inibição de crescimento bacteriano não está relacionado somente ao efeito osmótico, visto que o mel foi mais efetivo contra as bactérias do que uma solução de açúcar.

Além disso, Santos et al. (2012) avaliaram a eficácia do mel na cicatrização de feridas em ratos da raça Abissínia. Com o estudo, os pesquisadores puderam comprovar que o mel apresenta ação cicatrizante, estimulando a formação de tecido de granulação e reepitelização.

Algumas características apresentadas pelo mel o tornam eficaz contra alguns microrganismos, como por exemplo, podemos citar alta pressão osmótica (85-95% de açúcar)

pela baixa atividade de água, pH baixo devido à presença de ácidos orgânicos, especialmente ácido glucônico, presença de peróxido de hidrogênio (ação da enzima glicose oxidase), baixo teor de proteínas, baixo potencial redox (presença de açúcares redutores), presença de agentes químicos, tais como, lisozima, ácidos fenólicos, pinocembrina, terpenos, álcool benzílico e substâncias voláteis (SILVA et al., 2017). O baixo pH do mel exerce um papel importante durante a armazenagem por influenciar sua estabilidade (SILVA et al., 2014).

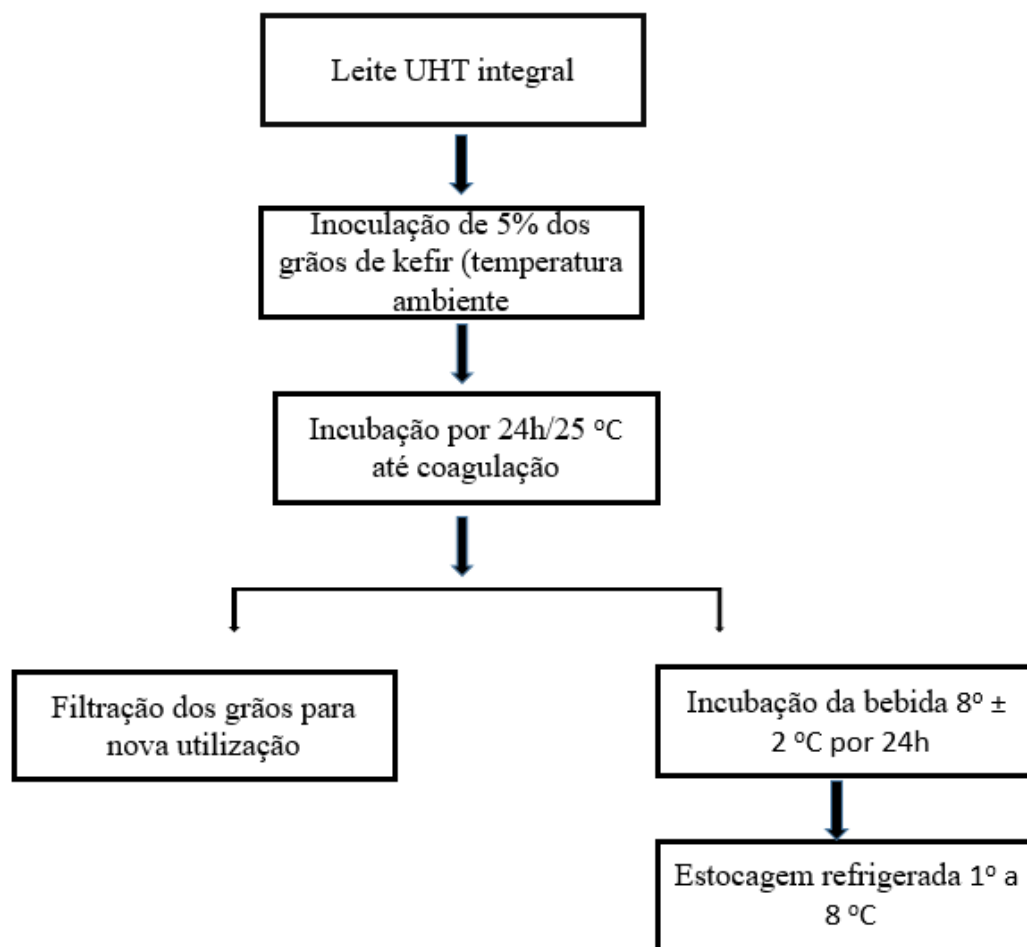
As abelhas transformam o néctar em mel com o auxílio de algumas enzimas e, durante a produção, alguns microrganismos também são incorporados ao mel. A bactéria *Gluconobacter oxydans* foi isolada do mel mantendo-se viva no pH de 5,0 e no pH de 2,0 durante três horas, obteve-se uma taxa de sobrevivência de 50%. Também mostrou-se resistente à ação dos sais biliares. Desta forma, *Gluconobacter oxydans* é capaz de sobreviver ao ambiente hostil do trato digestivo superior, chegando ao intestino em condições de colonização (SILVA et al., 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Análise de Alimentos, Microbiologia de Alimentos e Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba. O experimento foi conduzido em três repetições e em duplicata. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do IF Sudeste-MG, e os participantes da pesquisa assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.1. Cultivo do Kefir

O kefir foi obtido por doação e cultivado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IF Sudeste MG/Campus Rio Pomba. O substrato escolhido para o cultivo dos grãos de kefir foi o leite UHT integral, e a fonte de prebiótico testada foi o mel, ambos obtidos no comércio local. A ativação dos grãos de kefir ocorreu conforme demonstrado na Figura 1.



Fonte: Adaptado de COSTA; ROSA, (2016).

Figura 1: Fluxograma da ativação dos grãos de kefir.

Foi preparada uma solução de 50% m/v de mel, diluído em água destilada, submetida à pasteurização a 78°C/6 minutos em banho-maria para eliminação de patógenos, conforme Macedo et al. (2008), sendo essa solução adicionada no kefir a fim de se obter os tratamentos 2, 3 e 4. Foram preparados quatro amostras: 1 - cultivo do kefir no leite sem adição de mel (controle); 2 – cultivo do kefir no leite com adição de 1% de mel; 3 – cultivo do kefir no leite com adição de 3% de mel; 4 – cultivo do kefir no leite com adição de 5% de mel (MACEDO et al., 2008; USTUNOL, 2017).

O cálculo da concentração de mel a ser adicionado em cada amostra foi feito da seguinte maneira:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Em que:

C_1 : concentração de mel na solução (50%)

V_1 : volume desejado para cada concentração de mel a ser utilizada

C_2 : concentração de mel a ser utilizado

V₂: volume de leite utilizado

Após os cálculos, o volume da solução adicionada para as bebidas fermentadas contendo 1, 3 e 5% de mel foi de 10, 30 e 50 mL, respectivamente.

4.2. Preparo da bebida com adição de mel

Ao leite UHT integral foi acrescido o mel nas diferentes concentrações avaliadas (1, 3 e 5%) e, em seguida as amostras foram homogeneizadas para posterior inoculação de 5% dos grãos de kefir previamente ativados (Figura 1).

Após 24 horas de fermentação, os grãos de kefir foram separados da bebida fermentada com o auxílio de uma peneira e lavados com água destilada. A bebida fermentada foi armazenada sob refrigeração (1 – 8 °C) durante 21 dias para análises posteriores. As análises foram realizadas nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento, conforme proposto por Carvalho, (2011).

4.3. Avaliação microbiológica das bebidas fermentadas

Foram realizadas as seguintes análises: coliformes e *E. coli* a 30 e 45°C, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* sp e contagem de microrganismos em ágar MRS. Análises microbiológicas foram feitas nos quatro tratamentos para verificar a conformidade com os padrões de identidade e qualidade para kefir estabelecidos na Instrução Normativa nº46 do MAPA (BRASIL, 2007).

4.3.1. Determinação do Número Mais Provável de coliformes e identificação de *E. coli*

O Número Mais Provável (NMP) de coliformes e *E. coli* a 35°C e 45°C foi determinado conforme estabelecido por Kornacki; Johnson (2001).

4.3.2. Determinação de *Salmonella* sp.

A determinação de presença/ausência de *Salmonella* sp foi realizada em 25 gramas do produto homogeneizados em 225 ml de caldo lactosado segundo metodologia descrita por Andrews et al. (2001).

4.3.3. Determinação de estafilococos coagulase positiva

A determinação de estafilococos coagulase foi realizada conforme metodologia descrita por Lancett; Bennett (2001).

4.3.4. Contagem de microrganismos em ágar MRS

Amostras de 25 g das bebidas fermentadas foram homogeneizadas em 225 mL de solução salina peptonada (0,85 % de NaCl e 0,1 % de peptona) obtendo-se a diluição 10^{-1} . Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas. A contagem de microrganismos foi realizada utilizando-se ágar DeMan, Rogosa & Sharpe-MRS. A quantidade de 1 mL de cada diluição das amostras foi inoculada em placas de Petri adicionando-se, em seguida, o meio MRS (plaqueamento em profundidade). Após a completa solidificação do ágar, as placas foram incubadas invertidas a 37 °C durante 72 horas em atmosfera microaerófila, utilizando-se jarros de anaerobiose. Na sequência, foram contadas as placas que apresentaram 25 a 250 colônias (RICHER; VEDAMUTHU, 2001).

4.4. Caracterização físico-química das bebidas fermentadas

As análises físico-químicas de pH e acidez das bebidas fermentadas (KP, K1, K3, K5) foram realizadas nos tempos 0, 7, 14 e 21 dias, em duplicata e em três repetições.

4.4.1. Determinação de pH

A determinação de pH foi realizada conforme Zenebon; Pascuet; Tiglia (2008), sendo utilizados 100 mL de cada amostra e transferidos para béqueres distintos. Em seguida, o eletrodo do potenciômetro (previamente calibrado com soluções tampão com pH 4 e 7) foi introduzido para a realização da leitura. Ao final de cada análise, o eletrodo foi lavado com água destilada e seco com papel macio.

4.4.2. Determinação da acidez em ácido láctico

Conforme Zenebon; Pascuet; Tiglea (2008), foram utilizados 10 mL de cada amostra que foram transferidos para um béquer de 50 mL. Posteriormente, foram adicionados com o auxílio de pipeta graduada, aproximadamente 10 mL de água destilada e misturada com bastão de vidro. Em seguida, foram adicionadas 5 gotas da solução de fenolftaleína e titulada com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando bureta de 25 mL, até o aparecimento de uma coloração rósea.

O cálculo foi feito de acordo com a equação:

$$\frac{V \times f \times 0,9}{P} = g \text{ de ácido láctico} / 100 \text{ mL do produto m/v}$$

Em que:

V = nº de mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M gasto na titulação

P = nº g ou mL da amostra

0,9 = fator de conversão para o ácido láctico

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 M

4.5. Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais

A metodologia adotada para simulação *in vitro* foi a de Bedani; Rossi; Saad (2013). Para dar início ao estudo *in vitro*, procedeu-se o preparo de soluções de ácido clorídrico (HCl) 1 N e hidróxido de sódio (NaOH) 1N. A simulação *in vitro* foi realizada com as amostras de kefir puro (KP) e kefir com 3% de mel (K3) nos tempos 0, 7 e 14 dias. Para a simulação da fase gástrica (FG) partiu-se de uma diluição 10^{-1} das amostras em solução salina a 0,85%, sendo retirado alíquotas de 10 mL, transferidos para frascos estéreis de 100 mL para ajuste de pH. Foi adicionado HCl 1 mol.l⁻¹ para que o pH fosse ajustado de 2,3 – 2,5. Aos frascos foram adicionadas 3 g.L⁻¹ pepsina (isolada de mucosa gástrica de porco, Sigma-Aldrich) e 0,9 mg.L⁻¹ de lipase (Amano lipase G, isolada de *Penicillium Camemberti*, SigmaAldrich). Logo após a adição das enzimas, os frascos foram submetidos à incubação em shaker sob agitação a 150 rpm durante 2 horas a 37 °C. Ao final do período de incubação foi realizado plaqueamento em profundidade em ágar MRS a fim de verificar a viabilidade dos microrganismos do produto. As placas foram incubadas em condições de anaerobiose a 37 °C

por 72 h. Os resultados das contagens em placa foram expressos em log UFC.mL⁻¹. Os frascos que não foram plaqueados seguiram para a simulação da fase entérica I (FE I), sendo o pH ajustado para 5,5 – 5,7, utilizando-se solução tampão pH 12; 14 g de NaH₂PO₄. 2H₂O (Vetec, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil) contendo bile (bile bovina, Sigma-Aldrich) e pancreatina (pancreatina isolada de pâncreas de suíno, Sigma-Aldrich), na proporção de 10,0 g.L⁻¹ e 1,0 g.L⁻¹, respectivamente. Os frascos foram submetidos à incubação em shaker sob agitação a 150 rpm durante 2 horas a 37 °C e ao término do período de incubação procedeu-se novamente o plaqueamento em profundidade nas mesmas condições citadas para a FG. Os frascos restantes foram submetidos à simulação da fase entérica II (FE II). O pH foi ajustado para 6,4 – 6,5 utilizando a mesma solução alcalina contendo bile (10,0 g.L⁻¹) e pancreatina (1,0 g.L⁻¹). Os frascos foram mantidos sob incubação nas mesmas condições citadas para as fases anteriores e plaqueadas também sob as mesmas condições.

4.6. Avaliação da aceitação sensorial

A avaliação da aceitação sensorial foi realizada utilizando escala hedônica de nove pontos conforme metodologia descrita por Minim (2013). Foram analisados os seguintes atributos: impressão global; coloração; aroma; consistência; acidez e sabor. As amostras escolhidas para a avaliação foram aquelas que apresentaram melhor contagem de microrganismos em ágar MRS, sendo os mesmos tratamentos utilizados para o teste *in vitro*. Foram recrutados cinquenta julgadores não treinados. O teste de aceitação foi realizado no Laboratório de Análise Sensorial do IF Sudeste MG/Campus Rio Pomba. Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO 2), os julgadores foram conduzidos às cabines individuais onde receberam amostras devidamente codificadas, copo com água para lavagem da boca (papilas gustativas) e fichas com a escala hedônica para preenchimento. Os julgadores foram devidamente orientados acerca das condições para realização do teste e preenchimento da escala hedônica.

4.7. Análises estatísticas

Os experimentos foram conduzidos em três repetições, sendo as análises físico-químicas, microbiológicas e viabilidade das amostras realizadas em duplicata. O ensaio *in vitro* de simulação das condições gastrointestinais foi realizado em triplicata. Para as análises físico químicas (pH e acidez), o experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) em esquema fatorial 4 x 4 (amostras x tempo). O experimento de viabilidade foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado em esquema fatorial 4 x 4 (microrganismos x tempo). O estudo da simulação *in vitro* do TGI foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 3 x 3 (amostras, fases e tempo) utilizando-se o software R 3.2.5 (R Core team, 2015) com o pacote ExpDes.pt.

A análise sensorial foi realizada com 50 provadores não treinados e os resultados foram analisados por Delineamento em Blocos Casualizado (DBC). Os resultados foram avaliados por meio de análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas utilizando software Sisvar 5.6.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação microbiológica das bebidas fermentadas

Os resultados obtidos na 1ª repetição mostraram uma inadequação quanto ao NMP de coliformes totais e termotolerantes, por não atenderem aos valores estabelecidos na RDC nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001). A partir dessa análise, o kefir foi mantido sob fermentação no mesmo substrato (leite) sem filtração dos grãos durante 14 dias, a fim de acidificar o meio e consequentemente diminuir o NMP de coliformes totais e termotolerantes, uma vez que o ácido lático possui efeito inibitório sobre os microrganismos patogênicos e deteriorantes (MAGALHÃES et. al., 2011) e, a presença de alguns compostos inibitórios no kefir como, bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, e ácidos orgânicos, podem influenciar na morte de microrganismos patogênicos (SILVA et. al., 2009). Após esse período, a partir de novas análises, constatou-se que a bebida fermentada encontrava-se de acordo com os padrões seguros para consumo humano conforme estabelecido na legislação (BRASIL, 2001).

A RDC nº 12 (BRASIL, 2001), estabelece o limite máximo de 10 UFC.g⁻¹ para coliformes a 45 °C em leite fermentado e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g para bebidas lácteas fermentadas. Tais valores garantem a segurança microbiológica do produto.

No presente estudo verificou-se contagem < 3,0 x 10¹ NMP.g⁻¹ para coliformes totais e *E. coli* e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g das amostras analisadas, indicando que estes estavam aptos para consumo humano.

A legislação não preconiza valores para coliformes a 35 °C em leites fermentados, porém a presença desses microrganismos pode indicar condições higiênicas-sanitárias deficientes, colocando em risco a saúde do consumidor (MENEZES; ALEXANDRINO, 2014).

Em relação à viabilidade do microrganismos em ágar MRS (Figura 2), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras ao longo do tempo. Observou-se comportamento similar entre as amostras com 1 e 5% de mel. A contagem inicial aproximadamente 8,0 Log UFC.g⁻¹ mantendo-se até o 14º dia de análise, e no 21º dia, a contagem foi de aproximadamente 7,3 Log UFC.g⁻¹. Em relação ao kefir puro, observou-se que no 7º dia de armazenamento houve redução na viabilidade de 1 ciclo Log, e com 21 dias de armazenamento, a contagem foi de aproximadamente 7,35 Log UFC.g⁻¹. A amostra com 3% de mel foi de aproximadamente 8,00 Log UFC.g⁻¹ para 8,83 Log UFC.g⁻¹ aos 7 dias de armazenamento, porém, aos 14 e 21 dias apresentou comportamento similar aos demais tratamentos, reduzindo sua contagem em aproximadamente 1 ciclo Log.

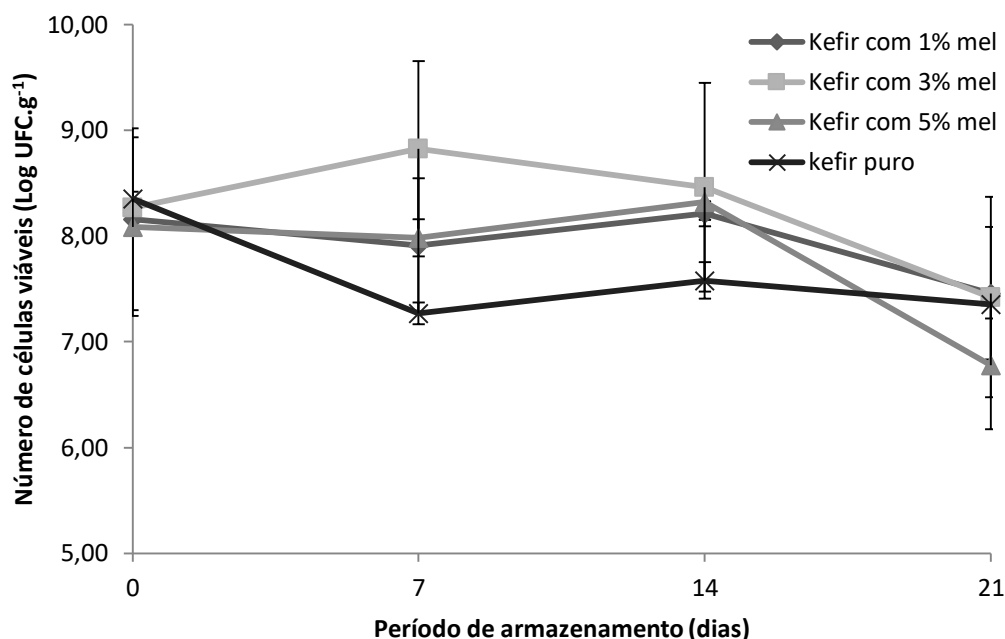


Figura 2- Viabilidade de microrganismos em ágar MRS em kefir puro e adicionado de mel com 0, 7, 14 e 21 dias de armazenamento.

Mc Cann; Fabre; Day (2011) sugerem que a diminuição do pH e o aumento da acidez inibem o crescimento de bactérias lácticas durante o armazenamento, o que foi observado nas amostras com 1, 3 e 5% de mel, que apresentaram aumento de acidez com o passar do tempo (Tabela 4).

Resultado similar a este estudo foi relatado por Baú; Garcia; Ida (2014) ao avaliarem a viabilidade de bactérias lácticas de uma bebida probiótica de soja fermentada com kefir. Após 28 dias de armazenamento, verificaram uma queda na viabilidade em cerca de 2 ciclos Log bem como diminuição do pH e aumento da acidez.

Carvalho (2011) ao avaliar o efeito do método de produção na vida de prateleira de amostras de kefir tradicional durante 28 dias de armazenamento, verificou que a contagem de bactérias lácticas apresentou diferença estatística entre uma das amostras avaliadas no 2º e 7º dias de estocagem, quando houve redução da contagem. Porém ao final do período, todas as amostras de kefir tradicional avaliadas apresentaram contagens de bactérias lácticas de aproximadamente 8,00 Log UFC. mL⁻¹.

Corona et al. (2016), ao avaliarem sucos de frutas e vegetais fermentados com kefir de água, verificaram que após 48 horas de fermentação a 25 °C a contagem de lactobacilos encontrava-se entre 7,0 e 8,3 Log UFC/mL.

5.2. Caracterização físico-química das bebidas fermentadas

As amostras não diferiram entre si ($p < 0,05$) quanto aos valores de pH e acidez (Tabela 5). Quanto ao pH não houve interferência significativa do tempo de armazenamento ($p > 0,05$). Já para a acidez, as amostras de kefir com 1 e 3% de mel apresentaram maior acidez ($p < 0,05$) após 21 dias de armazenamento enquanto que a amostra com 5% de mel apresentou aumento de acidez a partir de 14 dias de maturação ($p < 0,05$), indicando que o mel interfere na acidez do produto com o passar do tempo. Para o kefir puro, a acidez não foi afetada com o tempo.

Em relação ao estabelecido pela legislação para acidez (BRASIL, 2007), verificou-se que apenas o kefir puro e kefir com 3% de mel no tempo zero estavam de acordo com o determinado, apresentando valores de acidez $< 1,0\%$ (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados de pH e acidez das amostras de kefir puro e adicionado de 1, 3 e 5% de mel ao longo de 21 dias de armazenamento.

Tratamentos	pH/tempo (dias)			
	0	7	14	21
Kefir puro	4,28±0.52Aa	3,79±0.39Aa	3,58±0.47Aa	3,63±0.35Aa
Kefir com 1% mel	4,23±0.73Aa	3,66±0.22Aa	3,47±0.27Aa	3,40±0.20Aa
Kefir com 3% mel	4,26±0.60Aa	3,68±0.37Aa	3,45±0.36Aa	3,52±0.28Aa
Kefir com 5% mel	4,13±0.66Aa	3,57±0.20Aa	3,43±0.21Aa	3,38±0.18Aa
Tratamentos	acidez/tempo (dias)			
	0	7	14	21
Kefir puro	0,83±0.23Aa	1,33±0.47 Aa	1,56±0.75 Aa	1,67±0.86 Aa
Kefir com 1% mel	1,03±0.35 Aa	1,36±0.35 Aab	1,86±0.23 Aab	1,97±0.50 Ab
Kefir com 3% mel	0,96±0.46 Aa	1,50±0.52 Aab	1,78±0.62 Aab	1,93±0.71 Ab
Kefir com 5% mel	1,06±0.40 Aa	1,66±0.40 Aab	1,96±0.40 Ab	2,03±0.51 Ab
Padrão	$< 1,0\%$			

(Brasil, 2007)

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras e letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa entre as amostras ao longo do tempo.

Weschenfelder et al. (2011) ao analisarem as características físico-químicas e sensorial de kefir tradicional e derivados provenientes da fermentação de grãos de kefir com diferentes concentrações de leite, verificaram que houve diferença significativa nos valores de pH. A fermentação do kefir no leite se deu em 24 h a 25 °C e a maturação em 6 dias a 7 °C. A média dos valores de pH encontrados variaram de 3,60 à 3,79. Em relação à acidez (°D), os autores verificaram que houve diferença entre as amostras analisadas. A média dos valores encontrados variou entre 141,95 a 266,98. De acordo com os autores os valores de acidez encontrados ficaram acima do que é estabelecido pela legislação.

Leite et al. (2013) ao analisarem as características físico-químicas do kefir fermentado em leite após as 24 horas de fermentação até 28 dias de armazenamento, verificaram que os valores do pH declinaram progressivamente enquanto os valores de acidez aumentaram durante a estocagem. Como consequência da produção de ácidos, o pH que inicialmente era de 6,55, ao final do período de análise chegou a 4,31. Nas primeiras 24 horas após a fermentação, a produção de ácido láctico foi de 7,38 mg/L, enquanto que no final do período de estocagem, 28 dias, a produção de ácido láctico foi de 9,54 mg/L.

Campolina et al. (2017) avaliaram os valores de pH e acidez de antepastos funcionais produzidos com kefir e sementes de chia. Os antepastos foram produzidos com sabor de frango e diferentes concentrações de sementes de chia (0%, 10% e 20%). Ao final das análises, concluíram que os valores de pH não diferiram estatisticamente entre as amostras. Da amostra com 0% de semente de chia foi obtido o valor de pH de 4,59, enquanto que as amostras contendo 10 e 20% de semente de chia apresentaram os valores de pH de 4,54 e 4,56, respectivamente. Quanto à acidez, apenas a amostra contendo 20% de semente de chia diferiu estatisticamente das demais, sendo que os valores de ácido láctico obtidos para as amostras 0%, 10% e 20% foram respectivamente 1,5%, 1,28% e 1%.

Estudo realizado por Magalhães et al. (2011) avaliou a estrutura, comunidades microbianas e composição química de grãos de kefir brasileiro. Verificou-se que após 24 horas de fermentação dos grãos no leite pasteurizado, o valor de pH passou de 6,61 (leite) para 4,42 (bebida fermentada). Quanto à acidez, a mesma passou de 26°D (leite) para 93°D (bebida fermentada).

Karaca et al., (2017) avaliaram dentre outras características, a composição físico-química de manteiga produzida com kefir. As análises foram realizadas no primeiro e 21º dias de armazenamento. A amostra de manteiga produzida com kefir apresentou os valores de pH de 4,78 e 4,12 no primeiro e 21º dia, respectivamente.

5.3. Viabilidade de microrganismos em ágar MRS após simulação *in vitro* das Condições Gastrointestinais

Em relação à viabilidade de microrganismos em ágar MRS após simulação das condições gastrointestinais (Figura 3), observou-se que o KP e K3 apresentaram diferença significativa na viabilidade de bactérias lácticas e leveduras ($p < 0,05$) antes e após a submissão da bebida às condições gástricas (FG) no tempo zero, sendo a contagem inicial de aproximadamente $8,0 \text{ Log UFC.g}^{-1}$, reduzida a aproximadamente $6,00 \text{ Log UFC.g}^{-1}$ após a fase entérica II (FE2). Nos tempos subsequentes de estocagem, 7 e 14 dias, para KP e K3 verificou-se um decréscimo na viabilidade dos microrganismos, com contagens próximas a $5,0 \text{ Log UFC.g}^{-1}$. Como a porção diária mínima de microrganismos probióticos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos terapêuticos é de 10^8 a 10^9 UFC.g^{-1} (BRASIL, 2008; FAO, 2001; SAAD, 2006), o consumo de 100 g diárias pode suprir as necessidades do consumidor logo após o preparo do produto.

Observou-se neste estudo que a contagem inicial de lactobacilos do kefir em todos quatro tratamentos estavam de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira (BRASIL, 2007) onde o mínimo exigido é de 10^7 UFC/g .

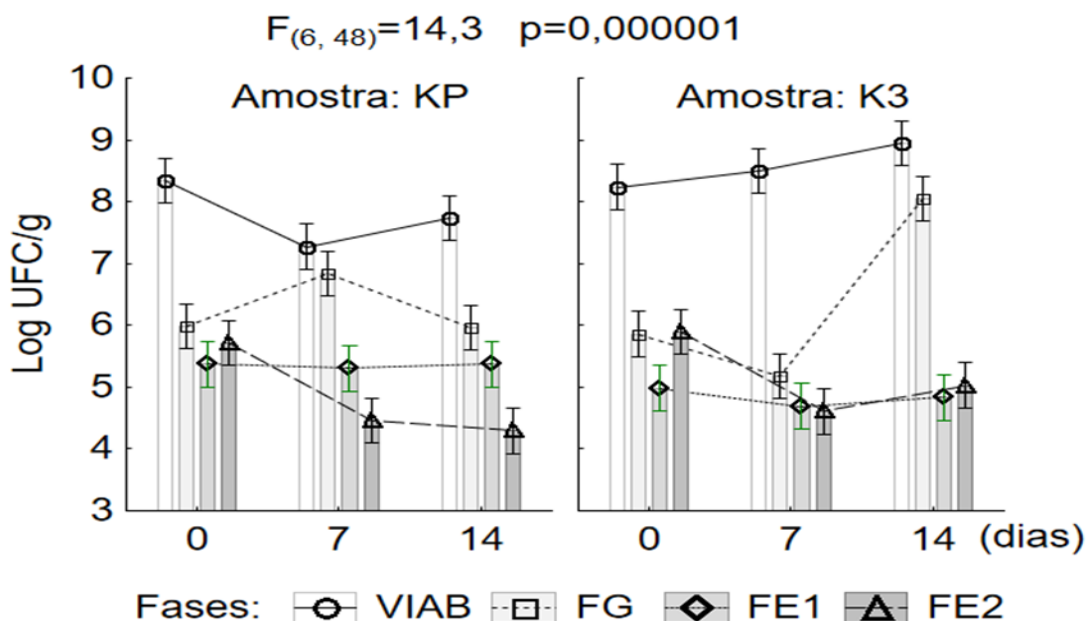


Figura 3. Sobrevivência de bactérias lácticas e leveduras presentes no kefir puro (KP) e no kefir com 3% de mel (K3) durante 14 dias de armazenamento sob refrigeração à 8°C em B.O.D. As barras brancas representam a viabilidade (VIAB.) da bebida sem ser submetida à simulação do trato gastrointestinal, seguida pelas barras que representam a fase gástrica (FG), fase entérica 1 (FE1) e fase entérica 2 (FE2).

Fernandes et al. (2017) reportaram um comportamento similar ao analisarem extrato de soja fermentado com kefir. Após a simulação das condições gastrointestinais, a bebida fermentada apresentou contagens bacterianas de aproximadamente 4,0 Log UFC.g⁻¹.

Resultado semelhante foi obtido por Bengoa et al. (2018) ao analisarem a sobrevivência de estirpes de *Lactobacillus paracasei* isolados do kefir, após simulação das condições gastrointestinais. Em todas as cinco estirpes de *L. paracasei* avaliadas, a etapa mais crítica foi a simulação gástrica, onde em todos os casos a viabilidade foi reduzida significativamente ($p < 0,05$) apresentando decréscimo de pelo menos 1,5 ciclos Log.

Estudo *in vivo* realizado por Toscano et al., (2017), acerca da capacidade de *Lactobacillus kefir* colonizar e modificar a microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, verificou que após um mês de administração de *L. kefir*, o mesmo pôde ser recuperado das fezes de todos os indivíduos participantes, com uma carga bacteriana de 10⁵-10⁶ UFC/g de fezes. Ressalta-se que a administração inicial se deu na forma de suspensão (5 gotas), a qual continha 10¹⁰ UFC, ou seja, não houve processo prévio de fermentação. Os autores observaram ainda que houve alteração nos principais filos constituintes da microbiota intestinal ao final do estudo. Após análise de todos os resultados obtidos, concluíram que *L. kefir* possui alta capacidade de colonização intestinal.

Neste estudo, observou-se que o K3 apresentou aumento na viabilidade em relação ao KP apenas na FG aos 14 dias de armazenamento. Não houve diferença significativa na viabilidade após simulação da FE II entre as amostras nos diferentes tempos, sugerindo que a adição de 3% de mel não exerceu efeito prebiótico ao kefir.

Resultado diferente foi obtido por Shamala et al. (2000), em que após estudo *in vivo*, a fim de verificar o efeito estimulador do mel sobre o crescimento das bactérias ácido lácticas, concluíram que o mel apresentou efeito prebiótico sobre as mesmas, aumentando a contagem em até 5 ciclos Log dependendo da estirpe analisada. Sob a mesma perspectiva, Fiorda et al. (2016) concluíram que o mel apresenta um bom potencial para a produção de bebidas probióticas, sendo capaz de aumentar a viabilidade de bactérias ácido lácticas. Estudo realizado por Macedo et al. (2008) sobre o efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite, verificou que o maior número de células viáveis de *L. casei*-01 e *L. casei shirota* (>9,0 Log UFC.mL⁻¹) foi observado nos cultivos contendo mel. O número de células viáveis de *L. acidophilus*, aos 46 dias de cultivo em mel foi significativamente maior que nos controles. Riazi; Ziar (2012), reportaram em seu estudo que em culturas associadas de estirpes de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus bulgaricus* a

concentração de 5% de mel teve ao mesmo tempo efeito estimulatório sobre as bifidobactérias e inibitório sobre os lactobacilos.

Likotrafiti et al. (2015) em seu estudo *in vitro*, avaliaram a resistência à condições ácidas e aos sais biliares de *Lactobacillus kefir*, isolado de grãos de kefir e verificaram que *L. kefir* B6 não foi afetado pelos sais biliares, sendo que as contagens mantiveram-se estáveis em aproximadamente de 6,4 Log UFC. mL⁻¹ por 6 h.

5.4. Avaliação da aceitação sensorial

As amostras de kefir puro e kefir com 3% de mel apresentaram a mesma aceitação sensorial ($p>0,05$) para os atributos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5 – Médias dos atributos sensoriais das amostras.

Tratamentos	Tempo (dias)	Atributos sensoriais			
		Sabor	Textura	Aroma	Impressão Global
Kefir puro	0	4,46±2.04	6,48±2.03	5,34±2.06	5,36±2.04
	7	4,16±2.17	5,70±1.92	4,66±1.97	5,04±1.91
Kefir com 3% mel	0	4,68±1.99	5,76±2.03	6,14±2.27	5,60±1.92
	7	4,62±1.75	5,94±1.85	5,44±2.12	5,68±1.63

Verificou-se baixa aceitação sensorial da bebida avaliada através da escala hedônica de 9 pontos. No presente estudo foi possível visualizar que as pontuações variaram entre 4, 5 e 6, o que na escala hedônica significa desgostei ligeiramente, indiferente e gostei ligeiramente, respectivamente. Tal fato se deu provavelmente pela acidez e pela ausência de adição de açúcar, constatado pela informação adicional de alguns julgadores. Além disso, uma possível explicação para a baixa pontuação seria o fato de não haver hábito em consumir bebidas com um sabor mais ácido e não adocicado. Resultado similar foi obtido por Puerari; Magalhães; Schwan (2012), ao analisarem a aceitação sensorial de uma nova bebida à base de cacau fermentada com grãos de kefir em diferentes condições de tempo e temperatura. Os autores constataram que a bebida foi bem aceita, exceto a bebida fermentada durante 48 e 72 h a 25 °C, devido ao sabor ácido.

Corroborando com o apresentado no presente estudo, Garcia et al. (2017) ao avaliarem a aceitabilidade de kefir sugeriram que acidez elevada e ausência de sacarose podem interferir negativamente na aceitação do produto.

Por outro lado, Viana et al. (2017) ao avaliarem a aceitação sensorial de vinagre de maçã produzido a partir da fermentação de grãos de kefir, verificaram que o produto foi bem aceito. A análise compreendeu amostras de vinagre de maçã cultivadas com 10 e 20% de kefir e amostras de vinagre de maçã comercial. Não foram identificadas diferenças significativas entre todas as amostras de vinagre.

Rocha et al. (2014), avaliaram sensorialmente “labneh” produzido com kefir. O produto teve boa aceitação considerando os atributos aparência, sabor, textura e impressão global, diferente do que foi observado no presente estudo.

Estudo conduzido por Nogueira et al. (2016), no qual avaliou-se a aceitação sensorial de bebida produzida com grãos de kefir e polpa de açaí, não encontraram diferença significativa para os atributos cor, sabor, textura, doçura e impressão global entre as amostras. Resultado semelhante pôde ser verificado no presente estudo em que as amostras foram igualmente aceitas.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados verificou-se que o mel não exerceu efeito prebiótico para os microrganismos do kefir. Uma possível explicação poderia estar relacionada às características físico-químicas do mel, como alta pressão osmótica, baixa atividade de água, baixo pH, presença de peróxido de hidrogênio, dentre outros.

Em relação à qualidade microbiológica das bebidas fermentadas, observou-se que todas estavam dentro dos padrões de qualidade exigidos pela legislação vigente, encontrando-se, portanto, seguras para consumo humano.

Para pH e acidez foi possível verificar que de acordo com o que é estabelecido pela legislação as bebidas fermentadas de kefir puro e kefir com 3% de mel no tempo zero encontravam-se dentro das determinações. No presente estudo, a diminuição do pH e acidez no decorrer do período de estocagem foi condizente com o observado por outros autores.

A viabilidade dos microrganismos de kefir em ágar MRS foi satisfatória em todas as amostras avaliadas principalmente no tempo zero, que seria o tempo ideal para consumo da bebida em se tratando de produção caseira. Aliado a isso, os resultados obtidos no ensaio *in vitro* simulando as condições gastrointestinais vêm salientar que os microrganismos presentes no kefir são capazes de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal humano, chegando em número e condições viáveis no intestino humano, fato esse que poderia viabilizar uma possível colonização intestinal. Para verificar a colonização intestinal e exercício de efeitos benéficos esperados ao hospedeiro seriam necessários outros estudos comprobatórios.

Houve baixa aceitação sensorial do produtos devido ao sabor ácido aliado à ausência de adição de açúcar, visto que, a baixa concentração de mel não foi capaz de suprir tal característica sensorial.

Por ser uma bebida de baixo custo, alto valor nutricional, probiótica (efeito relatado por outros autores) e de fácil acesso pela população, faz-se necessário outras pesquisas com kefir, especificamente sobre seu comportamento no trato digestivo humano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, W.H.; FLOWER, R.S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**.4.ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p.357-380, 2001.

ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA – Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.

BAÚ, T.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Evaluation of a Functional Soy Product with Addition of Soy Fiber and Fermented With Probiotic Kefir Culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57 n. 3: p. 402-409, 2014.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, p. 382-389, junho, 2013.

BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in symbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT – Food Science and Technology**, v. 55, p. 436-43, 2014.

BENGOA, A. A.; ZAVALA, L.; CARASI, P.; TREJO, S. A.; BRONSOMS, S.; SERRADELL, M. de los A.; GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. **Food Research International**, v. 103, p.462–467, 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, abril de 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.12, de 12 de janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, outubro de 2007.

CAMPOLINA, G. A.; FARIA, M. A. da S.; CARVALHO, N. B.; VILLANOEVAS, C. N. B. Elaboração e caracterização físico-química de antepastos funcionais utilizando kefir e semente de chia. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 3, supl. 1, p. 24–31, 2017.

CAMPOS, R. C. de A. B. **Suco de abacaxi com juçara fermentado com *Lactobacillus rhamnosus* GG: resistência da estirpe probiótica às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e efeito protetor no desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas em ratos Wistar**.2016. 107f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) –

Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Sudeste de MG, Minas Gerais, Rio Pomba, 2016.

CARVALHO, N. C. de. **Efeito do método de produção de kefir na vida de prateleira e na infecção experimental com *Salmonella Typhimurium* em camundongos**. 2011. 135f.

Dissertação (Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

CHO, Y.-J.; KIM, D.-H.; JEONG, D.; SEO, K.-H.; JEONG, H. S.; LEE, H. G.; KIM, H. Characterization of yeasts isolated from kefir as a probiotic and its synergic interaction with the wine byproduct grape seed flour/extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 535–539, 2018.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66, p. 572-581, 2016.

COSTA, M.P.; BALTHAZAR, C. F.; MOREIRA, R. V. de B. P.; CRUZ, A. G. da; CONTE JÚNIOR, C. A. Leite fermentado: potencial alimento funcional. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 1387, 2013.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. de O. B. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. 480p.

DAILIN, D.J.; ELSAYED, E. A.; OTHMAN, N. Z.; MALEK, R.; PHIN, H. S.; AZIZ, R.; W., MOHAMAD; ENSHASY, H. A. E. Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens* in semi industrial scale bioreactor. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 495–502, 2016.

DALLAS, D. C.; CITERNE, F.; TIAN, T.; SILVA, V. M.; KALANETRA, K. M.; FRESE, S. A.; ROBINSON, R. C.; MILLS, D. A.; BARILE, D. Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. **Food Chemistry**, v. 197, p. 273–284, 2016.

DERTLİ, E.; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 151-157, 2017.

DINIZ, R.O.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEENEDORF, J. M. Atividade anti-inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 19-21, 2003.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Londres, Ontário, Canadá: FAO/WHO, 2002. 11p.

FERNANDES, M. da S.; LIMA, F. S.; RODRIGUES, D.; HANDA, C.; GUELF, M.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Evaluation of the isoflavone and total phenolic contents of kefir-fermented soymilk storage and after the in vitro digestive system simulation. **Food Chemistry**, v. 229, p. 373-380, 2017.

FIORDA, F. A.; PEREIRA, G. V. de M.; SOCCOL, V. T.; MEDEIROS, A. P.; RAKSHIT, S. K.; SOCCOL, C. R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 690-697, 2016.

GARCIA, L. V.; SILVA, F. R. da.; RIBEIRO, J. de., A.; COELHO, M. D. G.; URIAS, G. M. P. C. Avaliação da Aceitabilidade de Preparações do Alimento Probiótico Kefir. **Revista Ciência Saúde**, v. 2, n. 1, p. 16-21, 2017.

GOIS, G. C.; LIMA, C. A. B. de; SILVA, L. T. da; RODRIGUES, A. E. Composição do Mel de *Apis Mellifera*: Requisitos de Qualidade. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 2, p. 137-147, 2013.

HAMET, M. F.; LONDERO, A.; MEDRANO, M.; VERCAMMEN, E.; HOORDE, K. V.; GARROTE, G. L.; HUYS, G.; VANDAMME, P.; ABRAHAM, A. G. Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. **Food Microbiology**, v. 36, p. 327-334, 2013.

JEONG, D.; KIM, D. H.; KANG, II-B.; KIM, H.; SONG, K. Y.; KIM, H. S.; SEO, K.H. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**, v. 78, p. 436-442, 2017.

KARACA, Y.; GÜN, I.; SEYDIM, A. C.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Production and quality of kefir cultured butter. **Mljekarstvo**, v. 68, n. 1, p. 64-72, 2018.

KHEDKAR, C. D.; KALYANKAR, S. D.; DEOSARKAR, S. S. Fermented Foods: Fermented Milks. **Encyclopedia of Food and Health**. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00286-5>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

KIM, D. H.; KIM, H.; JEONG, D.; KANG, II-B.; CHON, J. W.; KIM, H.S.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: Targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, fevereiro, 2017.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**.4.ed. Washington: American Public Health Association – APHA, p. 69-82, 2001.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P; ITO, K. (Ed.). **Compendium of Methods for the**

Microbiological Examination of Foods. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 387-404, 2001.

LEÃO, M. V. P.; SILVA, C. R. G. e.; SANTOS, S. S. E dos.; LEITE, P. G. C. *Lactobacillus rhamnosus* pode alterar a virulência de *Candida albicans*. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 9, p. 417-420, 2015.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C.; DEL AGUILA, E. M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S. MIGUEL, M. A.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 7, 2013.

LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V. M. F.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 6, p. 3622-3632, 2015.

LEITE, L.; GULLÓN, B.; ROCHA, J.; KÜCKELHAUS, S. Papel da microbiota na manutenção da fisiologia gastrointestinal: uma revisão da literatura. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 54-61, abr./jun., 2014.

LIKOTRAFITI, E.; VALAVANI, P.; ARGIRIOU, A.; RHOADES, J. In vitro evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. **International Dairy Journal**, v. 45, p. 23-30, 2015.

MACEDO, L.N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C.G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 935-942, 2008.

MAESTRI, B.; HERERRA, L.; SILVA, N. K.; RIBEIRO, D. H. B.; CHAVES, A. C. S. D. Avaliação do impacto da adição de inulina e de maçã em leite fermentado probiótico concentrado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 58-66, 2014.

MAGALHÃES, K.T.; DRAGONE, G.; PEREIRA, G.V. de M.; OLIVEIRA, J.M.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; SILVA, J. B. A. e.; SCHWAN, R. F. Comparative study of the biochemical changes and volatile compound formations during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, p. 249–253, 2011.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. de 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, 2011.

MARIN, M.; MADRUGA, N. de A.; RODRIGUES, R. da S.; MACHADO, M. R. G. Caracterização físico-química e sensorial de bebida probiótica de soja. **B. CEPPA**, v. 32, n. 1, 2014.

MC CANN, T. H.; FABRE, F.; DAY, L. Microstructure, rheology and storage stability of low-fat yoghurt structured by carrot cell wall particles. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 884-892, 2011.

MENEZES, A. C.; ALEXANDRINO, A.M. Análise microbiológica de hambúrgueres comercializados em embalagens primárias e secundárias. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v.9, n. 3, p. 94-100, 2014.

MERCÊS, M. D.; PERALTA, E. D.; UETANABARO, A.P. T.; LUCCHESI, A. M. Atividade antimicrobiana de méis de cinco espécies de abelhas brasileiras sem ferrão. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 672-675, abril, 2013.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: UFRV. 2013.

MONA, M.H.; RIZK, E. S. T.; SALAMA, W. M.; YOUNIS, M. L. Efficacy of probiotics, and immunostimulant on growth performance and immunological parameters of *Procambarus clarkii* juveniles. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 9, p. 17-25, 2015.

MORAES, A. C. F. de.; SILVA, I. T. da.; ALMEIDA-PITITTO, B. de.; FERREIRA, S. R. G. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 58, n. 4, p. 317-27, 2014.

MOREIRA, M. E.C.; SANTOS, M. H.; PEREIRA, I. O.; FERRAZ, V.; BARBOSA, L. C. A.; SCHNEEDORF, J. M. Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de kefir. **Química Nova**, v. 31, n. 7, 2008.

NOGUEIRA, L. K.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; KAMIMURA, E. S.; MALDONADO, R. R. Milk and açai berry pulp improve sensorial acceptability of kefir-fermented milk beverage. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 4, p. 417 – 424, 2016.

OLIVEIRA, A.L. O papel dos simbióticos na prevenção, tratamento e modulação da resposta inflamatória em pacientes com carcinoma colorretal. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 4, p. 23-31, 2009.

OLIVEIRA, D. C de.; MARTINS, E. M. F.; MARTINS, M. L.; MARTINS, G. B.; BINOTI, M. L.; CAMPOS, A. N. da R. C.; RAMOS, A. M.; SILVA, M. H. L.; STRINGHETA, P. C. Blanching effect on the bioactive compounds and on the viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG before and after in vitro simulation of the digestive system in jabuticaba juice. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 3, p. 1277-1294, maio/jun., 2017.

PAIXÃO, L. A. da.; CASTRO, F. F. dos S. A colonização da microbiota intestinal e sua influência na saúde do hospedeiro. **Universitas: Ciências da Saúde, Brasília**, v. 14, n. 1, p. 85-96, jan./jun. 2016.

PATEL, P. J.; SINGH, S. K.; PANAICH, S.; CARDOZO, L. The aging gut and the role of prebiotics, probiotics and synbiotics: A review. **Journal of Clinical Gerontology & Geriatrics**, v. 5, p. 3-6, 2014.

PEREZ, H. J.; MENEZES, M. E.; D'ACÂMPORA, A. J. Microbiota intestinal: Estado da arte. **Acta Gastroenterológica Latinoamericana**, v. 44, n. 3, p. 265-272, 2014.

PUERARI, C; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**, n. 48, p. 634–640, 2012.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. dos. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RIAZI, A.; ZIAR, H. Effect of honey and starter culture on growth, acidification, sensory properties and bifidobacteria cell counts in fermented skimmed milk. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 3, p. 486-498, 2012.

ROCHA, D. M. U. P.; MARTINS, J. de F. L.; SANTOS, T. S. S.; MOREIRA, A. V. B. Labneh with probiotic properties produced from kefir: development and sensory evaluation. **Food Science and Technology**, v. 34, n. 4, p. 694-700, 2014.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, 2006.

SANTOS, F.L.; SILVA, E.; SILVA, J.; BARBOSA, A.; SOUZA, A. C. Promoção do consumo de alimentos funcionais no recôncavo da Bahia: Estratégias de popularização do kefir. **Revista Extensão**, v. 3, n. 1, 2012.

SANTOS, I. F. C. dos; GROSSO, S. L. S.; BAMBO, O. B.; NHAMBIRRE, A. P.; CARDOSO, J. M. M.; SCHMIDT, E. M. dos S.; MARUJO, R. B. Mel e açúcar na cicatrização de feridas. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2219-2224, dezembro, 2012

SANTOS, M.R.;BASSO, C. Análise físico-química e sensorial de gelatina à base de quefir. **Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2013.

SANTOS, R.B.;BARBOSA, L.P.J. de L; BARBOSA, F.H.F. Probióticos: microrganismos funcionais. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2011.

SATIR, G.; ZEYNEP B.; GUZEL-SEYDIM. How kefir fermentation can affect product composition? **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 1–7, 2016.

SHAMALA, T. R.; SHRI JYOTHI, Y.; SAIBABA, P. Stimulatory effect of honey on multiplication of lactic acid bacteria under *in vitro* and *in vivo* conditions. **Letters in Applied Microbiology**, n. 30, p. 453-455, 2000.

SILVA, K. R.; RODRIGUES, S. A.; XAVIER FILHO, L.; LIMA, A. S. Antimicrobial activity of broth fermented with kefir grains. **Applied Biochemical and Biotechnological**, v. 152, p. 316-325, 2009.

SILVA, M. S.; RABADZHIEV, Y.; ELLER, M. R.; ILIEV, I.; IVANOVA, I.; SANTANA, W. C. S. Microorganisms in Honey. **World's largest Science,Technology & MedicineOpen Access book publisher**. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/honey-analysis>>. Acesso em: 02 mai. 2017.

SILVA, T. M. G. da; SILVA, P. R. da; CAMARA, C. A.; SILVA, G.S. da; SANTOS, F.A. R.; SILVA, T. M. S. Análises Químicas e Potencial Antioxidante do Mel de Angico Produzido pelas Abelhas Sem-Ferrão Jandaíra. **Revista Virtual de Química**, n. 6, v. 5, p.1370-1379, 2014.

TEIXEIRA, LÍlian Viana. Análise Sensorial na Indústria de Alimentos. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, n. 366, p. 12-21, Jan/Fev, 2009.

THAMER, K.G.; PENNA, AL.B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticasprobióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 03, 2005.

TOSCANO, M.; De GRANDI, R.; MINIELLO, V. L.; MATTINA, R.; DRAGO, L. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. **Digestive and Liver Disease**, n .49, p. 261–267, 2017.

USTUNOL, Z. The Effect of Honey on the Growth of Bifidobacteria. **National Honey Board**. Disponível em: <http://www.honey.com>. Acesso em: 28 mar. 2017.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: na update. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VIANA, R. O.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; BRAGA JR., R. A.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: microbiological, chemical and sensory analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 592–601, 2017.

WIDYASTUTI, Y.; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, A. The Role of Lactic Acid Bacteria in Milk Fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, n. 2, 2014.

WESCHENFELDER, S.; PEREIRA, G. M.; CARVALHO, H. H. C.; WUEST, J. M. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 2008.

8. ANEXOS

ANEXO 1 – TABELA TESTE TUKEY

Cell No.	Tukey HSD test; variable Log (<i>In vitro</i>) Homogenous Groups, alpha = ,05000 (Non-Exhaustive Search) Error: Between MS = ,09827, df = 48,000														
	Amostra	Tempo	Fase	Log Mean	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
12	KP	14	FE2	4,292400	a										
8	KP	7	FE2	4,454479	a	b									
20	K3	7	FE2	4,609602	a	b									
19	K3	7	FE1	4,689781	a	b									
23	K3	14	FE1	4,833304	a	b	c								
15	K3	0	FE1	4,986268	a	b	c	d							
24	K3	14	FE2	5,029112	a	b	c	d	e						
18	K3	7	FG	5,175809	a	b	c	d	e						
7	KP	7	FE1	5,301230		b	c	d	e						
3	KP	0	FE1	5,371293		b	c	d	e						
11	KP	14	FE1	5,371293		b	c	d	e						
4	KP	0	FE2	5,718133			c	d	e						
14	K3	0	FG	5,858574				d	e	f					
16	K3	0	FE2	5,899476				d	e	f					
10	KP	14	FG	5,958043				d	e	f					
2	KP	0	FG	5,983614					e	f					
6	KP	7	FG	6,835697						f	g				
5	KP	7	VIAB	7,270525							g	h			
9	KP	14	VIAB	7,736171							g	h	i		

22	K3	14	FG	8,052379									h	i	j
13	K3	0	VIAB	8,236423									h	i	j
1	KP	0	VIAB	8,341083										i	j
17	K3	7	VIAB	8,495347										i	j
21	K3	14	VIAB	8,943101											j

ANEXO – 2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa “Efeito prebiótico do mel na viabilidade de lactobacilos presentes no kefir após simulação in vitro das condições gastrointestinais”. Nesta pesquisa, pretendemos Verificar o potencial prebiótico do mel na viabilidade de lactobacilos presentes no kefir e avaliar a resistência dos microrganismos contidos no produto simulando condições gastrointestinais in vitro. O motivo que nos leva a pesquisar esse assunto é devido aos benefícios encontrados no kefir e no mel, portanto, há necessidade de estudos que combinem esses alimentos, além de verificar a viabilidade dos microrganismos presentes no kefir combinado com mel e a resistência destes a passagem no trato gastrointestinal, objeto de estudo desta proposta. Para esta pesquisa adotaremos o(s) seguinte(s) procedimento(s): O presente estudo será desenvolvido nos Laboratórios de Análise de Alimentos, Microbiologia de Alimentos e Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais – Campus Rio Pomba (IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba).

Kefir será obtido por doação. Após obtenção, será cultivado no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do IF Sudeste MG/Campus Rio Pomba. O substrato escolhido para o cultivo dos grãos de kefir será o leite integral UHT, e a fonte de prebiótico testada será o mel, sendo que o leite e o mel serão obtidos do comércio local. A ativação dos grãos de kefir ocorrerá da seguinte forma: Serão inoculados 5% dos grãos de kefir em leite UHT deixando-se fermentar durante 18/24 horas. Em seguida os grãos serão separados da bebida, utilizando-se uma peneira e lavados com água destilada. A bebida produzida será armazenada sob refrigeração (4 a 8°C) e os grãos que foram separados poderão ser utilizados para uma nova inoculação. Serão preparados quatro tratamentos: 1 - cultivo do kefir no leite sem adição de mel (controle); 2 – cultivo do kefir no leite com adição de 1% de mel; 3 – cultivo do kefir no leite com adição de 3% de mel; 4 – cultivo do kefir no leite com adição de 5% de mel. Será preparada uma solução de 50% p/v de mel, diluído em água destilada, que será submetida à pasteurização a 78°C/6 minutos em banho - maria para eliminação de patógenos. Análises microbiológicas serão feitas nos quatro tratamentos para verificar se atendem aos padrões de identidade e qualidade para kefir estabelecidos na legislação brasileira. Ao leite integral UHT será acrescentado o mel nas diferentes concentrações a serem avaliadas (1, 3 e 5%), em seguida os tratamentos serão homogeneizados para posterior inoculação de 5% dos grãos de kefir previamente ativados . Após as 24 horas de fermentação os grãos de kefir serão separados da bebida produzida dos quatro tratamentos utilizando-se uma peneira e lavados com água destilada. A bebida probiótica será armazenada sob refrigeração (8°C) durante 21 dias. As análises físico-químicas e microbiológicas serão realizadas nos tempos 0, 7, 14, 21. Serão realizadas as seguintes análises microbiológicas: coliformes a 30 e 45°C , estafilococos coagulase positiva, Salmonella sp e contagem de bactérias lácticas. Serão realizadas análises físico-químicas nos quatro tratamentos propostos no estudo e ainda simulação in vitro das condições gastrointestinais. Será feita a análise sensorial por meio da aplicação da escala hedônica de nove pontos a 5% de probabilidade. Serão avaliadas as amostras dos quatro tratamentos produzidos, com a finalidade de verificar qual concentração de mel apresentará maior aceitabilidade pelos provadores. Serão recrutados pelo menos oitenta julgadores não treinados. O teste de aceitação será realizado no Laboratório de Análise Sensorial do IF Sudeste MG/Campus Rio Pomba. Os julgadores serão conduzidos às

cabines individuais onde receberão amostras devidamente codificadas, copo com água para lavagem da boca (papilas gustativas) e fichas com a escala hedônica para devido preenchimento. Os julgadores deverão ser devidamente orientados acerca das condições para realização do teste e preenchimento da escala hedônica. Serão analisados os seguintes atributos: impressão global; coloração; aroma; consistência; acidez e sabor. Os dados obtidos serão submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação das médias, pelo teste de Tukey. Para participar desta pesquisa, você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, você tem assegurado o direito à indenização. Você será esclarecido (a) em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e poderá retirar seu consentimento ou interromper sua participação a qualquer momento. Sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma como é atendido (a) pelo pesquisador. Sua identidade será tratada com padrões profissionais de sigilo e não será identificado em nenhuma publicação. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em risco mínimo, isto é, o mesmo risco existente em atividades rotineiras. A pesquisa contribuirá para a avaliação da viabilidade intestinal de kefir, bem como avaliar se o produto final apresentará boa aceitação sensorial. Os resultados desta pesquisa estarão à sua disposição quando finalizada. O nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. Os dados e instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5(cinco) anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável e a outra será fornecida a você.

Eu, _____, portador(a) do documento de Identidade _____, fui informado(a) dos objetivos do presente estudo de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar. Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

_____, ____ de _____ de 20____.

Assinatura do(a) participante

Assinatura do(a) pesquisador(a)

CONTATOS DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL :

Nome:

Endereço:

CEP: / CIDADE – MG

Fone: (32)

E-mail:

Em caso de dúvidas com respeito aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar: