

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

ANDREZA TALLYNE DE AGUIAR SILVA

**CULTIVO DE KEFIR EM SORO DE LEITE E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE
CELULAR POR LIOFILIZAÇÃO**

Vitória de Santo Antão

2015

ANDREZA TALLYNE DE AGUIAR SILVA

**CULTIVO DE KEFIR EM SORO DE LEITE E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE
CELULAR POR LIOFILIZAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao colegiado do curso de graduação em Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória da Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento a requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em nutrição, sob orientação da professora Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler e co-orientação do professor Dr. Leandro Finkler.

Vitória de Santo Antão

2015

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Roseane Souza de Mendonça, CRB4-1148

S586c Silva, Andreza Tallyne de Aguiar.

Cultivo de kefir em soro de leite e avaliação da viabilidade celular por liofilização / Andreza Tallyne de Aguiar Silva. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2015.

48f. : il.; fig.

Orientador: Christine Lamenha Luna Finkler.

Coorientador: Leandro Finkler.

TCC (Graduação) – Universidade Federal de Pernambuco, CAV. Nutrição, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Nutrição. 2. Kefir. 3. Leite de búfala - Soro. 4. Liofilização. I. Finkler, Christine Lamenha Luna (Orientador). II. Finkler, Leandro (Coorientador). III. Título.

613.2 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-030/2015

ANDREZA TALLYNE DE AGUIAR SILVA

**CULTIVO DE KEFIR EM SORO DE LEITE E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE
CELULAR POR LIOFILIZAÇÃO**

TCC apresentado ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Aprovado em: 12/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr. Christine Lamenha Luna Finkler (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr. Luciana Gonçalves de Orange
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr. Idjane Santana de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus adoráveis pais,
ao meu querido irmão, e a minha amada avó.

Tudo o que tenho de maior valor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é meu guia, rege minha vida, sem Ele eu nada seria! Quantas vezes eu estive triste pensando que não iria conseguir, e seu amor por mim na cruz me lembrou que tenho um ‘Papai’ no céu que é o Deus do impossível. Toda honra e toda glória seja dada a Ele!

À minha família, minha base, meu amor maior! Principalmente à minha mãe Joseneide e meu pai Severino, que nunca mediram esforços para me ajudar ao longo dessa caminhada. Tanto financeiramente como afetivamente, sempre me incentivando a estudar. Apesar da preocupação que sentiam quando eu viajava para congressos, sempre estiveram do meu lado.

Ao meu irmão Anderson, que também sempre me deu a maior força. Às vezes, se estressava comigo porque eu ligava muito para ir me buscar ou levar na faculdade várias vezes por dia. Mas, sempre ia! E quando me via muito estressada dizia: Tenha calma que vai dar tudo certo.

À minha adorada avó Jovelina que eu tanto amo, por estar sempre ao meu lado, e nunca ter desacreditado de mim! Sempre cuidando de mim, mesmo à distância, orando por mim.

Às minhas irmãs/amigas Ellen, Izabela, Tamyris, Adriana e Huana, que tive a honra de ganhar ao decorrer desses anos. Por me aturarem e permitirem passar madrugadas e finais de semana estudando, compartilhando e aprendendo.

À Michelle Oliveira, técnica do laboratório de microbiologia dos alimentos e também uma maravilhosa amiga que tive a honra de ganhar. Lembro-me que cheguei ao laboratório pela primeira vez, e mal sabia o nome das vidrarias, quanto mais utilizar uma autoclave que morria de medo. E agradeço muito por ter tido essa oportunidade. Principalmente pelos conselhos para a vida pessoal e profissional.

Aos meus tão amados afilhados e aos meus amigos da igreja por compreenderem a minha ausência quando ficava sobrecarregada.

Às (os) minhas (eus) irmãs (os) de coração por estarem ao meu lado ao longo da minha vida. Irmãos de coração, como o próprio nome já diz são aqueles que o coração escolhe, e tenho estes desde a infância, do cursinho, na igreja. Amo muito cada um!

Ao meu cunhado David Filipe, que tive a oportunidade de conhecer no cursinho, e que desde então me incentivou e motivou com os seus conselhos, mas principalmente com sua história de vida e jeito de ser. Muito obrigado, por toda força dada ao longo desses anos.

À Gabriel Olivo, técnico do laboratório, por me ajudar no laboratório de bioprocessos. Porque, eu tinha experiência em laboratório, mas quando cheguei nesse laboratório a realidade era diferente, por exemplo, a autoclave era diferente. E ele me explicou tudo com paciência, me tirou muitas dúvidas.

À Gabriele, estagiária do laboratório, por ter me ajudado na preparação dos materiais dos experimentos.

À Creuza e Iago, por permitirem que eu e Samara tomássemos banho em sua casa, além de fazer café da manhã pra gente, quando passávamos a noite no laboratório.

À Samara, futura mestre e também uma amiga, que ganhei no decorrer desses experimentos. Muito obrigado por ter permitido que eu participasse dos experimentos e também que minha monografia fosse parte destes. Obrigado pelas dúvidas tiradas; Pelas conversas; Pelos conselhos; E pelas gargalhadas. Um momento que guardarei comigo pra sempre, principalmente no primeiro dia que fomos passar a noite no laboratório, porque se tornou nossa “casa”.

Ao professor Dr. Leandro Finkler, por sempre está incentivando a pesquisar, a desenvolver trabalhos para enviar para congressos, sugerindo novas ideias e por sempre ser criativo e inovador. Além de dar ótimos conselhos para a vida profissional.

E por último, mas não menos importante à minha orientadora, professora Dr^a Christine Finkler. Uma profissional maravilhosa, muito inteligente e sábia. Uma professora, que faz jus a sua profissão, sempre paciente e preocupada se o aluno está conseguindo entender. Antes de ter mais contato com ela, já admirava profissionalmente, e após ter sido orientada na monitoria e agora na monografia a admiro mais ainda, tanto como profissional como pessoa. Ao longo desses anos nunca a vi alterar sua voz ou tratar com indiferença a ninguém. É um exemplo de pessoa e profissional que levarei para o resto de minha vida. Não tenho palavras para agradecer tudo o que ela fez por mim. Mas, deixo o meu mais sincero agradecimento, muito obrigado professora!

E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

Apóstolo Paulo (1 Coríntios 13:2)

RESUMO

O kefir é um produto fermentado elaborado com grãos de kefir, que contém microrganismos probióticos de diferentes espécies, e que pode ser obtido a partir da fermentação do leite ou sucos de frutas. Esse estudo teve como objetivo cultivar células probióticas de kefir em soro de leite de búfala e avaliar a viabilidade celular do caldo fermentado pelo método de liofilização. O consórcio microbiano empregado como inóculo nas fermentações foi originado de um fermentado de kefir, que estava na forma liofilizada e continha uma concentração de bactérias lácticas de 1×10^3 UFC/mL. A fermentação foi realizada em triplicata e acompanhada durante 28 horas em um biorreator, onde o meio de cultivo empregado foi composto por soro de leite de búfala suplementado com solução salina e pH inicial 4,5, a 30 °C. O caldo fermentado foi liofilizado e armazenado sob duas temperaturas (ambiente – 30 °C e refrigerada – 8 °C) para verificar a viabilidade celular no decorrer de 45 dias. A cinética de crescimento celular demonstrou que a fase de crescimento exponencial ocorreu entre 4 e 22 horas de cultivo. Após este período, foi observada a fase estacionária, atingindo uma concentração máxima de bactérias viáveis de 10^7 UFC/mL, resultado que está de acordo com valores relatados na literatura para fermentados em soros de leite. Em relação ao método de liofilização para a manutenção da viabilidade celular, foi observado que não houve alteração significativa na viabilidade celular do caldo fermentado liofilizado armazenado sob refrigeração no decorrer de 45 dias, atingindo 10^8 UFC/mL. Entretanto, em relação à amostra armazenada à temperatura ambiente, houve uma diminuição na concentração de células viáveis de 10^9 para 10^8 UFC/mL a partir de 45 dias. Portanto, a melhor temperatura para conservação de células probióticas de kefir em soro de leite de búfala foi a temperatura refrigerada. Contudo, as concentrações de células viáveis probióticas obtidas ao longo do tempo de 45 dias, em ambas as temperaturas, atenderam à legislação brasileira em vigor.

Palavras-chave: Kefir. Soro de leite. Liofilização.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Grãos de Kefir cultivados no Laboratório de Bioprocessos do CAV (UFPE).....	25
Figura 2 - Cinética de crescimento celular de bactérias viáveis probióticas ao longo do cultivo empregando soro de leite de búfala como substrato (0,35 % de inóculo, 2 g/L de solução salina e 0,4 % de proteína inicial no soro de leite de búfala).....	35
Figura 3 - Concentração média de bactérias viáveis (UFC/mL) de acordo com a temperatura de armazenamento (temperatura ambiente e refrigeração) em função do tempo (0, 30 e 45 dias).....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Identificação da localização de algumas espécies de bactérias e leveduras.....	27
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAL - Bactérias lácticas

FOS - Frutooligossacarídeo

MRS - De Man, Rogosa e Sharpe

SEBRAE – Serviço de Apoio à Micro e Pequenas Empresas

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 JUSTIFICATIVA.....	17
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
4.1 Alimentos funcionais	18
4.2 Probióticos	19
4.2.1 Mecanismos de atuação dos probióticos	21
4.2.2 Utilização de probióticos na fabricação de alimentos	23
4.3 Kefir	24
4.4 Soro de leite	28
4.5 Processos fermentativos	29
4.6 Liofilização	31
5 METODOLOGIA	33
5.1 Soro de leite	33
5.2 Consórcio microbiano	33
5.3 Condições de cultivo	33
5.4 Liofilização do caldo fermentado	34
5.5 Concentração de células viáveis	34
5.6 Viabilidade celular ao longo do tempo	34
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
6.1 Cultivo de células probióticas de kefir em soro de leite de búfala	35
6.2 Viabilidade das células bacterianas probióticas por liofilização.....	37
7 CONCLUSÕES	40

REFERÊNCIAS.....41

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, vem aumentando a busca pela sociedade por hábitos de vida mais saudáveis, uma alimentação equilibrada e o consumo dos chamados alimentos funcionais. Esses alimentos, além de fornecerem as qualidades nutricionais básicas, proporcionam um benefício fisiológico adicional (OLIVEIRA, 2007). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (2008), dentre os alimentos funcionais são encontrados os probióticos, ômega-3, licopeno, luteína, zeaxantina, fibras alimentares, beta glucana, dextrina resistente, frutooligossacarídeo - FOS, inulina, proteína de soja, manitol, xilitol, sorbitol, fitoesteróis, quitosana, *Psillium*, polidextrose lactulose.

Por sua vez, os probióticos são definidos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Muitas pesquisas em termos de probióticos encontram-se voltadas para produtos como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos comercializados no mundo contendo culturas probióticas. Outros produtos comerciais que contém essas culturas incluem sobremesas à base de leite, leite em pó destinado a recém nascidos, sorvetes, sorvetes de iogurte e diversos tipos de queijo, além de produtos na fórmula de cápsulas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias (STANTON et al., 1998; GARDINER et al., 1999; INGHAM, 1999; DAVIDSON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; STANTON et al., 2003).

Um dos produtos probióticos mais conhecidos é o Kefir. Trata-se de um produto fermentado elaborado com grãos de kefir, que contém microrganismos probióticos de diferentes espécies, e que pode ser obtido a partir da fermentação do leite ou sucos de frutas.

A obtenção de probióticos em larga escala para uso na indústria de alimentos é realizada por processos fermentativos. Uma das formas de diminuir os custos de produção é o emprego de substratos agroindustriais nas formulações dos meios de cultivo, sendo que um dos substratos mais empregados é o soro de leite.

O soro de leite é obtido a partir da produção de queijos pelas indústrias de laticínios, sendo de fundamental importância o aproveitamento deste subproduto (LIRA et al., 2009), tanto na indústria de alimentos quanto na indústria biotecnológica. O soro de leite possui propriedade funcional e um elevado valor nutritivo (ANTUNES et al., 2004), podendo ser utilizado na elaboração de produtos lácteos, síntese de enzimas e nos processos fermentativos,

como na produção de probióticos. Além disso, o aproveitamento do soro leva à redução dos custos destinados ao tratamento deste efluente, minimizando a poluição ambiental.

Outro desafio para a produção industrial de probióticos é a obtenção de formulações em pó. Os produtos alimentícios em pó estão cada vez mais sendo utilizados pela indústria alimentícia, pois reduzem significativamente os custos de embalagem, transporte, armazenamento e conservação, elevando o valor agregado dos mesmos (COSTA et al., 2003). Dentre esses, destacam-se os produtos probióticos, tendo em vista que o processo de secagem garante a conservação e a viabilidade das células ao longo do tempo.

A forma em pó pode ser obtida pelo método de liofilização. Esta é considerada uma das técnicas mais eficientes para a manutenção de micro-organismos, e constitui-se num processo de secagem de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas (SOLA et al., 2012).

Neste contexto, este estudo teve como objetivo cultivar células probióticas de kefir em soro de leite e avaliar a viabilidade celular do caldo fermentado pelo método de liofilização.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Cultivar células probióticas de kefir em soro de leite e avaliar a viabilidade celular do caldo fermentado pelo método de liofilização.

2.2 Objetivos específicos:

- Cultivar células probióticas de kefir em soro de leite de búfala;
- Obter um pó liofilizado a partir do caldo fermentado;
- Avaliar o pó obtido em termos da viabilidade celular ao longo do tempo.

3 JUSTIFICATIVA

Este trabalho justifica-se pela importância do estudo do cultivo de células probióticas de kefir a partir do soro de leite de búfala. O emprego desse substrato no processo fermentativo, além de possibilitar a formulação de um meio de cultivo de baixo custo, contribui com o meio ambiente, pois propõe uma aplicação ambientalmente sustentável para esse resíduo.

Outro fator de suma importância é o uso do processo de liofilização para a obtenção de um produto probiótico em pó. O emprego desse método de secagem é vantajoso, pois permite que as células probióticas se mantenham viáveis ao longo da vida de prateleira do produto.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais foram inseridos inicialmente no Japão por volta dos anos 80. No entanto, esses alimentos foram regulamentados no ano de 1991, sendo denominados de *Foods for Specified Health Use* - FOSHU (CÂNDIDO e CAMPOS, 1995). Esse termo se referia aos alimentos processados que contivessem ingredientes que além de serem nutritivos auxiliassem funções específicas do organismo (NEWMANN et al., 2000; MORAES e COLLA, 2006).

Não existe ainda um conceito para os alimentos funcionais que seja aceito mundialmente (STRINGHETA et al., 2007). Entretanto, segundo Pacheco e Sgarbieri (1999), um alimento funcional é aquele semelhante em aparência ao alimento convencional, consumido numa alimentação normal, que seja capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos desejáveis na manutenção da saúde. Além das suas funções nutricionais, tais como fonte de energia e de substrato para a formação de células e tecidos, possui em sua composição uma ou mais substâncias capazes de agir no sentido de modular os processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de doenças crônico-degenerativas que levam a uma diminuição da longevidade.

A regulamentação dos alimentos funcionais no Brasil é feita por meio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. A regulamentação estabelece que os alimentos funcionais devem ter as suas propriedades funcionais e de saúde devidamente expressas nas propagandas e nos rótulos de produtos comercializados, de forma que o consumidor tenha a devida informação sobre o que está consumindo (MORAES e COLLA, 2006). Segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008), dentre os alimentos funcionais são encontrados os probióticos, luteína, frutooligossacarídeo - FOS, ômega-3, licopeno, zeaxantina, fibras alimentares, beta glucana, dextrina resistente, inulina, proteína de soja, manitol, xilitol, sorbitol, fitoesteróis, quitosana, *Psillium*, polidextrose e lactulose.

No Brasil não estão disponíveis os dados sobre o consumo de alimentos funcionais. Todavia, sabe-se que o consumidor norte-americano gasta cerca de 90 dólares com alimentos

e bebidas funcionais por ano, o que rendeu um mercado superior a 27 bilhões de dólares no ano de 2007. Mundialmente, o mercado de alimentos funcionais movimentou 33 bilhões de dólares e 73,5 bilhões de dólares nos anos de 2000 e 2005, respectivamente. Foi estimado que o mercado mundial após 2010 atingisse 167 bilhões de dólares (SAAD et al., 2011).

Ainda segundo SAAD et al. (2011), alertam que os possíveis benefícios a saúde dos alimentos funcionais, somado a divulgação em massa desses produtos nos meios de comunicação, levou a um aumento significativo do conhecimento do consumidor sobre os diferentes tipos de alimentos funcionais, incluindo os probióticos. Dessa forma, o mercado desses produtos continua em expansão.

4.2 Probióticos

A palavra “probiótico” significa “para a vida” e é proveniente do grego. Esse termo foi utilizado primeiramente em 1965 por Lilly e Stillwell, quando se referiam a micro-organismos que estimulavam o crescimento de outros micro-organismos (LILLY E STILLWELL, 1965).

Entretanto, no início do século XX, o biólogo russo Eli Metchnikoff já havia observado os pontos positivos desempenhados por algumas bactérias no organismo humano, tendo ganhado o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 1908 pelas suas contribuições no estudo do sistema imune. Ao mesmo tempo, o pediatra francês Henry Tissier observou que crianças com diarreia apresentavam nas fezes um baixo número de bactérias com um formato morfológico de Y, enquanto que estas eram observadas em abundância nas crianças saudáveis. A partir desta observação, o médico sugeriu que essas bactérias fossem administradas aos doentes com diarreia para ajudar a restaurar a flora intestinal saudável. Assim sendo, Metchnikoff e Tissier foram os primeiros a fazer sugestões científicas sobre o uso de bactérias probióticas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Fuller (1989) conceituou a palavra probiótico como um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o seu equilíbrio intestinal. Mas, não demorou muito para surgir uma nova definição. Havenaar e HuisIn’tVeld (1992) denominaram probióticos como culturas singulares ou mistas de micro-organismos,

que uma vez administradas em animais ou em humanos trazem efeitos benéficos ao hospedeiro, como por exemplo, a melhora da flora intestinal.

Atualmente, a definição mais aceita é que probióticos são micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidade adequada, conferem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; COPPOLA e GIL TURNES, 2004; GUARNER e SCHAAFSMA, 1998; SANDERS, 2003).

Dentre os critérios para a seleção de micro-organismos probióticos, destacam-se: não serem patogênicos; devem ser de origem humana; devem apresentar tolerância ao trato gastrointestinal; devem ter a habilidade de sobreviver aos processos tecnológicos; ter capacidade de produzir substâncias antimicrobianas; devem permanecer viáveis durante a vida útil do produto e terem os benefícios à saúde comprovados (MORAES e COLLA, 2006; FULLER, 1989; HAVENAAR e HUIS IN'T VELD, 1992; OLIVEIRA et al., 2002).

De acordo com a ANVISA (2008), a recomendação brasileira atual para alimentos probióticos é de no mínimo 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) /dia. Essa recomendação é baseada na porção de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos diariamente para que ocorram os efeitos funcionais. A ANVISA ainda deixa claro que valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

As principais representantes dos probióticos em alimentos são as bactérias ácido-láticas. Estas, por sua vez, são gram-positivas, geralmente não móveis, não formam esporos, são catalase negativas e produzem ácido lático como maior ou único produto do metabolismo fermentativo (POFFO e SILVA, 2011).

Dentre os microrganismos probióticos destacam-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Esses gêneros são os mais empregados pelo fato de terem sido isolados de todas as porções do trato gastrintestinal do indivíduo saudável (SAAD, 2006; OLIVEIRA et al., 2002).

4.2.1 Mecanismos de atuação dos probióticos

Há três possíveis mecanismos de atuação dos probióticos (FULLER, 1989; COPPOLA e GIL TURNES, 2004; SAAD, 2006; BADARÓ et al., 2008; CORCIONIVOSCHI, 2010):

1. Produção de substâncias com atividade antimicrobiana, como por exemplo, as bacteriocinas. No entanto, os probióticos também podem agir competindo por nutrientes e por sítios de adesão;
2. Modificação do metabolismo microbiano por meio do aumento ou da diminuição da atividade enzimática;
3. Estímulo da imunidade do hospedeiro pelo aumento dos níveis de anticorpos e da atividade dos macrófagos. O espectro de atividade dos probióticos pode ser dividido em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos.

Sabe-se ainda que a ingestão de probióticos induz alguns efeitos benéficos aos consumidores, a seguir são citados alguns destes benefícios.

- Aumento da biodisponibilidade de nutrientes e alteração no metabolismo

Isso ocorre pelo fato de haver um aumento ou diminuição da atividade enzimática. Uma função característica das bactérias lácticas na microbiota do intestino é produzir a β -D-galactosidase, uma enzima que auxilia na quebra da lactose, uma ação de fundamental importância para os indivíduos que são incapazes de digerir a lactose adequadamente, isto é, os intolerantes a lactose. Assim sendo, o consumo de cepas de bactérias lácticas em quantidade adequada pode aliviar os sintomas dos intolerantes a lactose. Este fato pode levar a reinclusão de alimentos lácteos na dieta, e consequentemente dos nutrientes importantes que não podiam ser inclusos na dieta do intolerante. Além disso, produtos lácteos fermentados por bactérias lácticas podem induzir ao aumento da concentração de alguns nutrientes, tais como vitaminas do complexo B (KOPP-HOOLIHAN, 2001; SAAD et al., 2011; SAAD, 2006).

Vale ressaltar que além do ácido láctico, as bactérias lácticas podem produzir ácidos graxos de cadeia curta, como o butírico e propiônico. Esses, uma vez absorvidos, contribuem para um aumento na energia disponível do hospedeiro e os protege contra mudanças patológicas na mucosa do intestino. Um aumento nos níveis desses ácidos graxos de cadeia curta mantém o pH específico para muitas enzimas bacterianas que atuam sobre compostos estranhos e no metabolismo de carcinógenos, neutralizando a ação de certos carcinógenos da

dieta, como por exemplo, as nitrosaminas. Essas são provenientes do metabolismo de bactérias comensais em pessoas que consomem dietas hiperproteicas (KOPP-HOOLIHAN, 2001; SAAD, 2006; WOLLOWSKI et al., 2001; SAAD et al., 2011).

- Regulação da microbiota intestinal

A utilização de bactérias probióticas resulta na eliminação de patógenos e reforça os mecanismos de defesa do organismo, já que probióticos eficazes tem como característica um aumento da resistência contra micro-organismos patógenos. As bactérias probióticas agem competindo com os patógenos por nutrientes disponíveis e por sítios de adesão, além de produzirem substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis e peróxido de hidrogênio (KAUR et al. 2002; GUARNER e MALAGELADA, 2003; KOPP-HOOLIHAN, 2001; SAAD, 2011; BADARÓ et al., 2008; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

É do conhecimento de todos que um desequilíbrio da microbiota intestinal pode causar consequências ao organismo, tais como doenças inflamatórias intestinais (como a doença de Chron, síndrome do intestino irritável), alergia alimentar e diarreia, que geralmente está associada a infecções ou a antibioticoterapia. Todavia, há vários estudos que mostram que a ingestão na quantidade adequada de probióticos induz efeitos benéficos a essas alterações (SAAD et al., 2011; BADARÓ et al., 2008; ISOLAURI et al., 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2008).

- Benefícios em reações alérgicas

Acredita-se que estes efeitos ocorram por conta da função dos probióticos de formarem barreiras da mucosa. Outro mecanismo relatado é o fato de que algumas bactérias probióticas têm capacidade de induzir à quebra de proteínas de caráter alergênico no trato gastrointestinal, podendo assim colaborar para a redução do processo alérgico (MORAIS e JACOB, 2006; SAAD et al. 2011; BADARÓ et al., 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, 2008).

- Melhora do sistema imune do hospedeiro

Há alguns anos vem sendo estudados os possíveis benefícios que os probióticos induzem no sistema imunológico. Algumas bactérias ácido lácticas podem aumentar a resposta imune, tanto a inata como a adquirida. Acredita-se que isso ocorra devido à mediação

da ativação dos macrófagos e por um aumento nos níveis de citocinas e da atividade das células *natural killer* (células destruidoras naturais) e/ou dos níveis de imunoglobulinas (ABBAS e LICHTMAN, 2009; SAAD, 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

- Alterações nos níveis sanguíneos de lipídios

Ocorre devido às bactérias lácticas fermentarem os carboidratos não digeríveis presentes no intestino, tendo como resultado da fermentação os ácidos graxos de cadeia curta. Acredita-se que esses ácidos causem uma diminuição das concentrações sistêmicas de lipídios no sangue por meio da inibição da síntese de colesterol hepático e/ou da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado. No entanto, há poucos estudos e outras hipóteses têm sido levantadas (SAAD et al., 2011).

- Benefícios na saúde urogenital feminina

É de conhecimento geral que no trato urogenital podem ser encontrados tanto micro-organismos benéficos como patógenos, sendo que esses micro-organismos geralmente entram pelo cólon e reto. Assim sendo, bactérias probióticas presentes no cólon podem modificar favoravelmente a microbiota de bactérias patogênicas, formando uma barreira e minimizando a colonização de patógenos na bexiga, evitando assim o processo infeccioso. Há estudos que relatam que a presença de probióticos no trato urogenital pode ser benéfica devido à produção de enzimas que degradam a arginina, uma vez que esta é uma importante fonte de nitrogênio para os patógenos presentes na vagina. Entretanto, mais estudos são necessários para evidenciar esses efeitos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS e WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; SAAD et al. 2011).

4.2.2 Utilização de probióticos na fabricação de alimentos

Para as bactérias probióticas terem uma viabilidade adequada e uma boa funcionalidade após serem aplicadas na fabricação de produtos fermentados, elas devem ser empregadas com base no desenvolvimento tecnológico dos produtos. Devem apresentar uma boa multiplicação no leite; serem estáveis e viáveis no produto durante a vida de prateleira e

devem desenvolver boas características sensoriais. Além desses critérios para o uso de probióticos em produtos, é importante serem resistentes aos processos de liofilização ou de *spray drying* para os casos de produtos na forma de pós. Ressalta-se que a sobrevivência dessas bactérias em produtos fermentados pode ser afetada por alguns fatores, como: espécie probiótica utilizada; composição química do meio de fermentação; disponibilidade de nutrientes; concentração de açúcares; temperatura de incubação; tempo de fermentação; temperatura de estocagem e permeabilidade da embalagem ao oxigênio (SAAD, 2006, STANTON et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002; BADARÓ et al., 2008; PIMENTEL, 2009; KOMATSU et al., 2008).

De acordo com Komatsu et al. (2008), uma boa alternativa para aumentar a multiplicação de um micro-organismo probiótico é adicionar outra espécie probiótica em co-cultura. Entretanto, deve-se verificar a compatibilidade entre as culturas a serem empregadas.

Apesar da maioria das pesquisas estarem voltadas para a utilização de probióticos em leites e iogurtes, mesmo esses produtos podem não favorecer a manutenção das cepas probióticas. Há evidências que outros alimentos oferecem melhores condições para a administração dessas cepas, como o leite de soja fermentado, produtos nutritivos em pó, sorvetes de iogurte e queijos, incluindo os tipos Cheddar, Gouda, Cottage e queijo fresco (OLIVEIRA et al. 2002). Alguns produtos probióticos encontrados no mercado brasileiro são o leite fermentado aromatizado ou não, iogurte, suplemento alimentar, suspensão oral e comprimidos (OLIVEIRA et al. 2002). Outro produto também disponível no mercado é o kefir, uma bebida fermentada obtida principalmente a partir do leite e que contém microrganismos probióticos (KOMATSU et al., 2008).

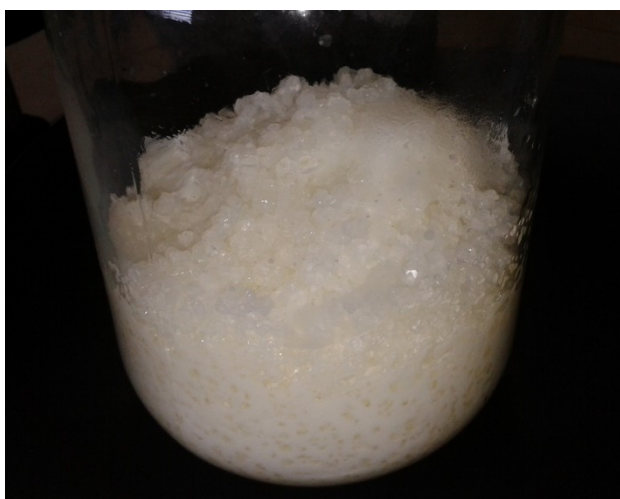
4.3 Kefir

A palavra Kefir é proveniente da palavra turca *Keif*, cujo significado é "bem-estar" ou "bem-viver". Kefir é uma colônia de micro-organismos simbióticos originária das montanhas Caucasianas da Rússia e que é capaz de fermentar diversos substratos – sendo o leite (caprino ou bovino), historicamente, o mais comum deles. Apresenta efeitos probióticos e, sendo assim, pode-se dizer que traz alguns benefícios à saúde (MOREIRA et al., 2008; ZUBILLAGA et al., 2001).

Os grãos de kefir são caracterizados como sendo gelatinosos, de formato irregular, podendo ser amarelados ou esbranquiçados e medem em torno de 0,2 a 3 cm de tamanho. São ainda ditos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos (composta por unidades de D-glucose e D-galactose) conhecida como kefirano. Acredita-se que esta, por sua vez, é produzida principalmente por bactérias da espécie *L. kefiranofaciens* (DINIZ et al., 2003; WESCHENFELDER et al., 2011; POGAČIĆ et al., 2013).

A Figura 1 mostra o aspecto de grãos de Kefir cultivados no Laboratório de Bioprocessos do CAV (UFPE).

Figura 1. Grãos de Kefir cultivados no Laboratório de Bioprocessos do CAV (UFPE)



Fonte: “A autora”

De acordo com Pogačić et al. (2013), os grãos de Kefir possuem uma comunidade microbiológica com mais de cinquenta espécies diferentes de bactérias e leveduras, podendo ser encontrados em torno de 10^9 UFC de bactérias lácticas e 10^4 - 10^5 UFC de leveduras e bactérias ácido acéticas. A quantidade de micro-organismos presentes nos grãos de Kefir depende da origem e do método de cultivo. Esses autores citam também que os grãos de Kefir inoculados em leite aumentam sua massa em cerca de 25 % após a fermentação, isso devido ao aumento de micro-organismos e à produção de kefirano.

Os grãos de Kefir podem ser reutilizados várias vezes para fermentação, contanto que seja feita sua reativação. Esta ocorre através da inoculação dos grãos no leite pasteurizado ou

reconstituído e incubação por 24 horas (POGAČIĆ et al., 2013; BORZANI, 2001). Ressalva-se que os grãos de Kefir, além de fermentarem leite, podem também ser cultivados em outros alimentos, tais como “leite de soja”, refrescos de frutas, leite de cabra e açúcar mascavo (OLIVEIRA, 2005). No Brasil, acredita-se que os grãos de Kefir são doados de pessoa a pessoa (LEITE et al., 2013).

A legislação brasileira refere-se à kefir como um produto fermentado no leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação realiza-se com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de Kefir, contendo *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. A legislação cita ainda que os grãos de Kefir sejam constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsphtherophilus* (BRASIL, 2002).

O produto kefir também é conhecido como quefir, kephir, kefer e kephyr. Trata-se de um fermentado lácteo diferente dos demais, isso pelo fato de ser fermentado duplamente (fermentação láctica e etílica) a partir de várias espécies de bactérias e leveduras em simbiose. Caracteriza-se por ser uma bebida viscosa, ácida e possui baixo teor alcoólico. Essas características são resultantes dos principais metabólitos das fermentações: o ácido láctico, etanol e CO₂ (POGAČIĆ et al., 2013; LEITE et al., 2013).

Montanuci et al. (2010) cita que o consumo de kefir pode trazer alguns benefícios à saúde, como: Melhoria da digestão, uma vez que é capaz de promover a multiplicação de bactérias probióticas no intestino humano; Estimulação do sistema imunológico; Propriedades antitumorais, antibacterianas e antifúngicas.

No quadro 1 é possível verificar algumas espécies de bactérias e leveduras que são encontradas no kefir e nos grãos de Kefir.

Vale ressaltar que a quantidade de micro-organismos presentes nos grãos de Kefir difere do número de micro-organismos presentes no kefir, uma vez que fatores relacionados à fermentação, tais como tempo, pH, temperatura, grau de agitação e distribuição de micro-organismos influenciam a concentração de micro-organismos presentes no meio fermentado (LEITE et al., 2013).

Quadro 1. Identificação da localização de algumas espécies de bactérias e leveduras.

Micro-organismos e local onde são encontrados	Espécies de micro-organismos	Característica
Bactérias encontradas no kefir – bebida	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i> e <i>L. acidophilus</i> ; <i>Lactococcus</i> spp.	Bactérias ácido-láticas homofermentativas
Bactérias encontradas tanto nos grãos de Kefir quanto na bebida fermentada kefir	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lacti</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremorise</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Bactérias ácido-láticas homofermentativas
	<i>Lactobacillus kefiri</i> , <i>L. parakefiri</i> , <i>L. fermentum</i> e <i>L. brevis</i>	Bactérias ácido-láticas heterofermentativas
Leveduras encontradas tanto nos grãos de Kefir quanto na bebida fermentada kefir	<i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Candidakefyr</i> , <i>Kluyveromyces slactis</i> var. <i>lactis</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> e <i>Dekkera anomala</i>	Leveduras que fermentam lactose
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Kazachstania unispora</i> , <i>Saccharomyces turicensis</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> e <i>Debaryomyces occidentalis</i>	Leveduras não fermentadoras de lactose

Fonte: LEITE et al. (2013)

4.4 Soro de leite

Entende-se como soro de leite o subproduto resultante da produção de queijo, no qual a caseína é coagulada. Isso pode acontecer por duas maneiras: pela ação de uma enzima, denominada renina, onde o subproduto é o chamado soro doce; ou ocorre pela diminuição do pH (precipitação ácida) resultando no chamado soro ácido (PELEGRINE e CARRASQUEIRA, 2008).

Ambos os soros diferem na composição, uma vez que o soro doce possui mais lactose que o soro ácido. Em contrapartida, o soro ácido tem mais cálcio e fósforo, pois com o pH baixo há solubilização do complexo fosfato de cálcio existente nas micelas de caseína. A quantidade de proteína de ambos os soros não difere, sendo que o soro de leite é rico em aminoácidos essenciais, o que torna suas proteínas consideradas de alto valor biológico. Suas principais proteínas são a β -lactoglobulina e α -lactoalbumina (ALVES et al., 2014).

Segundo um estudo de mercado do Serviços de apoio à micro e pequenas empresas - SEBRAE (2008), vem aumentando no Brasil a produção de queijo. Acredita-se que a produção formal de queijos em 2006 foi de 572 mil toneladas, tendo crescido 5,2% quando comparada a 2005. Ressalva-se que o mercado informal produziu em torno de 380 mil toneladas, no mesmo ano, o que quantificou o mercado total em 952 mil toneladas/ano. De acordo com Alves et. al. (2014), o soro de leite representa cerca de 80 a 90% do volume do leite utilizado na produção de queijos, e contém em torno de 55% dos nutrientes presentes no leite.

A produção de leite de búfala está ganhando destaque em alguns países da Ásia, como China e Índia, e também na Itália. No Brasil, tanto a produção de leite como os seus derivados vem ganhando importância, principalmente em pequenas e médias empresas. Isso devido ao fato do leite de búfala possuir um alto valor nutricional e ter um melhor rendimento na produção quando comparado ao leite de vaca (RICCI e DOMINGUES, 2012; TEIXEIRA, 2005).

O leite de búfala é mais produtivo em cerca de 40 a 50 % na fabricação de queijo que o leite de vaca, pois possui um maior teor de gordura. Além disso, o leite de búfala também tem mais proteína, menos colesterol e menos água quando comparado ao leite de vaca (TEIXEIRA, 2005).

As características físico-químicas da composição do leite de búfala variam conforme alguns fatores, como período de lactação, a raça e a alimentação. Entretanto, são encontrados diversos nutrientes essenciais para a dieta humana, e sua microbiota natural o torna um excelente meio para o crescimento de microrganismos (RICCI e DOMINGUES, 2012).

Durante muito tempo o soro de leite era destinado ou à alimentação animal ou era descartado no ambiente, gerando poluição ambiental devido à sua elevada demanda bioquímica de oxigênio. Dessa forma, tornou-se obrigatório o tratamento deste efluente. No entanto, considerando que os custos do tratamento deste resíduo são considerados elevados, as empresas passaram a aproveitá-lo devido ao seu alto valor nutricional (SERVIÇO DE APOIO À MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2008; ALVES et al., 2014).

No Brasil, as bebidas lácteas são os principais produtos que são obtidos industrialmente como forma de aproveitamento do soro. Outros produtos também são fabricados com o soro, como a ricota, bebidas nutricionais fortificadas e concentrados protéicos (CAPITANI et al., 2005; LIRA et al., 2009).

Outra forma de aproveitamento do soro e que vem sendo utilizada pelas empresas é a obtenção do soro de leite seco, o que facilita o seu armazenamento e transporte, além de poder ser usado na elaboração de produtos farmacêuticos e de alimentos industrializados devido às suas propriedades nutricionais (SERVIÇO DE APOIO À MICRO E PEQUENAS EMPRESAS, 2008).

4.5 Processos fermentativos

Para a obtenção de um bom processo fermentativo, deve-se levar em consideração o micro-organismo, o meio de cultura, a forma de condução do processo fermentativo e as etapas de recuperação do produto. O micro-organismo para ser utilizado no processo fermentativo industrial deve apresentar as seguintes características: não exigir meios de cultura que tenham um alto custo, não deve ser patogênico, ter elevada eficiência na conversão do substrato em produto e ter comportamento fisiológico constante. Já em relação ao meio de cultura, este não deve ser caro e deve suprir as necessidades nutricionais do micro-organismo (SCHMIDELL et al., 2001).

Sabe-se que cerca de 50 % da massa seca das células é composta por carbono. Este, por sua vez, é necessário para a biossíntese de diversos constituintes celulares, como carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Outro constituinte essencial para a célula é o nitrogênio, já que este é indispensável à formação de aminoácidos e ácidos nucleicos. Além desses dois elementos, as células necessitam em menor quantidade de minerais, pois são importantes para constituição de enzimas e coenzimas, e também, para suas funções estruturais e fisiológicas. Dessa forma, um meio de cultivo que atenda às exigências nutricionais resulta em uma maior capacidade das células vivas de responderem aos estímulos externos; consequentemente, isso gera uma maior produtividade (PEREIRA JÚNIOR, et al. 2008).

De acordo com Schmidell et al. (2001), a glicose, a sacarose, a frutose, o amido e a celulose são exemplos de fontes de carbono que os micro-organismos podem utilizar. Como fontes de nitrogênio podem ser citadas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, aminoácidos e ureia.

O crescimento celular durante um período de tempo é demonstrado em uma curva de crescimento (TORTORA et al., 2005). Esta, por sua vez, é obtida quando se realiza a contagem da população em intervalos de tempo após a inoculação de um número pequeno de células no meio de cultivo. Basicamente, existem quatro fases de crescimento:

1. Fase Lag – Período em que ocorre pouca ou ausência de divisão celular. Nesta fase a população passa por uma intensa atividade metabólica, principalmente síntese de enzimas e de outras moléculas.
2. Fase Log – Inicia-se a partir de determinado momento onde as células começam sua divisão, entrando num período de crescimento ou aumento logarítmico. É nesta fase que a reprodução celular encontra-se extremamente ativa, e o tempo de geração atinge um valor constante.
3. Fase Estacionária – Esta acontece quando a velocidade de crescimento diminui, e o número de células que morrem é equivalente ao número de células novas, e a população fica estável.
4. Fase de Declínio – Acontece em determinado momento que a quantidade células mortas excede a quantidade de células novas.

Entende-se como cinética de um processo fermentativo a análise da evolução dos valores de concentrações de um ou mais componentes (o micro-organismo, os produtos do

metabolismo e os nutrientes do meio de cultivo) do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação (HISS, 2001).

4.6 Liofilização

A liofilização é considerada uma das técnicas mais eficientes na preservação e manutenção de micro-organismos, constituindo-se num método de preservação a longo prazo e que pode ser aplicável à maioria dos micro-organismos (SOLA et al., 2012)

Esta técnica consiste na retirada da água intracelular do material biológico congelado por sublimação. Dessa forma, a liofilização evita a formação de cristais de gelo, sendo estes capazes de provocar danos às estruturas celulares, como permeabilidade da membrana celular, além da degradação de enzimas presentes no citosol (MORGAN et al., 2006).

Define-se liofilização como um processo de desidratação sob condições de vácuo, constituído por três etapas: congelamento, desidratação primária e desidratação secundária. Na primeira etapa ocorre a inércia do material a ser liofilizado, causando interrupção das reações químicas e atividades biológicas, sendo assim uma das fases mais críticas do processo. Depois do congelamento, a amostra biológica é desidratada por meio de sublimação, seguindo-se de dessorção (COSTA et al., 2009).

O congelamento de alimentos sólidos é realizado rapidamente, para que os cristais de gelo formados sejam pequenos, reduzindo possíveis danos à estrutura das células. Já nos alimentos líquidos utiliza-se o congelamento lento, visando à formação de uma rede de cristais de gelo composta por canais para o movimento do vapor da água (FELLOWS, 2006).

A desidratação primária ocorre por sublimação, onde a água (no estado sólido) contida na amostra congelada é aquecida e convertida diretamente para vapor (cerca de 90% da água é evaporada do produto). A desidratação secundária ocorre por dessorção, ou seja, pela evaporação da água que restou no produto (que está no estado líquido). Isso ocorre devido à temperatura elevada no secador (aproximadamente à temperatura ambiente) e a baixa pressão (FELLOWS, 2006).

Apesar da liofilização ser considerada uma boa técnica para a conservação de micro-organismos, possíveis danos (denominados de lioinjúrias) podem ocorrer durante as etapas do

processo, principalmente na etapa de congelamento. Um dos principais danos é a permeabilidade da membrana, o que leva ao aumento da sensibilidade a alguns agentes seletivos, aumento da fase lag de multiplicação celular e a necessidade de incremento nutricional (LIMA, 2011).

Para minimizar esses efeitos, podem ser utilizadas substâncias para proteger as células dos danos causados pelas etapas da liofilização. Essas substâncias são denominadas crioprotetores, que por sua vez, podem agir por meio da permeabilidade celular ou não, e também podem ser semipermeáveis (LIMA, 2011; SOLA et al., 2012). O mecanismo de proteção é específico de cada substância e depende também do tipo de micro-organismo a ser liofilizado. Substâncias como leite desnatado, soro, trealose, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose e polímeros como dextrana e polietilenoglicol podem proteger diversas espécies (COSTA, 2009).

É importante destacar que alguns fatores podem influenciar a vida de prateleira de produtos liofilizados, como o oxigênio, luz, contaminação microbiana, umidade e temperaturas elevadas. Considerando esses fatores, normalmente os liofilizados são armazenados em frascos de vidro ou ampolas (COSTA, 2009).

Em relação à sobrevivência de bactérias após o processo de liofilização, COSTA (2009) cita que bactérias Gram-positivas apresentam maior taxa de sobrevivência que as bactérias Gram-negativas. O autor sugere que as primeiras apresentam uma maior resistência ao processo de dessecação, que pode estar relacionada com a estrutura celular.

As seguintes vantagens do processo de liofilização podem ser citadas: Conservação de várias espécies microbiológicas com boa viabilidade; Baixa taxa de mutação e contaminação; Os microrganismos podem ser transportados em temperatura ambiente; A técnica não precisa ser monitorada e ocupa pouco espaço no armazenamento. No entanto, é uma técnica considerada cara, além de necessitar de otimização de protocolos específicos para cada tipo de célula e espécie microbiana (COSTA, 2009; SOLA et al., 2012).

5 METODOLOGIA

5.1 Soro de leite

O soro de leite de búfala foi cedido pela empresa FACCO situada no município de Ribeirão (PE, Brasil). O soro foi armazenado em câmara fria a 2°C para posterior utilização nas fermentações.

5.2 Consórcio microbiano

Foi empregado como inóculo nas fermentações um consórcio microbiano originado de um fermentado de kefir. Este consórcio apresentava-se na forma liofilizada e continha uma concentração de bactérias lácticas de 1×10^3 UFC/mL de suspensão liofilizada em 3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v).

5.3 Condições de cultivo

Primeiramente o soro de leite de búfala foi pasteurizado a 65 °C por 30 minutos para eliminar possíveis micro-organismos indesejáveis. A fermentação foi realizada em triplicata e acompanhada durante 28 horas em um biorreator (Tecnal, modelo Tec-bio-plus) com capacidade nominal de 1,8 L. Foi empregado um volume de meio de cultivo equivalente a 2/3 da sua capacidade, perfazendo um total de 1,2 L. O meio de cultivo empregado nos cultivos foi composto por soro de leite de búfala suplementado com solução salina e pH inicial 4,5 (ajustado com ácido láctico).

O biorreator foi operado em batelada, em condição estacionária, sendo dotado de controle de temperatura. O cultivo foi conduzido a 30 °C. Foram retiradas amostras para a análise do crescimento bacteriano em intervalos de tempo regulares.

5.4 Liofilização do caldo fermentado

O caldo fermentado foi liofilizado da seguinte maneira: O meio de liofilização utilizado foi composto por 10 % de sacarose e 1 % de gelatina. Adicionou-se 3 mL da suspensão (caldo fermentado + meio de liofilização) em tubos de penicilina. Esses tubos foram congelados por 12 horas em freezer a - 80 °C. Por fim, os frascos foram colocados no liofilizador por 24 horas, a -50 °C, com vácuo a 1720 mT. Para a contagem de bactérias para determinação da viabilidade celular ao longo do tempo, o material liofilizado foi resuspenso com 3 mL de solução estéril (NaCl 0,85 % p/v).

5.5 Concentração de células viáveis

A determinação da concentração de células viáveis foi realizada a partir de diluições decimais seriadas das amostras (caldo fermentado e células liofilizadas) em tubos de ensaio contendo solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v). Um volume de 200 µL das amostras foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar suplementado com 2% (p/v) de glicose pelo método *pourplate*. As placas foram incubadas em estufa BOD por 72 horas a 35 °C. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL.

5.6 Viabilidade celular ao longo do tempo

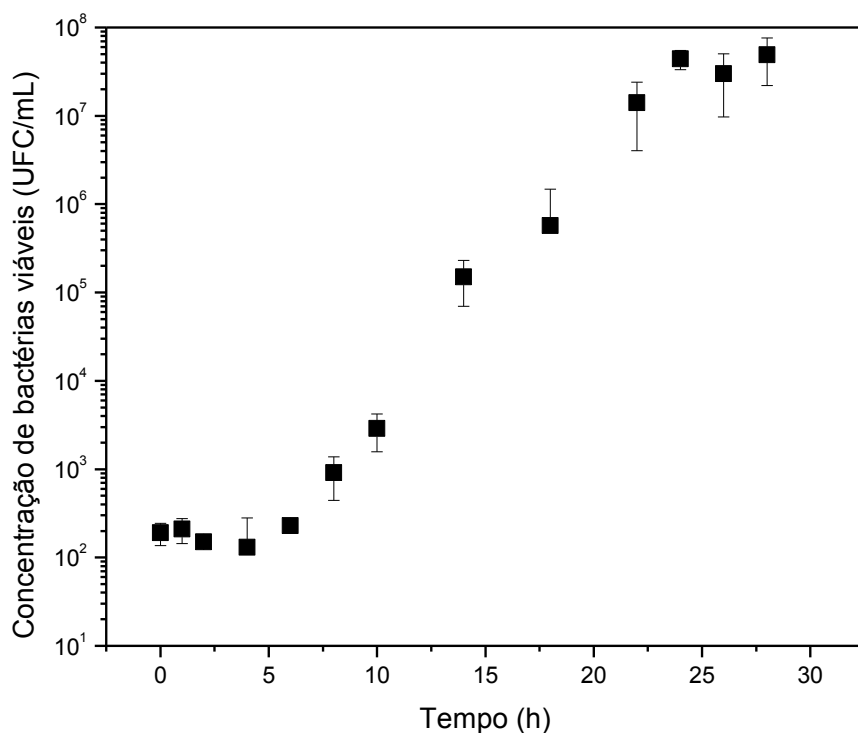
A viabilidade das células probióticas liofilizadas foi avaliada ao longo de 45 dias de armazenamento sob duas condições de temperatura: refrigeração a 8°C e a temperatura ambiente (± 30 °C). Os experimentos foram realizados em triplicata.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Cultivo de células probióticas de kefir em soro de leite de búfala

Durante o processo fermentativo foi observado o comportamento cinético do crescimento das bactérias viáveis probióticas ao longo do cultivo empregando soro de leite de búfala como substrato. A cinética foi realizada em triplicata e pode ser observada na Figura 2.

Figura 2. Cinética de crescimento celular de bactérias viáveis probióticas ao longo do cultivo empregando soro de leite de búfala como substrato.



A fase Lag foi observada nas quatro primeiras horas de cultivo, de forma que as células estão se adaptando ao meio. Verifica-se nessa fase pouca ou nenhuma divisão celular, o que pode estar relacionado com a idade do micro-organismo, com a concentração do inóculo ou ainda com seu estado fisiológico (SCHMIDELL et al., 2001).

A fase exponencial ou fase Log foi observada entre 4 e 22 horas de cultivo, com crescimento celular variando exponencialmente de 10^2 a 10^7 UFC/mL. Isso se deve por ser o período de maior atividade metabólica das células. A partir de 24 horas é observada a fase estacionária, pelo fato da população bacteriana permanecer estável. Alguns fatores, como mudanças no pH e o término de nutrientes, podem influenciar essa fase (TORTORA et al., 2005).

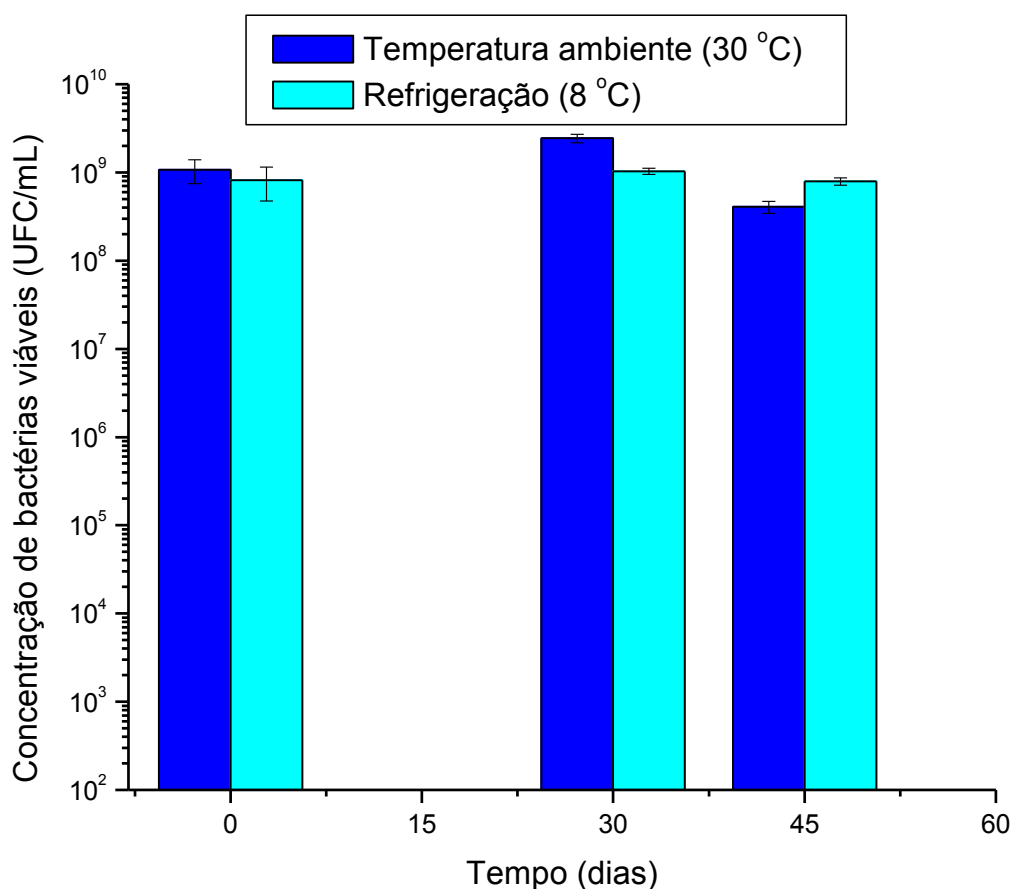
Kempka et al., (2008) fizeram um estudo sobre formulação de bebida láctea fermentada sabor pêssego, com o objetivo de otimizar o crescimento da cultura mista de *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, visando obter as melhores condições de operação para a referida cultura utilizando substratos alternativos. Os autores verificaram que a temperatura e a agitação foram os fatores que mais afetaram o crescimento celular, sendo que a temperatura apresentou um efeito positivo e a agitação um efeito negativo, obtendo-se a máxima produção de células em caldo MRS e após 4 horas de incubação a 42 °C e sem agitação. No entanto, no presente trabalho o pico máximo de crescimento de células probióticas foi obtido após 22 horas de cultivo a uma temperatura de 30 °C. Uma vez que, segundo a literatura a temperatura de cultivo influencia no crescimento de células probióticas.

Baptista (2010) realizou um trabalho comparando a viabilidade celular de soro fermentado com grãos de kefir e com uma cultura liofilizada, nos quais os possíveis microrganismos encontrados nessa cultura são: *Lactococcus lactis ssp. lactis*; *Lactococcus lactis spp. lactis* biovar *diacetylactis*; *Lactobacillus brevis*; *Leuconostoc* e *Saccharomyces cerevisiae*. Observou-se que as bactérias lácticas da cultura liofilizada tiveram um crescimento melhor no soro de leite (10^8 UFC/mL) do que as bactérias dos grãos de kefir (10^7 UFC/mL). O autor cita ainda que estes resultados estão de acordo, uma vez que o kefir quando fermentado em leite apresenta contagem total variando em torno de $10^7 - 10^9$ UFC/mL, enquanto que quando fermentado em soro de leite apresenta cerca de $10^6 - 10^8$ UFC/mL. Isso é devido ao leite integral apresentar mais nutrientes necessários para o crescimento bacteriano. Dessa forma, como o pico máximo de crescimento na cinética desenvolvida no presente trabalho foi de 10^7 UFC/mL, pode-se dizer que foi um bom resultado, já que este está de acordo com a literatura.

6.2 Viabilidade das células bacterianas probióticas por liofilização

Na Figura 3 pode-se verificar a concentração média de bactérias lácticas viáveis (UFC/mL) de acordo com a temperatura (ambiente – 30 °C e refrigeração) de armazenamento do caldo fermentado liofilizado e com o tempo (0, 30 e 45 dias). É possível observar que não houve alteração significativa na viabilidade celular do caldo fermentado liofilizado armazenado sob refrigeração no decorrer de 45 dias. Entretanto, em relação à amostra armazenada à temperatura ambiente, houve uma diminuição na viabilidade celular a partir de 45 dias.

Figura 3. Concentração média de bactérias viáveis (UFC/mL) de acordo com a temperatura de armazenamento (temperatura ambiente e refrigeração) em função do tempo (0, 30 e 45 dias).



Segundo Brandão et al. (2013) o sucesso na preservação dos micro-organismos depende de vários fatores, inclusive da fase de crescimento na qual o micro-organismo se

encontra no momento do congelamento. Isto porque as variações da resistência microbiana à dessecação estão relacionadas à fase de crescimento na qual o micro-organismo se encontra. Na fase estacionária há escassez de fonte de carbono e de consumo de nutrientes, o que pode induzir a várias respostas fisiológicas. Por outro lado, essas respostas de sobrevivência acabam também protegendo a célula de condições adversas, como a dessecação e às baixas temperaturas.

Verificou-se que as concentrações de células obtidas ao decorrer dos 45 dias sob temperatura ambiente e refrigerada variou entre 10^8 - 10^9 UFC/mL, estando de acordo com a legislação brasileira de bebidas lácteas (Brasil, 2000). Esta recomenda que os micro-organismos produtores da fermentação láctica devem estar presentes e viáveis no produto em quantidades mínimas de 10^6 UFC/mL.

Acredita-se que os valores obtidos no presente trabalho se devem a adição de agentes crioprotetores, que como já foi mencionado, agem protegendo as células, evitando com que possíveis danos sejam causados às mesmas durante as etapas do processo de liofilização.

Nesse trabalho, os agentes crioprotetores utilizados foram a sacarose e a gelatina. Silva et al. (2014) realizaram um planejamento fatorial com diferentes concentrações de três tipos de agentes crioprotetores (gelatina 0-1%, glicerol 0-10% e sacarose 0-10%) para verificar qual desses teria uma melhor influência na viabilidade celular de bactérias ácido lácticas em kefir. A contagem celular foi feita inicialmente e após 4 meses, e pode-se evidenciar que o crioprotetor que mais influenciou na viabilidade celular na contagem inicial para bactérias lácticas foi a sacarose. Já na contagem após 4 meses, a gelatina prevaleceu, entretanto, a sacarose também contribuiu para o aumento da viabilidade.

Segundo a literatura, açúcares são capazes de evitar os danos causados pela desidratação celular, devido ao processo de congelamento, através da estabilização da bicamada lipídica, promovendo alterações na permeabilidade e na separação lateral dos componentes da membrana plasmática. Acredita-se que a sacarose age estabilizando a bicamada de fosfolipídios, mantendo sua capacidade de transporte de cálcio, inibição da fusão de membranas e a manutenção dos lipídios numa fase fluida na ausência de água, protegendo-a assim durante as etapas do processo de liofilização (ALBERTI, 2007).

Em relação à gelatina, há poucos estudos sobre a mesma, mas Sola (2011) cita que a gelatina age extracelularmente, com capacidade de recobrir a superfície celular, formando

uma camada viscosa capaz de estabilizar a parede celular e a membrana plasmática, minimizando e reparando os possíveis danos causados pela liofilização.

Outro estudo realizado para avaliar crioprotetores foi feito por Brandão et al. (2013). Nesse trabalho foram avaliados diferentes crioprotetores (glicerol - 10%, sacarose - 3,4% e trealose - 3,78 %) na produção de materiais de resistência liofilizados a serem utilizados em ensaios com coliformes. A estabilidade foi estudada durante quatro meses, e foi verificado que o lote que continha sacarose apresentou a maior concentração de células após a liofilização. Segundo o autor, a sacarose proporcionou maior resistência às bactérias ao processo de liofilização e a reconstituição do liofilizado. Sabe-se ainda que a sacarose, em concentrações de 1 a 68 % (mediana de 10 %), tem sido frequentemente utilizada para criopreservação de micro-organismos, pelo fato da mesma aumentar a tolerância à dessecação em diferentes micro-organismos devido à estabilização de membranas e proteínas (HUBÁLEK, 2003).

Vale ressaltar que a temperatura é um parâmetro crítico para a sobrevivência microbiana durante o armazenamento. Segundo Carvalho et al. (2004), a estabilidade das amostras secas diminui durante o armazenamento, e as taxas de sobrevivência mais elevadas são registradas com menores temperaturas de armazenamento.

Entretanto, Brandão et al. (2013) analisaram a viabilidade celular de materiais de resistência liofilizados em curta duração (durante 5 dias) armazenados sob quatro diferentes temperaturas (-20 °C, 4 °C, 25 °C e 35 °C). Os autores verificaram que a viabilidade foi praticamente mantida nas quatro temperaturas testadas. No entanto, observaram que nos lotes que continham glicerol após o quarto dia de estoque a 25 °C e após o segundo dia de estoque a 35 °C não foi observado crescimento microbiano. Ainda segundo os autores, a exposição desse material a temperaturas mais elevadas em um curto período de tempo já comprometeu a concentração celular do lote.

Não há muitos estudos utilizando a temperatura ambiente para conservação de materiais liofilizados. De acordo com Costa (2009), o procedimento de estocagem e acondicionamento irá determinar a vida de prateleira de qualquer produto liofilizado. À semelhança da maioria dos produtos perecíveis, os reativos a serem evitados em produtos liofilizados são: oxigênio, luz, contaminação microbiana, umidade e temperaturas elevadas. Ressaltando assim, a importância da realização de mais estudos a longo prazo.

7 CONCLUSÕES

O cultivo de células probióticas de kefir em soro de leite de búfala resultou em uma viabilidade celular de 10^7 UFC/mL, estando de acordo com a literatura de fermentados em soros de leite.

Segundo este trabalho, pode-se dizer que a melhor temperatura para conservação de células probióticas de kefir em soro de leite de búfala foi a temperatura refrigerada. A concentração de células probióticas viáveis no pó liofilizado armazenado sob temperatura refrigerada permaneceu praticamente inalterada no decorrer de 45 dias.

Vale salientar que as concentrações de células viáveis probióticas obtidas ao longo do tempo de 45 dias, em ambas as temperaturas (ambiente e refrigerada), atenderam à legislação brasileira em vigor, considerando que a contagem total de bactérias lácticas viáveis em bebidas lácteas fermentadas deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 354 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas**.

Brasília: ANVISA, 2008. Disponível em:

http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 22 dez. 2014.

ALBERTI, K. **Inovações metodológicas na congelação de sêmen bovino**. 2007. 119 f. Dissertação (Mestrado em reprodução animal) - Universidade Estadual Paulista (UNESP). Botucatu, 2007.

ALONSO, B.; ISAY, S. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos latinoamericanos de nutricion - Organo Oficial de La Sociedad Latinoamericana de Nutrición**, São Paulo, v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

ALVES, M. P. et al. Soro de leite: tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 69, n. 3, p. 212-226, mai/jun, 2014.

ANTUNES, A. E. C.; CAZETTO, T. F.; BOLINI, H. M. A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 15, n. 2, p. 107-114, 2004.

BADARÓ, A.C.L. et al. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana – parte 1. **Nutrir Gerais – Revista Digital de Nutrição**, Unileste - MG, v. 2, n. 3, p. 1-29, Ago./Dez. 2008. Disponível em: http://www.unilestemg.br/nutrirgerais/downloads/artigos/volume3/artigo_5_rmg_alimentos_probioticos.pdf. Acesso em: 22 dez. 2014.

BAPTISTA, E. V. **Desenvolvimento de ingrediente simbiótico por fermentação de soro de leite e do subproduto da agroindústria de suco de laranja por grãos de kefir e cultura probiótica**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em ciências de alimentos) Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2010.

BORZANI, W. (Coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 523 p. 4 v.

BRANDÃO, M. L. L. et al. Avaliação de crioprotetores na produção de material de referência para enumeração de coliformes em leite em pó a ser utilizado em ensaio de proficiência. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 72, n. 2, p. 124-30, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º2, de 7 de janeiro de 2002, Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial** (da) República Federativa do Brasil, Brasília, 2002. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bdac5c80474597399f7ddf3fbc4c6735/rdc_02.pdf?MOD=AJPERES Acesso em: 14 dez 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebidas lácteas. **Diário Oficial da União**, Novembro 2000, Seção I, p. 22-23. Disponível em: http://www.agais.com/normas/leite/leite_rtftq_beb_lacteas.htm Acesso em: 06 jan. 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n. 05 de 13 de novembro de 2000. Padrão de identidade e qualidade de leites fermentados. **Diário Oficial**, Brasília. 2007. Disponível em: <http://www.sfdk.com.br/imagens/lei/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20n%C2%BA05,%2013.11.00.htm> Acesso em: 07 jan. 2015.

CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M. Alimentos funcionais: uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 29, n.2, p. 193-203, jul-dez 1995.

CAPITANI, C. D. et al. Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, n.11, p.1123-1128, nov. 2005.

CARVALHO, A. S. et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v.14, p. 835–847, 2004.

COPPOLA, M. M.; GIL TURNES, C. Probióticos e resposta imune. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.1297-1303, jul-ago, 2004.

CORCIONIVOSCHI, N. et al. Probiotics: Identification and ways of action. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, V. 6, Mar. 2010.

COSTA, E. C. et al. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19, n.2, p. 111-122, 2009.

COSTA, J. M. C.; MEDEIROS, M. F. D.; MATA, A. L. M. L. Isotermas de adsorção de pós de beterraba (*Beta vulgaris* L.), abóbora (*Cucurbita moschata*) e cenoura (*Daucuscarota*) obtidos pelo processo de secagem em leito de jorro: estudo comparativo. **Revista Ciência Agronômica**, v. 34, n. 1, p. 5-9, 2003.

DAYVIDSON, R. H. et al. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal Dairy Science**, Lancaster, v. 83, n. 4, p. 666-673, 2000.

DINIZ, R. O. et al. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira Farmacognosia.**, v. 13, supl., p. 19-21, 2003.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos**: princípios e prática. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation. Córdoba, Argentina: WHO/FAO, 2001. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf. Acesso em: 28 dez. 2014.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n. 5, p.365-378, 1989.

GARDINER, G. E. et al. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **Journal of Agricultural and Food. Chemistry**, Washington, v.47, n.12, p. 4907-4916, 1999.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, London, v.360, p.512-518, 2003.

GUARNER, F.; SCHAAFSMA, G. J. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, 39: 237-238. 1998.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In.: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001. p. 93-122. vol. 2.

HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v.46, p. 205-229, 2003.

INGHAM, S.C. Use of modified *Lactobacillus* selective médium and *Bifidobacterium* iodoacetate médium for differential enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in powdered nutritional products. **Journal of Food Protection.**, Des Moines, v. 62, n.1, p.77-80, 1999.

KAUR, I.P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v.15, p.1-9, 2002.

KEMPKA, A. P. et al. Formulação de bebida láctea fermentada sabor pêsego utilizando substratos alternativos e cultura probiótica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 28(Supl.): 170-177, dez. 2008.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, jul./set., 2008.

KOPP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.101, p. 229-241, 2001.

LEITE, A. M. O. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, vol.44, n.2, p. 341- 9 out de 2013.

LILLY, D.M; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747-748, 1965.

LIMA, D. T. **Efeito crioprotetor de lactose e em células fungícas imobilizadas em alginato de sódio como método de preservação de culturas**. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia médica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

LIRA, H. L. et al. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.29, n.1, Jan.-Mar. 2009.

MACEDO, L.N. et al. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, 2008.

MONTANUCI, F. D.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Caracterização sensorial e aceitação de Kefir adoçado integral e desnatado com inulina. **Brazilian Journal of Food Technology**, 6º SENSIBER, p. 79-90, ago. 2010.

MORAES, F.; COLLA, L. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos : definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Passo Fundo - RN, v. 3, p. 109 - 122, 2006.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Journal of Pediatrics**, v. 82, n. 5, 2006.

MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying: a review. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.66, n.2, p.183-193, ago. 2006.

NEUMANN, A.I; ABREU, E.S; TORRES, E.A.F.S. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos... Você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.14, n.71, p.19-23, abr, 2000.

OLIVEIRA, M. N. et. al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.38, n.1, p. 1- 21, 2002.

OLIVEIRA, M. N. Probióticos: seus benefícios a saúde humana. **Nutrição em Pauta**, v. 15, n.87, 2007.

OLIVEIRA, R. B. S. **Análise microbiológica do quefir em grãos, suspensão, liofilizado e adicionado à ração de coelhos**. 2005. 59 f. Dissertação (Mestrado em ciência animal) - Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS, Alfenas. 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. **Probióticos e prebióticos**. [s.l.]: OMGE, 2008. Guias práticas da OMGE. Disponível em:

http://www.worldgastroenterology.org/assets/downloads/pt/pdf/guidelines/19_probiotics_prebiotics_pt.pdf Acesso em: 08 jan. 2015.

PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, n.2, p. 7-19, 1999.

PELEGRINE, D. H. G. e CARRASQUEIRA, R. L. Aproveitamento do soro do leite no enriquecimento nutricional de bebidas. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB. 2008. Disponível em: http://bjft.ital.sp.gov.br/artigos/especiais/especial_2009_2/v12ne_t0305.pdf Acesso: 15 jan. 2015.

PEREIRA JÚNIOR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 62 p. 2008. (Séries em Biotecnologia, v. 1)

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B.; **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela; 2005.

PIMENTEL, T. C. **Iogurte probiótico com inulina como substituto de gordura**. 2009. 186 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina. 2009.

POFFO, F.; SILVA, M. A. C. Caracterização taxonômica e fisiológica de bactérias ácido-láticas isoladas de pescado marinho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.31, n.2, p. 303-307, abr.-jun. 2011.

POGAČIĆ, T. et al. Microbiota of kefir grains. **Mljekarstvo**, v.63, n.1, p. 3-14. 2013.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RICCI, G. D.; DOMINGUES, P. F. O leite de búfala. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV**, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2012.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Ed). **Probióticos e prebióticos em alimentos**: fundamentos e aplicações tecnológicas. São Paulo: Varela, 2011, 669 p.

SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SANDERS, M.E.; KLAENHAMMER, T.R. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**, Savoy, v.84, p.319-331, 2001.

SANTOS, M. S. et al. Influência do fornecimento de probiótico à base de *Lactobacillus* sp. sobre a microbiota intestinal de leitões. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1395-1400, 2003.

SCHMIDELL, W. et. al. **Biotecnologia industrial**: Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v. 2. 2001. 541 p.

SERVIÇOS BRASILEIROS DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS. **Estudos de mercado**: Queijos nacionais. Relatório completo. [s.l.]: SEBRAE/ESPM, 2008. 150 p. (Série mercado). Disponível em: [http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/\\$File/NT0003909E.pdf](http://bis.sebrae.com.br/GestorRepositorio/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/CE9D867B5588F857832574DC00472D49/$File/NT0003909E.pdf). Acesso em: 05 jan 2015.

SILVA, A. T. A. et al. Eficiência de diferentes crioprotetores, empregados na liofilização, para preservação de bactérias lácticas e leveduras em kefir. **Blucher Food Science Proceedings**, São Paulo, v. 1, n1, p. 577-578, 2014.

SOLA, M. C. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14, p. jun. 2012.

SOLA, M. C. **Manutenção de microrganismos**: conservação e viabilidade. 2011. 31 f. Seminário apresentado junto à disciplina Seminários Aplicados (Doutorado em ciência animal) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia. 2011.

STANTON, C. et al. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., ed. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, p. 27-58, 2003.

STANTON, C. et al. Probiotic cheese. Int. **Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, p.491-496, 1998.

STRINGHETA, P.C et al. **Alimentos “Funcionais”**: conceitos, contextualização e regulamentação. Juiz de Fora: Templo, 2007. 246 p.

TEIXEIRA, L. V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D. A. A. Leite de búfala na indústria de produtos lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.29, n.2, p.96-100, abril/jun. 2005.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 893 p.

WESCHENFELDER et al. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.6, n.2, p. 473-480, mar. 2011.

WOLLOWSKI, L.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.73, suppl.2, p.451-455, 2001.

ZUBILLAGA, M. et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, 2001.