

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
NÚCLEO DE NUTRIÇÃO

Amanda Quintino Ferrão da Silva

MONITORAMENTO DO LEITE DE VACA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR
BIOLOGICUS®

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO/PE
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
NÚCLEO DE NUTRIÇÃO

MONITORAMENTO DO LEITE DE VACA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR
BIOLOGICUS®

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Colegiado do Curso
de Graduação em Nutrição como
requisito para conclusão do Curso de
Bacharel em Nutrição

Autora: Amanda Quintino Ferrão da
Silva

Orientador: Leandro Finkler

Co-orientador: Cedenir Pereira de
Quadros

Supervisor na Empresa: Leonardo
Raffa Quintana

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais, que sempre priorizaram a educação como um direito essencial, e o amor, como um direito incondicional.”

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus pais, que são os seres mais importantes da minha vida, aos quais devo tudo o que construí até hoje. Se um dia sonhei em chegar aonde eu cheguei, a força veio deles e nada seria possível sem eles. Serei eternamente grata a vocês, Antônio José da Silva e Maria de Fátima Ferrão da Silva.

A minha família, que sempre unida, com todas as dificuldades encontradas, nunca me desanimaram, e sim, apoiaram e incentivaram. E é deles que vem a inspiração de um dia eu querer constituir uma família.

Ao meu namorado, Raphael, que já faz parte da minha família, pelo amor, exemplo de dedicação, apoio e conselhos dados.

À empresa BioLogicus e toda a sua equipe, que me proporcionaram todo o aprendizado e as ferramentas para que este trabalho se tornasse possível, sempre incentivando a minha formação acadêmica e científica.

Ao meu orientador, Leandro Finkler; ao meu co-orientador, Cedenir Quadros; ao meu supervisor de estágio, Leonardo Raffa; e à professora Eriane Machado, com os quais tive o privilégio de vivenciar todo um aprendizado científico e concretizar a conclusão da primeira etapa de um sonho.

As minhas melhores amigas, Lucianna Lira, Anita Fernanda, Renata Beserra, e Caline Braga, que me acompanharam nesta jornada, sempre me apoiando e me ajudando em tudo o que eu precisava.

EPÍGRAFE

*“Espere sentado ou você se cansa.
Está provado, quem espera nunca alcança.
Corro atrás do tempo. Vim de não sei onde.
Devagar é que não se vai longe.
Eu semeio o vento na minha cidade.
Vou pra rua e bebo a tempestade”.*
Chico Buarque de Holanda.

RESUMO

Atualmente, o mercado consumidor tem tido que se adaptar às necessidades de cada grupo de indivíduos a exemplo do público de intolerantes à lactose, cujo problema ainda pode se encontrar negligenciado, apesar da sua alta prevalência. Nesse cenário, o Kefir, leite fermentado por culturas probióticas, abrange diversos benefícios, podendo aliar valor nutricional, funcionalidade e qualidade. Sabendo que a fermentação do leite com culturas probióticas favorece ao consumo da lactose, neste trabalho foi estudado o comportamento desse açúcar para viabilizar um produto (Leite fermentado com micro-organismos probióticos derivados do Kefir BioLogicus) possível de ser consumido pelos intolerantes à lactose. Parâmetros físico-químicos (pH, acidez e lactose) e microbiológicos (contagem de bactérias e leveduras) foram acompanhados no momento da inoculação e no final do processo fermentativo, bem como durante o período de armazenamento (35 dias). Com o objetivo de obter a bebida, o inóculo contendo os micro-organismos probióticos, foi adicionado no substrato (leite) a 27° C e os valores de pH e acidez monitorados, permanecendo constantes. O processo de fermentação foi realizado por um período de 17 horas à temperatura ambiente (27° C). Após o período de fermentação o produto final foi acondicionado em cubas fermentativas à temperatura constante de 5° C. Esta estratégia permitiu a conservação do produto, uma vez que proporcionou a estabilização e a viabilidade dos micro-organismos probióticos. A viabilidade probiótica pôde ser acompanhada no presente estudo tanto para bactérias lácticas (10⁸ UFC/mL), quanto para leveduras (10⁶ UFC/mL). Tais resultados superam os requisitos mínimos preconizados pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). A acidez do produto, assim como o microbiológico, atendeu de forma satisfatória a normatização do MAPA. O trabalho mostrou que após a fermentação do leite por micro-organismos probióticos há um aumento significativo da acidez, conseqüentemente, uma redução nos valores de pH. A concentração de lactose também foi reduzida, do momento da inoculação (5,03% de lactose) ao final das 857 horas do processo fermentativo estudado (3,86% da lactose). Dessa forma, o Kefir BioLogicus[®] de leite pode ser inserido na dieta com a ingestão do volume de probióticos necessários por dia, sem ter que restringir os produtos lácteos de forma

severa, uma vez que a fermentação permite uma significativa redução do teor de lactose.

Palavras-chave: Análises físico-químicas. Kefir. Lactose. Probióticos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da lactose	14
Figura 2 – Grãos de Kefir	17
Fluxograma 1 – Desenho do estudo	24
Fluxograma 2 - Fluxograma de produção do Kefir BioLogicus®	26
Gráfico 1 – Determinação da porcentagem de lactose em função do tempo	30
Gráfico 2 – Análise quantitativa de bactérias ácido-lácticas em função do tempo ...	32
Gráfico 3 – Análise quantitativa de leveduras em função do tempo	33
Gráfico 4 – Análise do pH e da acidez em função do tempo	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do Kefir.....	18
Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão dos resultados da lactose obtidos em duplicata.....	29
Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão dos resultados de bactérias lácticas obtidos em duplicata	31
Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão dos resultados de leveduras obtidos em duplicata.....	32
Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão dos resultados de pH e acidez obtidos em duplicata.....	34

Sumário

1	Introdução	9
1.1	Caracterização do problema	11
1.2	Marco teórico	12
1.2.1	A Problemática da Intolerância à Lactose e seu Impacto na Sociedade	12
1.2.2	Lactose	13
1.2.3	Uso de Produtos Lácteos com Baixo Teor de Lactose	15
1.2.3.1	Importância nutricional do leite	15
1.2.3.2	Leites fermentados	16
1.2.3.3	Kefir: um probiótico	16
1.2.3.4	Kefir: uma simbiose	19
1.2.4	Influência das Condições Ambientais no Bioprocesso	20
1.3	Justificativa	21
2	Objetivos	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	Hipótese	23
4	Metodologia	24
4.1	Área	24
4.2	Objeto e grupos de estudo	24
4.3	Período de referência	24
4.4	Desenho do estudo	24
4.5	Definição das variáveis	25
4.6	Método de coleta de dados	25
4.7	Método de análise	25
4.7.1	Produção do Kefir de leite	25
4.7.2	Determinação de glicídeos redutores em lactose	26
4.7.3	Análise quantitativa de bactérias lácticas e leveduras	27
4.7.4	Determinação do pH	27
4.7.5	Análise da acidez em ácido láctico para leites fermentados	28

5	Resultados e discussão.....	29
5.1	Determinação do teor de lactose.....	29
5.2	Análise quantitativa de micro-organismos.....	31
5.2.1	Bactérias ácido-lácticas.....	31
5.2.2	Leveduras.....	32
5.3	Análise do pH e da acidez.....	33
6	Conclusões.....	35
7	Referências.....	36

ANEXO

1 INTRODUÇÃO

A intolerância à lactose é um problema que atinge 75% da população mundial (HERTZLER & CLANCY, 2003), pois é uma desordem genética bastante comum (DURING *et al.*, 1998), que é caracterizada pela dificuldade em digerir a lactose, o principal açúcar do leite. Isto se deve a uma deficiência na β -galactosidase ou lactase, enzima responsável por facilitar a absorção intestinal da lactose pela degradação deste carboidrato em dois monossacarídeos: glicose e galactose (SUENAGA *et al.*, 2003).

Em uma digestão padrão da lactose, seria esperada a obtenção de dois açúcares simples a partir da quebra deste dissacarídeo no interior do lúmen do intestino delgado. Já a dificuldade de digerir a lactose ocorre quando este açúcar se apresenta em quantidade superior à atividade da lactase e atinge o cólon excessivamente. Esta problemática geralmente acomete adultos, devido a uma tendência natural e bastante individualizada de declínio de atividade da lactase nesta fase da vida (LOMER, PARKES & SANDERSON, 2007).

Sob o aspecto clínico, o termo intolerância à lactose, para assim ser designado, devem ser apresentados sintomas associados à sinais clínicos que interfiram na digestão deste carboidrato. Estes sinais que podem desencadear os sintomas são: o baixo nível de atividade da enzima lactase, a quantidade de lactose consumida e a presença de outros nutrientes, como proteína e gordura (SAHI, 1994; MILLER, JARVES & McBEAN, 2007).

Dentre os sintomas mais comuns observados numa pesquisa com a população norte-americana intolerante à lactose, por ordem decrescente de frequência, estão: flatulência, dores abdominais, indigestão, diarreia, inchaço, constipação, vômitos, erupções cutâneas, aftas, e outros sintomas (KEITH *et al.*, 2011).

Na extinção dos sintomas, que também podem existir na má digestão, produtos com culturas benéficas de micro-organismos podem ser bastante eficazes. Produtos que apresentam a característica de melhorar a digestão da lactose podem ser não só o iogurte, como também os leites fermentados que contêm bactérias probióticas (DE VRESE *et al.*, 2001).

A escolha do leite como matéria-prima para a inserção destes micro-organismos se deve, não apenas ao seu preço acessível, mas principalmente pelo fato de atuar como fonte de diversos nutrientes como proteína, cálcio, potássio, magnésio, vitaminas A, D, B12 e riboflavina. Além disso, tanto a pirâmide alimentar brasileira (PHILIPPI, 2006), quanto as Diretrizes Dietéticas de 2005 para americanos, propõem a recomendação de 3 porções por dia de leite, iogurte ou queijo, importantes na manutenção da qualidade alimentar e dos ossos (USDA, 2005).

Ultimamente tem crescido o interesse pelo uso de micro-organismos benéficos à saúde humana, também atendendo ao propósito de prevenção e tratamento de doenças. Estes micro-organismos caracterizam os probióticos que também podem funcionar como medida alternativa na prevenção ou tratamento de inúmeros tipos de desordens intestinais (MARTINS *et al.*, 2005). A definição mais atual de probióticos, aceita internacionalmente, indica que eles são micro-organismos vivos, que ingeridos em quantidade suficiente, proporcionam benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; SANDERS, 2003).

Quanto aos efeitos proporcionados pelas bactérias probióticas, há três tipos de classificações. A primeira classificação, diz respeito à atividade imunomoduladora do hospedeiro, incluindo o sistema imune inato ou adquirido; uma segunda classificação se refere ao efeito direcionado das bactérias aos demais micro-organismos, sejam comensais ou patogênicos; e por último, o efeito se fundamenta na eliminação de metabólitos microbianos, a exemplo das toxinas, induzindo a desintoxicação do intestino do hospedeiro (OELSCHLAEGER, 2010).

A importância dos probióticos também se deve ao considerar que no trato gastrointestinal, das 400 espécies bacterianas existentes, apenas de 30 a 40 destas proporcionam efeitos aos seus hospedeiros, atingindo níveis dominantes (MOORE & HOLDEMAN, 1974; VAUGHAN *et al.*, 2000). Além disso, a microbiota normal apresenta micro-organismos benéficos e deletérios (ROBERFROID, 2001).

Proporcionando benefícios, o probiótico é considerado um produto funcional que pode produzir substâncias bactericidas, promover adesão à mucosa do intestino e competir por nutrientes, sendo todos estes, mecanismos capazes de reduzir a quantidade de bactérias patogênicas. Desta forma, as bactérias probióticas apresentam efeito sobre a inibição da colonização do intestino por bactérias

patogênicas, além de apresentar eficácia no equilíbrio bacteriano intestinal, controle de diarreias, do colesterol e redução do risco de câncer (WAITZBERG, 2000).

Considerado um bom exemplo de produto probiótico, o Kefir também pode ser denominado como um leite fermentado levemente ácido e alcoólico cuja origem é estabelecida na região do Cáucaso (Rússia) (ANAR, 2000). O Kefir é obtido tradicionalmente através do uso do leite como matéria-prima, sofrendo a ação de bactérias lácticas, leveduras e bactérias produtoras de ácido acético. Estes micro-organismos se encontram agregados a uma massa embebida por uma matriz complexa de proteínas e carboidratos, que compõem o grão de Kefir (SIMOVA *et al.*, 2002; FARNWORTH & MAINVILLE, 2003).

São inúmeros, os benefícios ofertados à saúde, através da inserção do Kefir de leite na dieta. Com o seu consumo, puderam ser relatados efeitos antibacterianos, de fortalecimento do sistema imunológico, antitumoral e hipocolesterolêmico (IRIGOYEN *et al.* 2005).

Dentre as empresas que processam esse tipo de alimento, a BioLogicus® foi a primeira empresa brasileira a industrializar produtos fermentados a partir de um consórcio de micro-organismos probióticos – lactobacilos e leveduras, principalmente. Atuando na produção de bebidas fermentadas de leite de vaca, soja e búfala, ainda se destaca por ser reconhecida mundialmente como empresa pioneira na produção de bebidas fermentadas de frutas. Atualmente, a BioLogicus® está coordenando a implantação do primeiro laboratório de produção de probióticos do país, o Laboratório de Probióticos e Fitoterápicos – LPF, após ter firmado um convênio com o Instituto de Tecnologia de Pernambuco (ITEP).

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

Atualmente, são diversos os alimentos lácteos fermentados comercializados, mas é praticamente inexistente o conhecimento a cerca do teor de lactose destes produtos (BORGES *et al.*, 2010).

Os fornecedores de lactose na dieta são os produtos lácteos. Estes, quando submetidos ao processo fermentativo, são melhores tolerados por grupos como os intolerantes à lactose. A quantidade deste dissacarídeo pode variar de acordo com a

matéria-prima e o processo de produção utilizado (ADOLFSSON, MEYDANI, RUSSEL, 2004; SANDERS & LUPTON, 2006; SIMON & GORBACH, 1995).

Dessa forma, a fim de obter um produto para um público específico, há necessidade de compreender como ocorre a redução do teor de lactose, especialmente quando o leite é submetido a um processo fermentativo responsável pela conversão em ácido láctico.

1.2 MARCO TEÓRICO

1.2.1 A Problemática da Intolerância à Lactose e seu Impacto na Sociedade

Segundo Egashira e colaboradores (2008), a intolerância à lactose é bastante prevalente, especialmente entre os adultos negros, asiáticos e sul-americanos. Essa problemática é historicamente conhecida como um estado fisiológico “normal” (MAHAN & STUMP, 2002), enquanto a tolerância é considerada “anormal”. Isso se deve ao fato da enzima lactase atuar de forma mais efetiva na mucosa intestinal do recém-nascido, tendo sua atividade reduzida após o desmame (SHILLS *et al.*, 2003), esta se limitando a 10% do valor neonatal na fase adulta. No entanto, esta situação não deve ser considerada uma condição patológica (EGASHIRA, MIZIARA & LEONI, 2008).

Podendo atingir pessoas em todos os estágios da vida, a intolerância à lactose acomete crianças, normalmente de forma secundária a uma infecção em nível do intestino delgado, o que pode levar a destruição das células da mucosa intestinal. Como a lactase é produzida na ponta das microvilosidades intestinais, a mesma torna-se a enzima mais facilmente perdida nas doenças intestinais, no entanto devendo se procurar reintroduzir o leite o mais breve possível (EGASHIRA, MIZIARA & LEONI, 2008).

Ainda que a intolerância seja vista como uma condição “natural”, a mesma não deve ser negligenciada, visto a importância da assistência necessária ao atendimento de uma média de 58 milhões de brasileiros com algum tipo de dificuldade em digerir a lactose pela deficiência da enzima lactase no intestino

(BATAVO, 2004). Segundo Reis e colaboradores (1999), 46 a 67% dos brasileiros são acometidos por tal problemática.

Quando a lactose não é hidrolisada e, conseqüentemente, deixa de ser absorvida, esta é mantida no intestino exercendo uma ação osmótica que desloca a água para o lúmen intestinal. O dissacarídeo não digerido acaba sendo fermentado pelas bactérias do cólon, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio (MAHAN & STUMP, 2002).

O desencadeamento de sintomas, como a diarréia, pode ser ocasionada pela ação osmótica, enquanto a ação bacteriana leva a desconforto, distensão e dores abdominais, além de náuseas e flatulência. Estes sintomas podem levar ao desequilíbrio eletrolítico, desidratação, letargia, irritabilidade e acidose metabólica (PEREIRA, 1981).

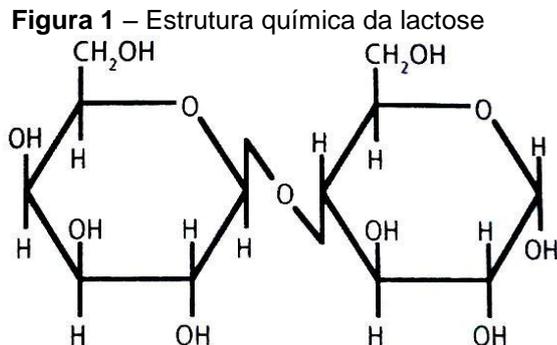
O risco de se desenvolver uma intolerância à lactose pode ser reduzido mediante exposição precoce ao leite, o que pode determinar o diferente nível de sua prevalência em sociedades com frequência distinta de consumo lácteo (PEREIRA, 1981). Aliado a isto, pessoas com a doença já estabelecida podem tolerar determinados teores de lactose gradativamente ao longo do tratamento, não necessitando de restrições por toda a vida (HERTZLER, HUYNH & SAVAIANO, 1996).

Há uma recomendação geral de que o intolerante possa consumir diariamente até 6g de lactose (HERTZLER, HUYNH & SAVAIANO, 1996). No entanto, segundo Suarez e colaboradores (1997), diversos estudos indicam que a maioria dos intolerantes à lactose não apresentam sintomas característicos da problemática, sendo capaz de ingerir a quantidade de lactose presente em um copo de leite (250 mL), o que corresponde em torno a 12 g de lactose.

1.2.2 Lactose

A lactose é um dissacarídeo redutor (Figura 1) composto pela junção de duas moléculas: os monossacarídeos galactose e glicose (BOBBIO & BOBBIO, 2003), sendo esta representante do resíduo que confere propriedades redutoras à estrutura química da lactose (GOURSAUD, 1985). É ainda um açúcar sintetizado apenas pelas glândulas mamárias da maioria dos mamíferos (MAHAN & STUMP, 2002) cuja

concentração se altera de acordo com a espécie, compondo, em média, 5% do leite de vaca (PEREIRA, 1981; MAHAN & STUMP, 2002).



Fonte: EGASHIRA, MIZIARA & LEONI, 2008

Visto que a lactose é o composto que mais pode alterar no leite, a sua quantificação é importante (BORGES, PARAZZI & PIEDADE, 1987), partindo da premissa que este açúcar se encontra numa proporção de aproximadamente 48 g/L leite *in natura* (TRONCO, 1997). Existem diversos métodos químicos não seletivos de determinação dos açúcares redutores, cujo grau de confiabilidade é alto. Para tanto, é importante a prática correta da metodologia após eliminação ou, ao menos, redução dos interferentes presentes no bioprocesso (BORGES, PARAZZI & PIEDADE, 1987).

Os métodos utilizados na determinação de açúcares podem ser titulométricos (MATISSEK, SHNEPEL & STEINER, 1998), gravimétricos (SPENCER & MEADE, 1945), espectrofotométricos (NELSON, 1944; MILLER, 1959; VILLELA, BACILA & TASTALDI, 1973) e cromatográficos (CANO & ALMEIDA-MORADIAN, 1998).

No intuito de determinar o teor de lactose no Kefir, pode se fazer alusão a alguns métodos tradicionais de determinação de açúcares redutores. Geralmente, esses métodos são baseados na redução de íons cobre presentes em soluções alcalinas (solução de Fehling) (LANE & EYNON, 1923; NELSON, 1944; DUBOIS *et al.*, 1956; MILLER, 1959), isto é, a técnica consiste na redução do licor alcalino de Fehling pelo resíduo redutor de glicose da lactose da amostra titulada (GOURSAUD, 1985). Ainda existem aqueles baseados na desidratação dos açúcares, por uso de ácidos concentrados, com posterior coloração por compostos orgânicos, além da simples redução desses compostos formando outros de coloração mensurável no

espectro do visível (LANE & EYNON, 1923; NELSON, 1944; DUBOIS *et al.*, 1956; MILLER, 1959).

1.2.3 Uso de Produtos Lácteos com Baixo Teor de Lactose

Indivíduos que apresentam condições especiais, como a intolerância à lactose, de uma forma geral, apresentam as mesmas necessidades nutricionais de pessoas que não são acometidas por nenhuma problemática. Devido a isto, se dá a importância de não restringir totalmente o consumo de produtos lácteos, podendo se optar pela ingestão de leites com baixo teor de lactose. Esses produtos podem ser: o leite longa vida com baixo teor de lactose (ABLV, 2008), o leite Zymil (Parmalat), Elegê – Baixo Teor de Lactose (Eleva), Sensy (Batavo), Betânia Lactose Reduzida (Betânia) (BALDO, 2008).

1.2.3.1 Importância nutricional do leite

O leite é um líquido constituído, em sua maior parcela, por água (86%) sendo também composto por lactose, vitaminas, minerais, proteínas e gorduras que formam uma emulsão responsável por 12 a 15% de sólidos (DUNKER, ALVARENGA & MORIEL, 2008).

Para Dunker e colaboradores (2008), a qualidade da proteína do leite é de suma importância na promoção do crescimento e desenvolvimento de crianças e manutenção da saúde do adulto. A deficiência de um ou mais aminoácidos essenciais pode ocasionar problemas na síntese protéica e assim impedir a promoção e manutenção destes benefícios. Os aminoácidos essenciais, a exemplo do triptofano, precursor da niacina e do neurotransmissor da serotonina, são aqueles que precisam ser ofertados pela dieta já que não são sintetizados pelo metabolismo humano.

Neste cenário, entram os produtos de origem animal, como o leite, que contém proteína de alto valor biológico. O mesmo não ocorre com as proteínas de origem vegetal, devido ao número de alguns aminoácidos essenciais serem ausentes ou reduzidos. As principais proteínas do leite são a caseína e as proteínas do soro. A caseína é uma proteína de referência e de boa qualidade por atender às necessidades do ser humano no que diz respeito à quantidade de aminoácidos essenciais nela existente. Além disto, as proteínas do leite apresentam um alto grau

de digestibilidade, assim como toda proteína de origem animal (DUNKER, ALVARENGA & MORIEL, 2008).

1.2.3.2 Leites fermentados

A maioria dos estudos voltados aos efeitos benéficos que os leites fermentados proporcionam, ocorre em torno da problemática da má digestão da lactose e precaução contra os seus sintomas gastrointestinais (DE VRESE *et al.*, 2001).

Segundo a resolução nº 5 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), de 13 de novembro de 2000, Leites Fermentados são os produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios, que devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final até o término da sua vida de prateleira (BRASIL, 2000).

Uma definição mais atual, segundo a resolução nº 46 do MAPA, de 23 de outubro de 2007, indica que os leites fermentados são produtos obtidos por coagulação e redução do pH do leite, onde são inseridas, ou não, outras substâncias alimentícias. Esses produtos também podem ser reconstituídos, adicionados ou isentos de outros produtos lácteos, e sofrer fermentação láctica, que ocorre através da atividade de cultivos de micro-organismos específicos. Ainda assim, é mantida a mesma idéia de viabilidade, atividade e abundância dos referidos micro-organismos específicos no produto final, ao longo da sua vida útil (BRASIL, 2007).

O processo fermentativo envolve a fermentação da lactose, que têm como protagonistas bactérias que se dividem em dois grupos. Há o grupo das bactérias heterofermentadoras, que produzem alguns ácidos, como o ácido láctico e o acético; e as homofermentadoras, que são geralmente responsáveis pela produção do ácido láctico, gerado como subproduto da degradação dos açúcares (TRONCO, 1997), como a lactose. Dentre os diferentes tipos de leites fermentados está o produzido pelos grânulos de Kefir.

1.2.3.3 Kefir: um probiótico

Os probióticos são micro-organismos vivos que através da fermentação de alimentos promovem efeitos benéficos por proporcionar o equilíbrio da microflora intestinal. Estes benefícios podem inserir os probióticos na categoria de alimentos

funcionais, atuando na integridade da mucosa gastrointestinal (DUGGAN, GANNON & WALKER, 2002).

A busca por novas alternativas que atendam às necessidades do público alvo, compete à tecnologia alimentar. Nesse âmbito, há uma procura crescente por alimentos com valor funcional agregado, a exemplo dos probióticos que possuem 10^8 Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) (BRASIL, 2008).

A indústria de laticínios, particularmente, achou nas culturas probióticas uma alternativa para a criação de novos produtos (CHAMPAGNE, GARDNER & ROY, 2005). Graças à isto, uma imensa variedade de produtos lácteos probióticos se encontram no mercado, e a diversidade desses produtos segue em expansão (STANTON *et al.*, 2003).

Embora seja menos conhecido que o iogurte, o Kefir é um probiótico, que apresenta compostos bioativos que lhe conferem benefícios à saúde considerados singulares (FARNWORTH, 1999), sendo muito recomendado para atender ao público com intolerância à lactose (HERTZLER & CLANCY, 2003).

O Kefir é uma bebida viscosa, levemente gaseificada, com pouco álcool, obtida, tradicionalmente, através do leite de vaca. Essa bebida é obtida a partir de grãos de Kefir usualmente inseridos no leite. Esses grãos de Kefir (Figura 2) se assemelham a floretes de couve-flôr pequenos, de coloração branca a amarela, textura viscosa, firmes e com uma média de comprimento de 1 a 3 cm (LA RIVIÈRE, KOOIMAN & SCHMIDT, 1967; KOSIKOWSKI & MISTRY, 1997). Os grãos consistem de uma massa de proteínas, polissacarídeos, micro-organismos mesófilos, estreptococos ácido láctico homofermentativos e heterofermentativos, lactobacilos termófilos e mesófilos, bactérias ácido acéticas, e leveduras (HALLÉ *et al.*, 1994; TAMIME, MUIR & WSZOLEK, 1999).

Figura 2 – Grãos de Kefir



Fonte: FARNWORTH, 2003

Segundo o mesmo regulamento técnico e normativa do MAPA que define os leites fermentados, o Kefir é definido como uma bebida que se encaixa na definição destes produtos e cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados a partir dos grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de Kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* (BRASIL, 2007).

De forma bastante similar à resolução nº 46 do MAPA, o *Codex Alimentarius* define o Kefir como sendo uma cultura starter (cultura-mãe) elaborada a partir de grãos de Kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* que se desenvolvem através de uma relação simbiótica muito intensa. O *codex* também afirma que os grãos de Kefir são compostos pelas mesmas leveduras fermentadoras de lactose e não fermentadoras referidas no regulamento técnico do MAPA. O *Codex Alimentarius*, também apresenta a composição química média do Kefir (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição do Kefir

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO KEFIR	
Proteína do leite (% w/w)	mín. 2,8
Gordura do leite (% m/m)	< 10
Acidez titulável, expressada por ácido láctico (% m/m)	mín. 0,6
Etanol (% vol.w)	não detectado
Resumo de micro-organismos constituintes da cultura mãe (UFC/g em total)	mín. 10 ⁷
Leveduras (UFC/g)	mín. 10 ⁴

Fonte: *Codex alimentarius*, 2003

O Kefir apresenta composições químicas variáveis, portanto não havendo um padrão bem definido para estas estruturas (ZUBILLAGA *et al.*, 2001). Estas alterações nas composições podem ocorrer a depender da fonte e do teor de gordura do leite utilizado, composição dos grãos ou de culturas e do processo tecnológico empregado (SALOFF-COSTE, 1996).

Os grãos de Kefir agregam ao leite proteínas, polissacarídeos e uma microflora complexa que atua em associação simbiótica (GARROTE, ABRAHAM &

DE ANTONI, 2000). A matriz de polissacarídeos é responsável pela estrutura dos grãos (FRENGOVA *et al.*, 2002).

Além de ser rico em polissacarídeos, o Kefir conta com o ácido láctico, as leveduras e o polissacarídeo kefirano que concedem as propriedades ao produto graças as suas atuações simbióticas (FRENGOVA *et al.*, 2002). No Kefir, o ácido láctico se encontra em altas concentrações após o processo fermentativo, onde pode ocorrer a conversão de aproximadamente 25% da lactose em ácido láctico (ALM, 1982).

A atuação destes probióticos, segundo Parvez e colaboradores (2006), na fermentação láctea pode resultar em características, como: a conservação de produtos lácteos, devido a síntese de ácido láctico e, possivelmente, de outros compostos antimicrobianos; aumento do valor nutricional, que pode ocorrer por meio da síntese de vitaminas ou da liberação de aminoácidos livres; e o fornecimento de funções profiláticas ou terapêuticas. Contudo, é importante o conhecimento de que as culturas probióticas podem deixar de oferecer as duas primeiras características citadas, pois também estão relacionadas as culturas starter presentes no produto.

Contando com o perfil probiótico composto por bactérias e leveduras benéficas, o Kefir ainda agrega diversos valores nutricionais sendo composto por vitaminas do complexo B, minerais e aminoácidos essenciais imprescindíveis para a manutenção de funções vitais do ser humano (TIETZE, 1996).

Os minerais cálcio e magnésio e o aminoácido essencial triptofano são encontrados em grande quantidade no Kefir, exercendo efeito relaxante sobre o sistema nervoso. Outro mineral presente no Kefir é o fósforo que atua no processo de absorção de nutrientes essenciais, como os carboidratos que tornam possível a oferta energética, e as proteínas que permitem a manutenção e o crescimento celular. O Kefir também pode auxiliar regulando a atuação renal e hepática, melhorando a cicatrização e o sistema imune (TIETZE, 1996).

1.2.3.4 Kefir: uma simbiose

Dois dos principais micro-organismos que estão presentes no Kefir são as bactérias ácido-lácticas e as leveduras. Ambas as culturas, se separadas, não conseguem se multiplicar ou têm uma atividade bioquímica reduzida no leite (KOROLEVA, 1991). E ainda que atuem de forma simbiótica, as bactérias ácido-lácticas (mínimo 10^7 , segundo a Norma FIL 117A:1998 do MAPA), ainda são

encontradas em maior quantidade que as leveduras (mínimo de 10^4 , segundo a Norma FIL 94A:1990 do MAPA) (BRASIL, 2007).

Atuando no leite, as bactérias ácido-lácticas têm como principal papel aumentar o tempo de conservação dos fermentados através da produção de ácido láctico, em sua maioria. Estes ácidos orgânicos acidificam o produto até o pH 4, aproximadamente, impedindo o crescimento de bactérias indesejáveis.

Além desta característica, através da produção de enzimas a exemplo das glicolíticas, lipolíticas e proteolíticas, as bactérias lácticas são capazes de modificar características sensoriais de produtos agrícolas, através de alterações nas suas propriedades, que se tornam mais complexas.

Já no que diz respeito à atividade probiótica, que pode ser atribuída às bactérias lácticas, elas podem atuar vitalmente amenizando a intolerância à lactose uma vez que produzem a enzima β -D-galactosidase responsável por degradar o carboidrato no intestino. E também como atividade probiótica em nível da higienização do tubo digestivo, estas bactérias atuam participando da ampla flora de micro-organismos capazes de promover defesa contra contaminações digestivas (PIARD *et al.*, 1999).

Embora haja um menor enfoque no estudo das leveduras, sua importância se dá pela criação do, já esperado, ambiente que propicia o crescimento de bactérias do Kefir que colaboram para o seu *flavor* (CLEMENTI, GOBBETTI & ROSSI, 1989; KWAK, PARK & KIM, 1996; SIMOVA *et al.*, 2002).

A oferta de nutrientes fundamentais, como os aminoácidos e vitaminas, é estabelecida por leveduras agregadas a produtos lácteos, sendo uma importante função destes micro-organismos que também ocasionam a alteração do pH e produção de CO_2 (VILJOEN, 2001).

1.2.4 Influência das Condições Ambientais no Bioprocesso

Segundo Vinderola e colaboradores (2002), a escolha de combinações específicas de espécies probióticas é de suma importância para se proporcionar as possíveis interações entre essas culturas inseridas na matéria-prima utilizada. Essa prática leva à otimização do processo tecnológico, garantindo a viabilidade das células ao longo do armazenamento sob refrigeração. No entanto, o maior desafio

se encontra no controle da proporção das diferentes cepas, cujas interações podem ser influenciadas pelo meio (CHAMPAGNE, GARDNER & ROY, 2005). Dessa forma, se dá a importância de avaliar a proporção das cepas probióticas estudadas ao longo de todo o processo de armazenamento.

No que diz respeito à influência da temperatura nesse processo de armazenamento, essa variável é um dos fatores externos que mais interferem no crescimento e atuação metabólica dos micro-organismos. Baixas temperaturas de refrigeração reduzem a velocidade de reações enzimáticas e químicas em grandezas logarítmicas, visando preservar ao máximo a qualidade dos alimentos (PEREDA, 2005).

Outros fatores que podem influenciar em características como sabor, viscosidade e constituição química ou microbiológica do Kefir, são: agitação durante o processo fermentativo, o tamanho do inóculo de Kefir, a temperatura e o tempo de refrigeração após a fermentação (KOROLEVA, 1988).

1.3 JUSTIFICATIVA

Há a necessidade de monitorar o produto fermentado com Kefir em relação às características físico-químicas e a concentração de lactose final, a fim de garantir a segurança do consumidor, especialmente, o intolerante à lactose.

O desenvolvimento do Kefir pode compor a dieta de grupos de intolerantes à lactose, haja vista a sua propriedade funcional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Monitorar a produção de leite fermentado por grãos de Kefir BioLogicus.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o teor de lactose do produto fermentado ao longo de sua vida de prateleira;
- Realizar análise quantitativa de bactérias lácticas e leveduras presentes no produto fermentado;
- Analisar o pH e a acidez do produto fermentado.

3 HIPÓTESE

A incorporação de grânulos de Kefir BioLogicus® no leite de vaca diminui a concentração final de lactose.

4 METODOLOGIA

4.1 Área

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P, D & I) da Empresa - BioLogicus[®] Indústria e Comércio de Produtos Naturais S/A.

4.2 Objeto e grupos de estudo

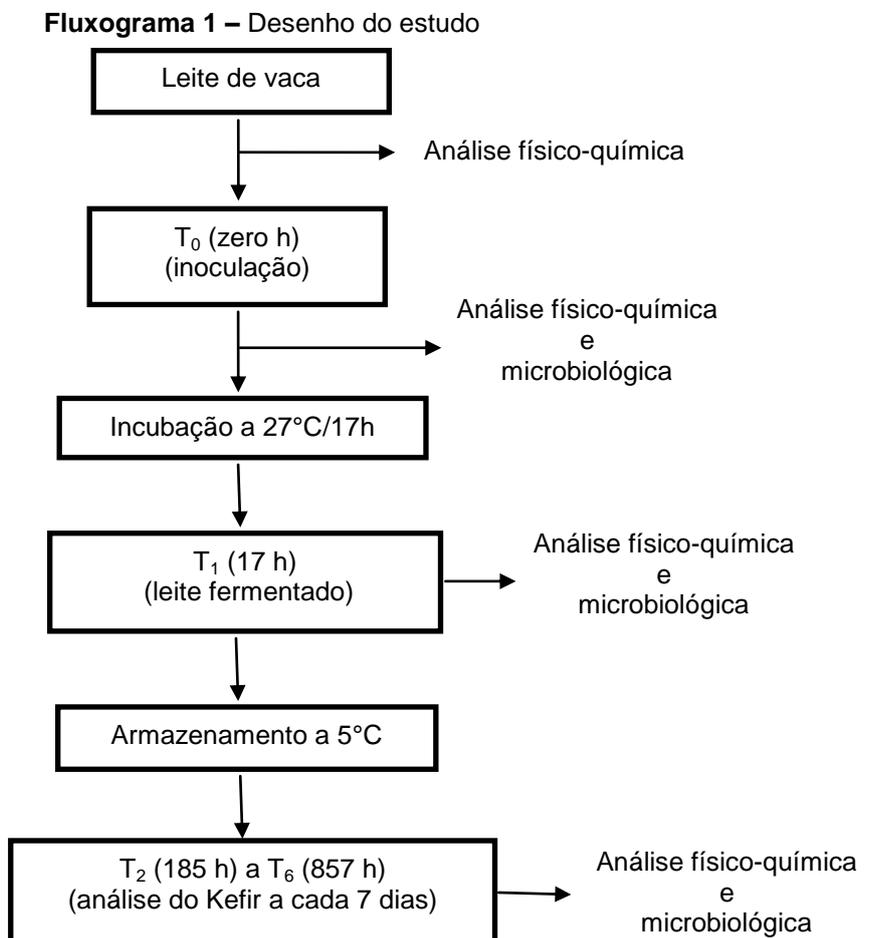
O objeto de estudo foi avaliar o teor de lactose em Kefir de leite de vaca. Para este fim, foram realizadas análises de dois cultivos em duplicata.

4.3 Período de referência

A realização das análises ocorreu semanalmente no período de fevereiro a março de 2011.

4.4 Desenho do estudo

O desenho do estudo, abaixo representado, foi aplicado simultaneamente para ambos os lotes (cultivos) realizados em duplicata.



4.5 Definição das variáveis

No presente estudo, as variáveis de respostas avaliadas, foram: concentração de lactose, pH, acidez, bactérias lácticas e leveduras.

4.6 Método de coleta de dados

A coleta de dados foi realizada a partir das análises experimentais, cujos resultados foram registrados em caderno de laboratório e em planilhas digitais.

As análises experimentais foram realizadas e registradas no período expresso em horas, tendo o T_0 (Tempo zero) representado o período imediato após inoculação do leite com os grãos de Kefir/início da fermentação à temperatura ambiente. Já o T_1 (Tempo 1), representou o final da fermentação dentro de 17 horas em temperatura ambiente, logo após disto, ocorrendo o armazenamento a 5°C (T_2 a T_6) nos períodos subseqüentes, totalizando 857 horas (35 dias).

4.7 Método de análise

4.7.1 Produção do Kefir de leite

Material: Cubas de fermentação de aço inoxidável

Equipamento: Câmara de refrigeração

Matéria prima: Leite UHT

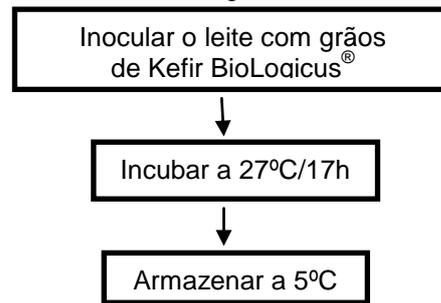
Grãos de Kefir BioLogicus[®]

Inicialmente, foram realizadas as análises físico-químicas do leite UHT a ser fermentado.

Em seguida, foi realizada a inoculação de 5 litros de leite por grãos de Kefir BioLogicus[®] (Fluxograma 2) na cuba de fermentação, representando o 1º lote. Esta amostra foi incubada a 27°C , atingindo uma temperatura máxima de $28,1^\circ\text{C}$ e mínima de $26,5^\circ\text{C}$, até atingir 17 horas, e então, armazenada à temperatura de 5°C . O mesmo procedimento foi empregado para o 2º lote do produto.

As análises físico-químicas, foram efetuadas semanalmente em duplicata, dentro de um período de 5 semanas.

Fluxograma 2 - Fluxograma de produção do Kefir BioLogicus®



4.7.2 Determinação de glicídeos redutores em lactose

No intuito de determinar a lactose, foi utilizado o método 432/IV de determinação de glicídeos redutores em lactose para leites (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985), sendo o resultado expresso pela média de quatro replicatas.

Materiais: balão volumétrico de 100 mL, balão de fundo chato de 300 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, bureta de 25 mL, pipetas volumétricas de 10 mL, pipeta graduada de 2 mL, funil de vidro, papel de filtro, chapa aquecedora, e garra.

Reagentes: Solução de sulfato de zinco a 30% (m/v) F maia®; Solução de ferrocianeto de potássio a 15% (m/v) F maia®; Soluções de Fehling A e B Dinâmica Química Contemporânea® Ltda.

Procedimento

Foi transferido, para o balão volumétrico de 100 mL, 10 mL da amostra com o auxílio da pipeta volumétrica, e logo foram adicionados e subsequentemente homogeneizados, 50 mL de água destilada, 2 mL de sulfato de zinco e 2 mL de ferrocianeto de potássio. Após 5 minutos da solução em repouso, o balão volumétrico de 100 mL foi preenchido com água destilada até o menisco ser tangenciado. O balão foi agitado após ter sido vedado com sua tampa e seu conteúdo foi filtrado em papel de filtro inserido no funil acoplado ao Erlenmeyer de 300 mL.

Em etapa subsequente, foram transferidos para o balão de fundo chato de 300 mL, 10 mL de Fehling A, 10 mL de Fehling B, e 40 mL de água destilada. Posteriormente, esta mistura foi aquecida até atingir seu ponto de ebulição, e assim, titulada pela solução filtrada que foi transferida para a bureta de 25 mL. Atingido o ponto de ebulição, ao longo da titulação, a mistura de Fehling foi constantemente

agitada com o auxílio da garra até atingir seu ponto de viragem (formação de resíduo amarelo-tijolo no fundo do balão).

Ao término da análise, os valores foram aplicados na fórmula abaixo:

$$\text{glicídeos redutores em lactose} = \frac{V \times 0,0676 \times 100}{L \times v}$$

Onde:

0,0676 = nº de g de lactose que corresponde a 10 mL da solução de Fehling

v = nº de mL da solução da amostra, gasto na titulação

L = nº de mL da amostra

V = nº de mL da diluição da amostra (100 mL)

4.7.3 Análise quantitativa de bactérias lácticas e leveduras

Foram coletadas duas amostras de Kefir de leite de vaca de dois diferentes lotes. Essas amostras ficaram armazenadas sob refrigeração até o momento das análises, exceto a denominada Tempo 0 (“zero”), correspondente ao momento em que os grãos foram inoculados. A contagem total de bactérias ácido-lácticas viáveis foi procedida conforme metodologia preconizada pela APHA (2001) para bactérias lácticas e AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 2002) para leveduras. As contagens foram obtidas pelo método de plaqueamento em profundidade ou *pour plate*, adicionando-se 1 mL de inóculo em placas de Petri e, em seguida, vertendo-se de 15 a 20 mL do ágar fundido. Foram utilizados os meios de cultura MRS Difco[®], para bactérias lácticas, e Sabouraud Difco[®], para leveduras, e as diluições decimais 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ para obtenção de contagens entre 30 e 300 colônias.

4.7.4 Determinação do pH - Método 017/IV (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985)

Materiais: Potenciômetro

Béquer de 50 mL

Procedimento

Para aferir o pH, foi utilizada uma amostra de aproximadamente 40 mL empregando o método potenciométrico, com o auxílio de um eletrodo GEHAKA[®] GEPH06RBNC, acoplado ao potenciômetro digital PG 1800 GEHAKA[®].

4.7.5 Análise da acidez em ácido láctico para leites fermentados - Método 493/IV (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985)

Materiais: Bureta de 25 mL

Erlenmeyer de 125 mL

Pipeta graduada de 10 mL

Reagentes: Solução de hidróxido de sódio F maia[®] 0,1 M;

Fenolftaleína F maia[®]

Procedimento

Foi adicionada com uma pipeta graduada 10 mL de água destilada, 20 mL da amostra, e 2 gotas da fenolftaleína. Esta solução foi agitada constantemente enquanto era titulada por hidróxido de sódio 0,1 M previamente utilizado para preencher a bureta de 25 mL. A titulação foi concluída ao ser atingida uma coloração rósea (ponto de viragem da fenolftaleína).

Após a conclusão da titulação, a fórmula abaixo foi aplicada:

$$\mathbf{g \text{ de ácido láctico por cento}} \frac{\mathbf{m}}{\mathbf{v}} = \frac{\mathbf{V \times f \times 0,9}}{\mathbf{P}}$$

Onde:

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 da solução de hidróxido de sódio (0,1 M)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do teor de lactose

No estudo, o teor de lactose tem o seu valor reduzido à 3,86% após 857 horas (T₆) conforme exposto na Tabela 2, ou seja, ao final dos 35 dias. A partir deste resultado, é possível afirmar que indivíduos intolerantes à lactose podem consumir o volume diário necessário da bebida, ingerindo 100 mL do Kefir obtido no estudo, uma vez que o consumo diário controlado de produtos derivados do leite, tolerado pelo público alvo, pode apresentar um valor máximo de 12 g de lactose (EGASHIRA, MIZIARA & LEONI, 2008).

Tabela 2 – Valores médios e desvio padrão dos resultados da lactose obtidos em duplicata

Tempo	Horas	MÉDIA (%)	± DP*
T ₀	0	5,03	0,5006
T ₁	17	4,59	0,1481
T ₂	185**	4,34	0,1669
T ₃	353**	4,25	0,2392
T ₄	521**	4,38	0,1169
T ₅	689**	4,08	0,1858
T ₆	857**	3,86	0,0878

*DP: Desvio padrão

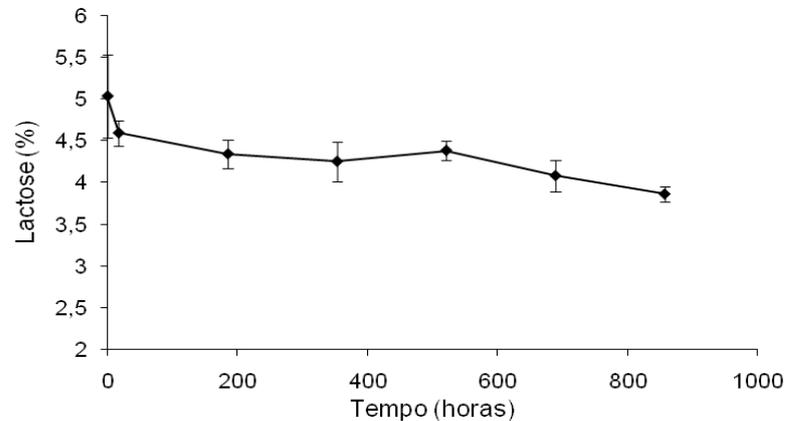
**Amostras mantidas refrigeradas a 5°C

Obs.: Fator utilizado para o cálculo: 0,1352 (justificativas não disponibilizadas pela empresa)

No Gráfico 1 está apresentado o perfil de consumo da lactose pela microflora do Kefir BioLogicus durante 857 horas (35 dias). Nas primeiras 17 horas (T₁) à temperatura ambiente, o consumo foi igual a 8,74%, decrescendo até 23,26% no final do período de armazenamento, em relação ao valor de T₀. A partir do T₁ até o T₆, a concentração de lactose decresceu de 4,59 a 3,86%, ou seja, uma variação de 0,73%, mostrando uma boa estabilidade do produto durante todo o período de armazenamento a 5°C. Isto reflete uma vantagem no que se refere ao longo período de armazenamento pelo consumidor.

Contudo, o estudo de Irigoyen e colaboradores (2005), ao testar diferentes concentrações de grãos de kefir e leite, demonstraram uma diminuição nos teores de lactose de até 22% em apenas 24 horas em relação à concentração inicial. Após o período de fermentação, a concentração permaneceu nesta faixa até o 14º dia de armazenamento a 5°C, temperatura na qual o estudo vigente também comprova uma maior estabilidade na atividade metabólica dos micro-organismos.

Gráfico 1 – Determinação da porcentagem de lactose em função do tempo



Pesquisas como a de Wechenfelder (2009), também foram avaliadas sob outros tipos de condições, onde o foco era voltado para a utilização de Kefir oriundo de quatro populações diferentes, submetidas a concentrações de grãos/leite distintas. Como resultado, foi visto que para as 4 diferentes amostras contendo as proporções de 1:10 e 1:5 de concentração de grão/leite, após 168 h de fermentação, tiveram uma redução de até 64 e 70% de lactose, respectivamente. Desta maneira, ocorreu uma diminuição bastante considerável da concentração de lactose, reafirmando que a concentração de inóculo presente, influencia na taxa de consumo do açúcar.

Em outro estudo, realizado por Terra (2007), utilizando um inóculo a 8% foi observada uma concentração de 3,02 e 1,1% de lactose no Kefir integral após 12 e 72 horas de fermentação, respectivamente, à temperatura na faixa de 24 a 29°C. O autor conclui que após 24 h de fermentação o kefir já apresenta uma concentração do dissacarídeo que se ingerido por indivíduos intolerantes a lactose não causará os desconfortos característicos da problemática.

Apesar de algumas diferenças entre os resultados do estudo e os obtidos na literatura, é importante ressaltar que os procedimentos adotados foram aqueles descritos pela empresa. Até o presente momento, estes processos fornecem ao Kefir BioLogicus uma boa aceitabilidade em função das características sensoriais obtidas pelo desenvolvimento dos cultivos.

5.2 Análise quantitativa de micro-organismos

5.2.1 Bactérias ácido-lácticas

No que diz respeito às bactérias lácticas, segundo à Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007, o MAPA especifica, respaldado pela Norma FIL 117A:1998, que ao longo do seu prazo de validade, o Kefir deve apresentar um quantitativo total mínimo de 10^7 UFC/mL (BRASIL, 2007).

O cumprimento desta norma pode ser contemplado na Tabela 3, onde a contagem inicial (imediatamente após introdução do consórcio probiótico) já foi da ordem de 10^6 UFC/mL (6,45 log UFC/mL), cujo comportamento logo aumentou para um valor que se manteve em 10^8 UFC/mL (8,92 a 8,64 log UFC/mL) durante todo o período estudado.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão dos resultados de bactérias lácticas obtidos em duplicata

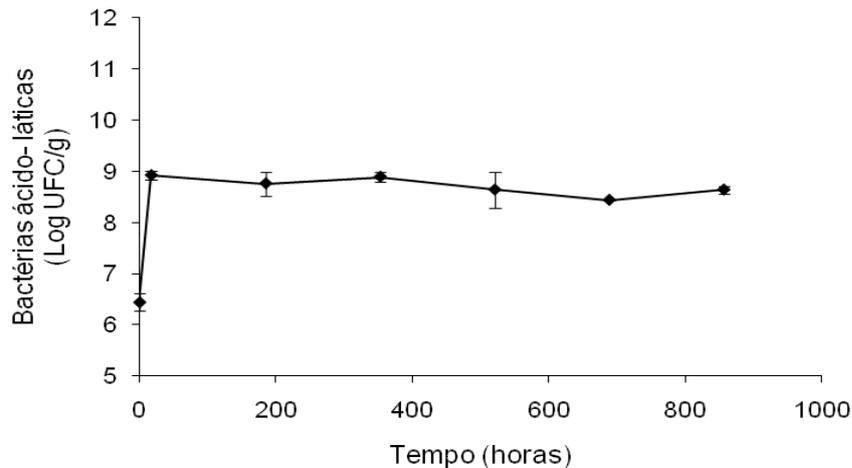
Tempo	Horas	MÉDIA (log)	± DP*
T ₀	0	6,45	0,1713
T ₁	17	8,92	0,0850
T ₂	185**	8,76	0,2364
T ₃	353**	8,89	0,0912
T ₄	521**	8,64	0,3471
T ₅	689**	8,44	0,0133
T ₆	857**	8,64	0,0766

*DP: Desvio padrão

**Amostras mantidas refrigeradas a 5°C

Portanto, vale ressaltar que, mesmo antes do processo de armazenamento em câmara fria, a bebida fermentada a base de Kefir BioLogicus® atingiu e ultrapassou o valor mínimo exigido (10^7 UFC/mL). Além disto, as bactérias alcançaram a concentração máxima nas 17 horas de fermentação em temperatura ambiente (Gráfico 2), onde, a contagem de 8,92 log UFC/mL foi atingida, assim se aproximando do valor de 10^9 UFC/mL. Após este período, a alteração da temperatura para 5°C fez com que a microflora láctica fosse mantida aproximadamente constante até 857 horas de fabricação do produto.

Comparativamente, Rea e colaboradores (1996), alcançaram uma contagem inicial e final do cultivo da bactéria láctica *Lactococcus* de 10^3 a 10^9 UFC/mL, respectivamente, necessitando utilizar período fermentativo superior (58 horas) ao do estudo em questão, que em 17 horas de incubação já atingiu valor próximo a 10^9 UFC/mL.

Gráfico 2 – Análise quantitativa de bactérias ácido-láticas em função do tempo

5.2.2 Leveduras

Segundo a mesma instrução normativa do MAPA apresentada para bactérias lácticas, as leveduras são encontradas em menor quantidade (mínimo de 10^4 UFC/mL, segundo a Norma FIL 94A:1990) no Kefir (BRASIL, 2007). Esta quantidade mínima estabelecida foi superada pelos valores obtidos no estudo (Tabela 4), uma vez que a quantidade de células ao final do cultivo atingiu o valor médio de 6,16 log UFC/mL. Neste mesmo período foi observado um aumento de 47,25% de células em relação ao inóculo inicial, sendo que 36% foi observado apenas nas primeiras 17 horas.

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão dos resultados de leveduras obtidos em duplicata

Tempo	Horas	MÉDIA (log UFC/mL)	± DP*
T ₀	0	4,19	0,3891
T ₁	17	5,70	0,1596
T ₂	185**	5,78	0,1103
T ₃	353**	5,80	0,0845
T ₄	521**	6,40	0,8837
T ₅	689**	5,99	0,1261
T ₆	857**	6,17	0,1766

*DP: Desvio padrão

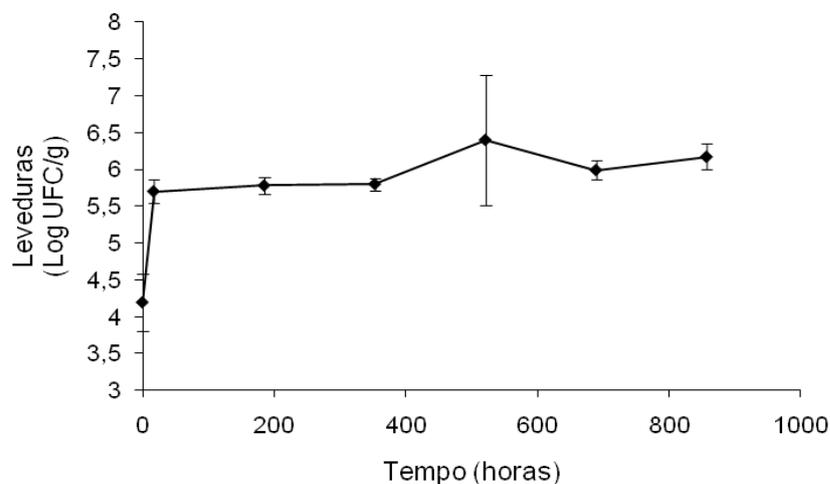
**Amostras mantidas refrigeradas à 5°C

Como pode se observar na curva de dispersão (Gráfico 3), a concentração de leveduras se manteve dentro dos padrões estabelecidos pelo MAPA. No Tempo 0, logo após a inoculação do leite, já é apresentada uma contagem mínima aceitável, tendo o crescimento atingido o seu ponto máximo na ordem de 10^7 (6,40 log UFC/mL) ao se atingir 521 horas de fermentação. A contagem de leveduras se

estabilizou em 10^6 UFC/mL, correspondente a 5,99 log UFC/mL e 6,17 log UFC/mL, respectivamente, ao se alcançar 689 e 857 horas de fermentação, mantendo o valor superior ao preconizado pelo MAPA.

Comparativamente, Rea e colaboradores (1996), obtiveram uma concentração de leveduras de 10^3 a 10^6 UFC/mL, para um período superior de incubação (58 horas), que também obedeceria à instrução normativa do MAPA.

Gráfico 3 – Análise quantitativa de leveduras em função do tempo



5.3 Análise do pH e da acidez

Segundo Franco & Landgraf (1996), a redução do pH, atingindo um valor desejável, permite a inibição do desenvolvimento de micro-organismos patogênicos resistentes ao tratamento térmico da matéria-prima (o leite), podendo provocar alterações no prazo de validade do produto.

O valor de pH obtido no final do processo fermentativo (4,5) também foi alcançado por Rea e colaboradores (1996) e Martins (2006) em seus trabalhos. Os resultados (Tabela 5 e Gráfico 4), permitem concluir que a variação do pH e da acidez foi significativa apenas nas primeiras 17 horas devido a atividade dos micro-organismos a temperatura ambiente, quando converte lactose a ácido-láctico. A estagnação da atividade (Gráfico 4) devido ao resfriamento, fez com que não houvesse variação significativa dos valores de pH e acidez.

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão dos resultados de pH e acidez obtidos em duplicata

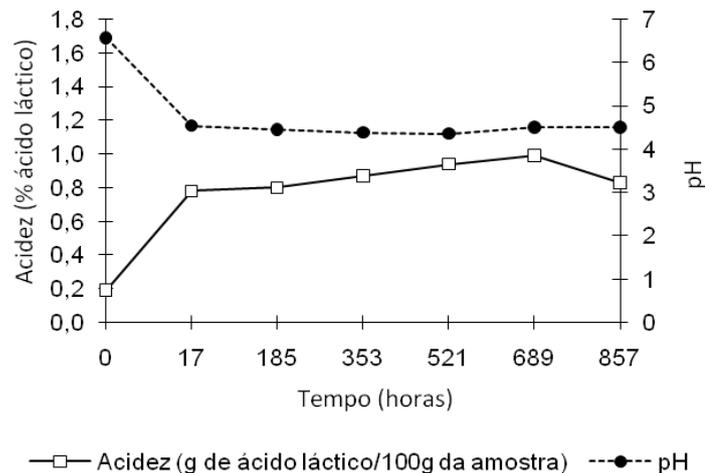
Tempo	Horas	pH (MÉDIA)	pH (\pm DP)	Acidez (MÉDIA %)	Acidez (\pm DP*)
T ₀	0	6,57	0,0692	0,19	0,0144
T ₁	17	4,54	0,0127	0,78	0,0322
T ₂	185**	4,45	0,0718	0,80	0,0750
T ₃	353**	4,38	0,0432	0,87	0,0118
T ₄	521**	4,36	0,1664	0,94	0,0567
T ₅	689**	4,50	0,1884	0,99	0,1164
T ₆	857**	4,50	0	0,83	0,0463

*DP: Desvio padrão

**Amostras mantidas refrigeradas a 5°C

Similarmente, os resultados de Terra (2007) apresentaram valores para o pH do leite *in natura* igual a 6,7. Após 12 horas de fermentação, pH igual a 4,5 e após 72 horas atingiu um valor igual a 3,3.

De acordo com o Padrão de Identidade e Qualidade do MAPA, a Norma FIL 150:1991 estabelece que o Kefir deve apresentar uma acidez menor que 1 g de ácido láctico/100g (BRASIL, 2007), o que é alcançado através da estratégia adotada neste estudo, conforme resultados apresentados no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Análise do pH e da acidez em função do tempo

6 CONCLUSÕES

No processo fermentativo adotado neste trabalho, foi possível observar a diminuição do pH, sugerindo a degradação de lactose a ácido láctico pela microflora do Kefir. Esta permitiu a redução da concentração do açúcar a um nível inferior ao máximo tolerado pela maioria dos intolerantes à lactose que são 12 gramas por dia. A otimização do consumo da lactose foi possível graças a manutenção da viabilidade probiótica do Kefir BioLogicus[®], que ao longo de todo o estudo apresentou contagens superiores ao mínimo estabelecido pela Normativa vigente, tanto para bactérias ácido-lácticas, quanto para leveduras.

Além disso, os valores de acidez também estiveram dentro do preconizado pela Normativa superando os valores mínimos estabelecidos especificamente para o Kefir. Portanto, a partir deste estudo, foi possível confirmar que o Kefir BioLogicus[®] consegue reduzir o teor de lactose do produto.

7 REFERÊNCIAS

ADOLFSSON, O.; MEYDANI, S. N.; RUSSEL, R. M. Yogurt and gut function. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 80, n. 2, p. 245-256, Aug. 2004.

ABLV - Associação Brasileira de Leite Longa Vida. **Leites especiais**. 2008. Disponível em: <<http://www.ablv.org.br/9-SaudeBemEstar-Leite-Longa-Vida-com-baixo-teor-de-lactose.aspx>> Acesso em: 20 de mai. 2011.

ALM, L. Effect of fermentation on L(+) and D(-) lactic acid in milk. **Journal of Dairy Science, Champaign**, v. 65, n. 4, p. 515-520, Apr. 1982.

ANAR, S. Kefir and its properties: Kefir ve ozellikleri. **Journal Veteriner Fakültesi Dergisi**, Turkey, v. 19, n. 1/2, p. 137-140, 2000.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis: Methods AOAC**, 2002 (997.02).

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. cap. 47, 4. ed., 490 p. Washington, 2001.

BALDO, L. **Convivendo em harmonia com a intolerância à lactose, outras intolerâncias e alergias alimentares**. Sem lactose. 2008. Disponível em: <<http://www.sem lactose.com/index.php/2008/03/09/leites-com-baixo-teor-de-lactose/>>. Acesso em: 20 mai. 2011.

BATAVO. **Leite Batavo Sensy baixa lactose**. 2004. 2p. Publicidade.

BIOLOGICUS®. **Histórico da empresa**. 2010. Disponível em: <<http://www.biologicus.com.br/page27.html?Institucional=historia.html>>. Acesso em: 01 dez. 2010

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. **Introdução à química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003. 238 p.

BORGES, M. T. M. R.; PARAZZI, C.; PIEDADE, S. M. D. S. Avaliação de Métodos Químicos de Determinação de Açúcares Redutores em Xaropes. In: IV Congresso Nacional de STAB. VIII Convenção da ACTALAC. 1987, Olinda-PE. **Anais...** Olinda, novembro de 1987.

BORGES, T. *et al.* Quanta lactose há no meu iogurte? *Acta Pediátria Portuguesa*, Lisboa, v.41, n.2, p.75-78, Mar. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: Sistema de Legislação Agrícola Federal. **Resolução nº 5**, de 13 de novembro de 2000. Anexo - Padrões de identidade e qualidade de leites fermentados. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3285>>. Acesso em: 18 nov. 2010

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 2, de 07 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados, com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_allega.htm>. Acesso em: 04 nov. 2010.

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. Brasília, 2007. 15 p. Disponível em: <http://www.cidasc.sc.gov.br/html/servico_animal/Inspecao%20Animal/ORIENTA%C7%D5ES%20SOBRE%20ROTULAGEM/LEITE%20E%20DERIVADOS/IN%2046_07_RTIQ%20leites%20fermentados.pdf>. Acesso em: 10 mai. 2011.

CANO, C. B.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. Análise de padrões de carboidratos normalmente encontrados no mel por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - Parte I. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos. **Anais...** Rio de Janeiro: SBCTA, 1998.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 45, n. 1, p. 61-84, 2005.

CLEMENTI, F.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production. **Milchwissenschaft**, Kempten, v. 44, n. 2, p. 70-74, 1989.

Codex Alimentarius. **Codex standard for fermented milks**. CODEX STAN 243. 2003. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf>. Acesso em: 08 nov. 2010.

DE VRESE, M. *et al.* Probiotics-compensation for lactase insufficiency. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 421-429, Feb. 2001.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method form Determination of Sugars and Related Substances. **Nature**, Minnesota, v. 28, n. 3, p. 350, 1956.

DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W. A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 75, n. 5, p. 789-808, May. 2002. Disponível em: <<http://www.ajcn.org/content/75/5/789.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 mai. 2011.

DUNKER, L. L. D; ALVARENGA, M.; MORIEL, P. Grupo do leite, queijo e iogurte. In: PHILIPPI, S. T. **Pirâmide dos alimentos: Fundamentos básicos da nutrição**. 1. ed. São Paulo: Barueri, 2008. cap. 4, p. 99-165.

DURING, M. J. *et al.* Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. New York. **Nature Medicine**, v.4, n.10, p.1131-1135, Oct. 1998.

EGASHIRA, E. M.; MIZIARA, A. P. B.; LEONI, L. A. B. Grupo do arroz, pão, massa, batata e mandioca. In: PHILIPPI, S. T. **Pirâmide dos alimentos: Fundamentos básicos da nutrição**. 1. ed. São Paulo: Barueri, 2008. cap. 2, p. 31-67.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria**. Córdoba, 2001. 34 p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso em: 10 mai 2011.

FARNWORTH, E. R. Kefir: From folklore to regulatory approval. **Journal of Nutraceuticals, Functional and Medical Foods**, Haworth, v. 1, n. 4, p. 57-68, 1999.

FARNWORTH, E. R., editor. **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, 2003, 390 p.

FARNWORTH, E. R.; MAINVILLE, I. Kefir: a fermented milk product. *In*: FARNWORTH, E. R. **Handbook of fermented functional foods**, 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2003. cap. 04, p. 77-111.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BESHKOVA, D. M.; SIMOV, Z. I. Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tubingen, v. 57; n. 9-10, p. 805-10, set./out. 2002.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 63, n. 3, p. 364-369, Mar. 2000.

GOURSAUD, J. O leite de vaca: composição e propriedades físico-químicas. *In*: LUQUET, F. M. (Ed.) **O leite: do úbere à fábrica de laticínios**. Portugal: Publicações Europa-America Ltda, 1985, v. 1, parte 1, cap. 1, p. 31-56.

HALLÉ, C. *et al.* Les kéfirs: Des associations bactéries lactique-levures. *In*: ROISSART, H. de; LUQUET, F. M. **Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques**. Uriage: France, p. 169-182, 1994.

HERTZLER, S. R; HUYNH, B. C.; SAVAIANO, D. A. *et al.* How much lactose is low lactose? **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 96, n. 3, p. 243-246, mar.1996.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 103, n. 5, p. 582-587, May. 2003.

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

IRIGOYEN, A. *et al.* Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage, **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 4, p. 613-620, May 2005.

KEITH, J. N. M. D. *et al.* The Prevalence of Self-reported Lactose Intolerance and the Consumption of Dairy Foods Among African American Adults Are Less Than Expected. **Journal of the National Medical Association**, New York, v. 103, n. 1, Jan. 2011.

KOROLEVA, N. S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeasts. *In*: Robinson, R. K., (Ed.) **Therapeutic properties of fermented milks**. London: Elsevier Applied Sciences, 1991, p. 159-179.

KOROLEVA, N. S. Starters for fermented milks, section 4: Kefir and kumys starters. **Bulletin of the International Dairy Federation**. v. 227, cap. II, p. 35-40, 1988.

KOSIKOWSKI, F. V.; MISTRY, V. V. **Cheese and fermented milk foods**. 3. ed. Wesport: F. V. Kosikowski LLC, 1997. 1058 p.

KWAK, H. S., PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of kefir with a non lactose-fermenting yeast. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 937-942, Jun. 1996.

LA RIVIÈRE, J. W. M.; KOOIMAN, P.; SCHMIDT, K. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. **Archiv für Mikrobiologie**, Berlin, v. 59, n. 1-3, p. 269-278, Apr. 1967.

LANE, J.H.; EYNON, L. Determination of reducing sugar by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. **Journal of the Society of Chemical Industry**, London, v. 42, p. 32-37, 1923.

LOMER, M. C.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. **Alimentary, Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 93-103, Oct. 2007.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. 1280 p.

MARTINS, F. S. *et al.* Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 5, n. 2, 2º semestre 2005.

MARTINS, L. S. P. **Monitoramento da Produção de Ácidos Orgânicos em Amostras de Leite Fermentado pelos Grãos de Kefir e do Tibet Utilizando Técnicas Voltimétricas e HPLC**. 2006. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

MATISSEK, T.; SHNEPEL, F.M.; STEINER, G. **Análisis de los Alimentos: Fundamentos, métodos, aplicaciones**. 1 ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1998. 430 p.

MILLER, G. D.; JARVIS, J. K., McBEAN, L. D. **Handbook of Dairy Foods and Nutrition**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007. 407 p.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOORE, W. E. C.; HOLDEMAN, L. V. Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. **Applied Microbiology**, Virginia, v. 27, n. 5, p. 961-979, May. 1974.

NELSON, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 300, n. 1, p. 57-62, Jan. 2010.

PARVEZ, K. A. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 1171-1185, Jun. 2006.

PEREDA, J. A. O. et al. **Tecnologia de alimentos: Componentes dos Alimentos e Processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.

PEREIRA, A. S. **Malabsorção de lactose do adulto em uma população brasileira**. 1981. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina). Faculdade de Ciências Médicas, Unicamp, São Paulo, SP, 1981.

PHILIPPI, S. T. **Nutrição e técnica dietética**. 2. ed. Barueri: Manole, 2006. 402 p.

PIARD, J. C. *et al.* Especial Bactérias Lácticas: As bactérias no centro dos novos desafios tecnológicos. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento** - Encarte Especial, Brasília, v. 2, n. 8, p. 80-84, Mai/Jun 1999. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio08/bacteria.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2011.

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

REIS, J. C. *et al.* Teste do H₂ no ar expirado na avaliação de absorção de lactose e sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado de escolares. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 169-176. Out./Dez. 1999.

ROBERFROID, M. B. Prebiotics: preferential substrates for specific germs? **The American Journal of Clinical Nutrition**, Houston, v. 73, p. 406-409, 2001.

SAHI, T. Hypolactasia and lactase Persistence. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, Oslo, v. 29, n. 202, p.1-6, 1994.

SALOFF-COSTE, C. J. Kefir. Nutricional and health benefits of yoghurt and fermented milks. **Danone World Newsletter**. França, n. 11. p. 1-7, 1996

SANDERS, L. M.; LUPTON, J. R. Carbohydrates *In*: Bowman, B. A.; Russell, R. M. (Ed.) **Present Knowledge in Nutrition**, 8. ed., Boca Raton: Taylor & Francis/CRC Press, 2006. cap. 06, p. 78-89.

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

SHILLS, M. E. *et al.* **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9ª ed. Barueri, SP: Manole, 2003. 2256 p.

SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Normal alimentary tract microflora. *In*: BLASER, M. J. *et al.* (Ed.) **Infections of the Gastrointestinal Tract**. New York: Raven Press, 1995. p. 53-64.

SIMOVA, E. *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Houndmills, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2002.

SPENCER, G. L.; MEADE, G. P. **Special Reagents. Cane Sugar Handbook**, New York, Wiley, 1945.

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, 2003. cap. 2, p. 27-58.

SUAREZ, F. L. *et al.* Tolerance to the daily ingestion of two cups of milk by individuals claiming lactose intolerance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 65, n. 5, p. 1502-1506, May. 1997.

SUENAGA, C. I. *et al.* **Intolerância à lactose**. Disponível em: <<http://www.virtual.epm.br/material/tis/curr-bio/trab2001/grupo1/intolerancia.htm>>. Acesso em: 01 mai. 2011.

TAMIME, A. Y.; MUIR, D. D.; WSZOLEK, M. Kefir, koumiss and kishk. **Dairy Industries International**, Wilmington, v. 64, n. 5, p. 32-33, 1999.

TERRA, M. F. **Teor de lactose em leites fermentados por grãos de Kefir**. 2007. 48 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Tecnologia dos alimentos) – Centro de excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

TIETZE, H. W. **Kefir for pleasure, beauty and well-being**. Australia: Phree Books, 1996. p. 90-100.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. Rio Grande do Sul: UFSM, 1997. 166 p.

US Department of Agriculture (USDA). **Dietary Guidelines for Americans**. 6. ed. Washington DC: US Government Printing Office; 2005. Disponível em: <<http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2005/document/pdf/dga2005.pdf>>. Acesso em: 03 mai. 2011.

VAUGHAN, E. E. *et al.* A molecular view of the intestinal ecosystem. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, Norfolk, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2000.

VILJOEN, B. C. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. **Internacional Journal of Food Microbiological**, Amsterdam, v. 69, n. 1-2, p. 37-44, Sep. 2001.

VILLELA, G. G., BACILA, M.; TASTALDI, H. **Técnicas e Experimentos de Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973. 552 p.

VINDEROLA, C. G.; MOCCHIUTTI, P.; REINHEIMER, J. A. Interactions among lactic acid starter and probiotic bacteria used for fermented dairy products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 4, p. 721-729, Apr. 2002.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

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

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

ANEXO

HISTÓRICO DA EMPRESA BIOLOGICUS – INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS NATURAIS S/A.

A BioLogicus® foi constituída em 2004, tendo como objetivo aglutinar pesquisadores de diferentes áreas do conhecimento para o desenvolvimento de produtos e processos inovadores na área de biotecnologia. O critério para inclusão dos pesquisadores é que os seus projetos tenham como princípio a inovação biotecnológica e o absoluto respeito ao meio ambiente.

Em 2005, a empresa implantou o primeiro laboratório piloto de pesquisa em probióticos, contando com a parceria da Secretaria de Saúde do município de Camaragibe – PE. Nessa experiência inicial, foram selecionadas várias patologias de grande incidência nas comunidades carentes e desenvolvidos alguns produtos específicos, a base de substâncias bioativas procedentes de um consórcio de microrganismos de propriedade da empresa, denominado Kefir BioLogicus®. Os produtos desenvolvidos foram testados clinicamente e apresentaram resultados importantes.

Em 2006, a empresa foi incubada no Programa de Empresas de Base Tecnológica do Instituto de Tecnologia de Pernambuco – ITEP, onde recebeu treinamento e qualificação, especialmente na área empresarial. Em 2007 a empresa participou de uma competição nacional - Programa Empreender é Show da ANPROTEC - sendo selecionada entre as três empresas incubadas mais inovadoras do país. Na referida competição recebeu os prêmios de: Melhor Estudo de Viabilidade Técnica das Empresas Incubadas; Empresa mais Inovadora e Empreendedora das Empresas Incubadas; e Empresa mais Votada pelos Visitantes do Site da ANPROTEC.

Em 2008 foi selecionada pelo Governo do Estado de Pernambuco para participar do “stand” do Governo como modelo de inovação em biotecnologia durante um evento nacional denominado Tecnoláctea 2008. Outros avanços importantes em 2008 foram:

- Participação no Bitech 2008 - Programa de Iniciação Científica e Tecnológica para Micro e Pequenas Empresas – uma iniciativa de cooperação entre o INSTITUTO EUVALDO LODI - IEL, o SENAI, o SEBRAE e o CNPq, que tem por objetivo transferir conhecimentos gerados nas instituições de ensino diretamente para o setor produtivo. PROJETO APROVADO: ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DE MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS E COMPETIDORES EM BEBIDAS FERMENTADAS
- Convênio de cooperação técnica e financeira de apoio a micro e pequenas empresas do estado de Pernambuco Sebrae/PE e o Instituto de Tecnologia de Pernambuco – ITEP, sendo uma das 04 empresas selecionadas e beneficiadas.
- Projeto aprovado pela FINEP – Progex – para subvenção ao desenvolvimento de embalagens para exportação.
- Convênio com as seguintes instituições: Universidade Federal de Pernambuco; Centro de Investigación Pesquera (Cuba); Genetech - empresa de pesquisa em genética de microorganismos; VPO indústria de perfumes e cosméticos e ITEP.

Em 2009 foi convidada pelo ITEP para coordenar o primeiro laboratório de probióticos do país, Laboratório de Probióticos e Fitoterápicos – LPF. Nesse mesmo ano teve os seguintes projetos aprovados:

- RHAE/FAPs FACEPE 2009 - pesquisador na empresa – “Desenvolvimento de microcápsulas Probióticas para adição em alimentos e bebidas”.
- BITEC 2009 9ª EDIÇÃO: “Desenvolvimento de pastilhas nutracêuticas com probióticos do Kefir BioLogicus®”.
- SEBRAE 2009 - PROMOÇÃO DE EMPREENDIMENTOS INOVADORES DO SEBRAE NACIONAL;

- PAPPE/FACEPE – SUBVENÇÃO ECONÔMICA: “Imobilizado de um consórcio probiótico para produção de bebidas fermentadas de alto valor nutricional e isentas de álcool”.
- SUBVENÇÃO ECONÔMICA/FINEP 2009 – “Desenvolvimento de linha dermocosmética natural probiótica”.
- FINEP/CAPES - Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD): “Imobilizado de um consórcio probiótico para produção de bebidas fermentadas de alto valor nutricional e isentas de álcool”.
- Integra o PROGEX com o Núcleo Operacional de Pernambuco.

Em dezembro de 2009 o Projeto “Desenvolvimento de pastilhas nutracêuticas com probióticos do Kefir BioLogicus®” foi selecionado como um caso de sucesso no Estado de Pernambuco.

No início de 2010, a BioLogicus® foi aprovada pelo FUNDO CRIATEC/BNDES/BNB recebendo aporte financeiro para cooperação administrativo-financeira e com isso se tornando uma Sociedade Anônima (SA).

Em 2011 a BioLogicus contratou um Diretor Executivo e um Financeiro, com objetivo de operacionalizar os setores de negócios, comercial, marketing e Financeiro, respectivamente, bem como estruturou o departamento de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P,D&I) com a contratação de novos pesquisadores e aprovação de novos editais de pesquisa junto aos órgãos de Fomento estaduais (FACEPE, SEBRAE) e Nacionais (CNPq).