



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
ALIMENTOS

PRODUÇÃO DO QUEFIR COM POLPA DE
GRAVIOLA (*ANONA MURICATA*) E AVALIAÇÃO DAS
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS,
FISICO-QUÍMICAS E DE SUA ACEITABILIDADE

LUCIANA SILVA ROCHA CONTIM

MANAUS
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

LUCIANA SILVA ROCHA CONTIM

PRODUÇÃO DO QUEFIR COM POLPA DE GRAVIOLA
(*ANONA MURICATA*) E AVALIAÇÃO DAS
CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS,
FISICO-QUÍMICAS E DE SUA ACEITABILIDADE

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência de Alimentos da
Universidade Federal do
Amazonas, como requisito
parcial para obtenção do título
de Mestre em Ciência de
Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Ila Maria de Aguiar Oliveira

MANAUS
2007

LUCIANA SILVA ROCHA CONTIM

PRODUÇÃO DO QUEFIR COM POLPA DE GRAVIOLA E
AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS,
FÍSICO-QUÍMICAS E DE SUA ACEITABILIDADE

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Ciência de Alimentos

Aprovado em 16 de fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Ila Maria de Aguiar Oliveira, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Profª Drª Ângela Líbia de Melo Pereira Cardoso, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Takeshi Matsuura, Membro
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Alaerte e Joana;
Ao meu esposo Luis;
A meus filhos Ana Luisa,
Marilia e Davi

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida

A minha mãe por todo incentivo nos momentos mais difíceis

A meu esposo Luis pelo apoio, incentivo, compreensão e amor dedicado

A Prof^a Dr^a Ila Maria de Aguiar Oliveira pela disponibilidade, convivência, apoio e constante orientação

As professoras Cíntia Tereza e Marlene pelo apoio e convivência diária

Ao professor José Cardoso Neto pela análise estatística

As minhas amigas Alcinira, Izabela e Jovana que contribuíram para o êxito deste trabalho

A funcionária auxiliar de serviços gerais Railene por toda ajuda prestada

A Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade de realização do curso

A FAPEAM pelo incentivo financeiro

A todos os professores deste programa de Pós-Graduação pelo incentivo

RESUMO

Quefir é um produto obtido através da fermentação do leite com os grãos de quefir e de culturas preparadas a partir dos grãos. Nestes grãos, (matriz polissacarídica), bactérias lácticas e leveduras vivem em simbiose e promovem dupla fermentação: láctica e alcoólica. Apesar de pouco conhecida, o quefir é uma bebida bem antiga, originada das montanhas caucasianas. Muitos estudos têm investigado seu valor nutricional e bioterapêutico. Entre as suas qualidades funcionais podem ser citados: alívio de distúrbios intestinais, ação antibacteriana e anticarcinogênica, ação hipocolesterolêmica entre outras. A graviola é uma fruta bem aceita e conhecida na região amazônica sendo produzida em quase todo ano, facilitando com isto sua obtenção. Tendo em vista as qualidades do quefir e buscando o aproveitamento de frutos da região amazônica, foi produzida uma bebida de quefir com polpa de graviola e suas características microbiológicas, físico-químicas foram avaliadas durante o período de estocagem sob refrigeração assim como a sua aceitabilidade. O quefir foi produzido com 5% de grãos como inóculo e a fermentação foi dividida em duas etapas; a primeira a 25°C por 24 horas e a segunda a 7°C por 24 horas. Foram produzidos dois tipos de bebidas: quefir natural (controle) e o quefir com 15% de polpa de graviola e 12% de açúcar. As bebidas foram armazenadas, em recipientes de vidro com tampa rosqueáveis previamente esterilizados, sob refrigeração em geladeiras comerciais com temperatura aproximada de 7°C e as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de estocagem. O teste de aceitabilidade foi realizado no tempo zero de estocagem. Os principais grupos de microrganismos presentes no quefir: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, leveduras e bactérias acéticas foram quantificados em meios de cultura específicos e o número observado foi similar para todos os grupos, em torno de 10^9 ufc/g e ao final de 28 dias de estocagem decaíram para cerca de 10^7 ufc/g. Verificou-se que a adição de polpa de fruta e açúcar ao quefir natural não influenciou no comportamento de sua microbiota analisada. Bactérias lácticas foram isoladas dos grãos de quefir sendo os 9 isolados caracterizados como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Os valores de pH não variaram significativamente durante 21 dias de estocagem, aumentado significativamente somente com 28 dias de estocagem sob refrigeração. A acidez (% de ácido láctico) aumentou progressivamente durante o tempo de armazenagem não havendo, no entanto interação significativa entre os valores de acidez observados para o quefir natural e o quefir com polpa de graviola. Análise sensorial do quefir com polpa de graviola revelou uma aceitabilidade muito boa a excelente.

Palavras-chave: quefir, alimentos funcionais, frutas da Amazônia, leite fermentado, bactérias lácticas

ABSTRACTS

Kefir is a product of milk fermentation with kefir grains and cultures prepared from grains. In these grains (polysaccharide matrix), lactic bacteria and yeasts live in symbiosis and they perform alcoholic and lactic fermentation. Kefir is an old beverage originated from Caucasians Mountains. Many studies have investigated its nutritional and biotherapeutic benefits. Among its functional qualities it can be cited: relieve all intestinal disorders, antibacterial and antitumoral action, hypocholesterolemic action and others. Graviola is a well known and accepted fruit in the Amazon region. It has been produced almost through the year, which becomes easily available. Because of its qualities and searching utilization of amazon fruits, a kefir beverage was produced with graviola pulp. Its microbiological and physic-chemical characteristics were evaluated during the period of refrigerator, as well as its acceptability. Kefir was produced with 5% of grains as starter-cultures and the fermentation was divided in two stages: the first one at 25°C for 24 hours and the second one at 7°C for 24 hours. Two types of beverages were produced: a natural kefir (control) and a kefir with adde 15% of graviola pulp and 12% of sugar. These beverages were placed on glass jars with metal lid, previously sterilized and kept by refrigeration storage in commercial refrigerators at about 7°C temperature. The microbiological and physic-chemical analyses were carried out at 0, 7, 14, 21 and 28 days of storage. The acceptability test was made at 0 time of storage. The main groups of microorganisms presented in kefir were *Lactobacillus*, *Lactococcus*, yeast and acetic bacteria quantified in specific broth. The total number of microorganisms was similar for all groups, around 10⁹ cfu/g. After 28 days of storage it was reduced to 10⁷ cfu/g. It was verified that the addition of graviola pulp and sugar in natural kefir did not influence the behavior of its microbiota. Lactic bacterias were isolated from kefir grains and 9 bacteria were characterized as *Lactococcus lactis* subps. *lactis*. The pH did not vary significantly during 21 days of storage. The pH increased significantly with 28 days of storage under refrigeration. The acidity (% of acid lactic) increased gradually during the storage period. However, there was not significant interaction among the acidity values on natural kefir and kefir with graviola pulp. The sensorial analyzes of kefir with graviola pulp showed score acceptability from good to excellent.

Wordkey: kefir, functional foods, amazon fruits, fermented milk, lactic bacteria

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Grãos de quefir.....	25
Figura 2	Micrografia eletrônica de grãos de quefir.....	28
Figura 3	Colônias características de bactérias lácticas crescidas em ágar MRS.....	42
Figura 4	Ficha de resposta para o teste de aceitação.....	48
Figura 5	Perfil bioquímico do isolado IGQ20 apresentado no Kit API CHL50.....	53
Figura 6	Contagem de <i>Lactobacillus</i> (A), <i>Lactococcus</i> (B), Leveduras (C) e bactérias acéticas (D) durante o período de estocagem.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características físico-químicas da polpa congelada de graviola.....	39
Tabela 2	Características dos isolados dos grãos de quefir, quanto à morfologia, coloração de Gram e teste da catalase	50
Tabela 3	Perfil da fermentação de carboidratos de bactérias lácticas, após 48 horas de incubação, em Kit API CHL50.....	52
Tabela 4	Classificação dos isolados de <i>Lactococcus</i> pela análise do perfil de fermentação de carboidratos.....	54
Tabela 5	Comparação do metabolismo de carboidratos de estirpes de <i>Lactococcus</i>	55
Tabela 6	Composição química e energética do quefir natural e do quefir com polpa de graviola.....	61
Tabela 7	Valores de pH durante o tempo (dias) de estocagem refrigerada.....	63
Tabela 8	Valores da acidez titulável (% de ácido láctico) durante o tempo (dias) de estocagem refrigerada do controle e da bebida.....	64
Tabela 9	Teste de aceitação do quefir com polpa de graviola.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Descrição do quefir pela Codex Alimentarius.....	22
Quadro 2	Contagem de microrganismos específicos requeridos durante o período de validade de leites fermentados.....	29
Quadro 3	Requisitos físico-químicos para os leites fermentados.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
pH	Potencial hidrogeniônico
ufc	Unidade formadora de colônias
mL	Mililitro
g	Gramas
min.	Mínimo
%	Porcento
l	Litro
Nº	Número
v	Volume
m	Massa
CCL ₄	Tetracloro de carbono
cm	Centímetro
°Brix	Graus Brix
mg	Miligramas

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	13
2 - OBJETIVOS.....	15
2.1 - Geral.....	15
2.2 - Específicos.....	15
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 - Alimentos funcionais.....	16
3.2 - Produtos lácteos fermentados e seus benefícios à saúde.....	19
3.3 - Quefir.....	21
3.3.1 - Grãos de quefir.....	24
3.3.2 - Microbiologia do quefir e dos seus grãos.....	26
3.3.3 - Características físico-químicas do quefir e de seus grãos.....	29
3.3.4 - Aspectos nutricionais e bioterapêuticos.....	32
3.3.5 - Propriedades anti-microbianas.....	35
3.3.6 - Outros usos dos grãos de quefir.....	37
3.4 - Graviola.....	38
4 - METODOLOGIA.....	40
4.1 - Origem e manutenção dos grãos de quefir.....	40
4.2 - Produção do quefir com polpa de graviola.....	40
4.3 - Análises microbiológicas do quefir.....	41
4.4 - Isolamento das bactérias lácticas dos grãos de quefir.....	41
4.5 - Caracterização dos isolados por perfil de fermentação de carboidratos.....	43
4.5.1 - Preparo do inóculo.....	43
4.5.2 - Ajuste do inóculo.....	43
4.5.3 - Inoculação e incubação.....	44
4.6 - Análises físico-químicas do quefir.....	44
4.6.1 - Determinação do pH.....	44
4.6.2 - Acidez titulável.....	45
4.6.3 - Determinação do teor alcoólico.....	45
4.7 - Caracterização centesimal do quefir.....	45
4.7.1 - Extrato seco total.....	45
4.7.2 - Resíduo mineral fixo (cinzas).....	46
4.7.3 - Proteína.....	46
4.7.4 - Gordura.....	47
4.7.5 - Carboidrato.....	47
4.8 - Análise sensorial.....	47
4.9 - Delineamento experimental.....	49
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1 - Isolamento e identificação de bactérias lácticas dos grãos do quefir.....	50
5.2 - Avaliação dos principais grupos de microrganismos presentes no quefir.....	58
5.3 - Composição centesimal e teor alcoólico do quefir.....	61
5.4 - Avaliação do pH e acidez do quefir durante o período de estocagem.....	63
5.5 - Análise sensorial.....	65

6 - CONCLUSÕES.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70
APÊNDICE A - Análises estatísticas.....	78
APÊNDICE B - Identificação de bactérias lácticas pelo programa API 50 CHL v5.1.....	90
APÊNDICE C - Valores atribuídos ao quefir pelos provadores durante o teste de aceitação.....	95

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, com a maior produção e difusão de informações relacionadas com a saúde e o bem estar, grande atenção é dirigida para os alimentos funcionais. A preocupação com a longevidade e prevenção de doenças, tem incentivado a população global à uma mudança em seus hábitos alimentares. Desse modo, os alimentos funcionais assumem um papel fundamental na melhora da qualidade de vida desta população, sendo incluídos em sua dieta e, conseqüentemente, elevando a demanda no mercado pela pesquisa e desenvolvimento de novos produtos. Os produtos lácteos fermentados correspondem cerca de 20% dos itens comercializados em laticínios. Esses produtos vêm sendo consumidos há milhares de anos e, nos dias de hoje, tem aumentado devido a sua qualidade nutricional e as recentes comprovações do seu valor terapêutico. A maioria dos leites fermentados é resultante do metabolismo de bactérias lácticas durante o seu crescimento no leite, sendo que alguns processos, também incluem as leveduras. A excelente qualidade nutricional é atribuída primeiramente ao leite, por ser uma importante fonte de cálcio, proteínas, fósforo e riboflavina e, também ao processo fermentativo, incluindo a variedade de microrganismos envolvidos.

O quefir é pouco conhecido na região norte, e sua origem são as montanhas dos Caucasus na antiga União Soviética e vem sendo consumido pelos caucasianos há milhares de anos. A literatura atribui a longevidade deste povo à ingestão diária de quefir. O quefir difere dos outros leites fermentados por abranger, no seu processo, uma cultura simbiótica de bactérias lácticas e leveduras, envolvendo dois tipos de fermentação, a ácida e a alcoólica. Sua fabricação consiste na inoculação dos grãos de quefir ou de uma cultura feita a partir dos grãos, no leite. Os grãos são uma matriz granular sólida onde bactérias lácticas e leveduras vivem em simbiose, com aparência semelhante à couve-flor e é constituído basicamente de

proteína e polissacarídeo. Ao final da fermentação a população microbiana pode ser recuperada nesses grãos, podendo ser usadas em processos subseqüentes de fermentação. O quefir têm consistência cremosa e uniforme, semelhante ao iogurte, mas o seu valor nutricional e terapêutico é muito maior. Há uma variedade de aproximadamente 40 compostos aromáticos, que contribuem ao único e raro “flavor” do quefir. No Brasil, ainda não existe produção do quefir em nível industrial, mas na região sul e sudeste sua produção tradicional domiciliar vem aumentando consideravelmente, principalmente, pela difusão do seu valor terapêutico.

As propriedades funcionais do quefir podem ser associadas, também, a outros produtos, como por exemplo, polpa de frutas. Diversos trabalhos têm sido desenvolvidos na Amazônia Ocidental no sentido de explorar os recursos da região, em particular frutas, como o cupuaçu, cubio, açaí e a graviola. O aproveitamento dessas frutas em forma de geléias, sorvetes e polpas congeladas tem sido um recurso muito usado na pequena e média indústria. Desse modo, o desenvolvimento de produtos alimentícios a base de quefir se justifica, não só pelas suas propriedades nutritivas e funcionais, mas, também, pela possibilidade de se utilizar polpas de frutas regionais em sua composição final, agregando-se sabor e valor econômico ao produto. Assim, propõe-se um estudo ainda inédito na região, visando-se a produção de quefir com polpa de graviola, avaliando-se sua qualidade microbiológica, físico-química e a aceitabilidade do produto obtido.

2- OBJETIVOS

3.1 Geral:

Produzir o quefir com polpa de graviola e avaliar as suas características microbiológicas e físico-químicas durante o período de estocagem e sua aceitabilidade.

3.2 Específicos:

3.2.1 Isolar e identificar bactérias lácticas dos grãos do quefir

3.2.2 Determinar o número de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, bactérias ácido acéticas e leveduras do quefir

3.2.3 Determinar a composição centesimal, pH e acidez do quefir

3.2.4 Avaliar a aceitação sensorial do quefir com polpa de graviola

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Alimento Funcional

A relação existente entre alimentação e saúde já é reconhecida pela população a dezenas de anos. O termo alimentos funcionais originou-se no Japão, nos anos 80 e refere-se a alimentos que além de suas características nutritivas conhecidas, contêm substâncias que auxiliam nas diversas funções específicas do corpo (ARAI, 1996). Alguns nutrientes podem promover a integridade gastrointestinal do consumidor exercendo assim o seu papel de alimento funcional (DUGGAN et al., 2002).

O conceito de alimentos funcionais provém da hipótese de que a dieta alimentar pode controlar e modular várias funções orgânicas, contribuindo para a manutenção da saúde e redução do risco de aparecimento de doenças. Além disso, a resposta do organismo frente a ingestão dos alimentos funcionais depende de fatores genéticos, fisiológicos e dietéticos, isto é, da interação dinâmica que ocorre entre os vários componentes de uma dieta (BORGES, 2000).

Ainda em relação a conceitos, os nutracêuticos são definidos por Andlauer; Fürst (2002) como substâncias que podem ser consideradas alimentos ou parte do alimento e que proporcionam benefícios médicos e a saúde, incluindo a prevenção e o tratamento a doenças.

Existem critérios para que um alimento seja considerado funcional: exercer efeito metabólico ou fisiológico que contribua para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas; fazer parte de uma alimentação usual; os efeitos positivos devem ser obtidos com quantidades não tóxicas e devem persistir mesmo após suspensão de sua ingestão; os alimentos funcionais não são destinados a tratar ou curar doenças (MILNER, 1999).

Os alimentos funcionais podem ser classificados em três grupos principais:

1- Alimentos com propriedades imunomodulatórias: alimentos que melhoram a imunidade celular contra diferentes antígenos. Estão presentes nos alimentos vegetais e em peixes.

2- Alimentos com atividade antioxidante: protegem o organismo contra a oxidação provocada pelos radicais livres. Combatem várias doenças como câncer, cardiopatia, catarata e diabetes.

3- Alimentos ricos em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: fazem parte das membranas celulares e o equilíbrio da ingestão desses dois ácidos graxos poliinsaturados podem prevenir doenças como cardiopatia, triglicérido alto e hipertensão (MILNER, 1999).

Roberfroid et al. (1998) refere-se a alimentos funcionais como sendo componentes bioativos, nutrientes ou não nutrientes, contidos nos alimentos que exercem efeito benéfico para a saúde, e este é dito “efeito funcional”.

Os alimentos funcionais possuem marcadores biológicos de sua função no organismo, isto é, biomarcas ou efeito fisiológico. A capacidade que determinados alimentos funcionais apresentam de elevar o número de bifidobactérias no cólon, aumentar a tolerância à lactose e a modulação do sistema imune, entre outros, são exemplos deste efeito biológico (BORGES, 2000).

No Brasil, em abril de 1999, foi criada a Portaria nº 398 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, que regulamenta o alimento funcional, definindo-o como um alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos a saúde. Devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999).

Entre os alimentos funcionais estão incluídos tanto o grupo dos vegetais quanto dos animais. Como exemplos de alimentos funcionais provenientes de fonte vegetal destacam-se:

a soja, o tomate, o brócolis, o alho, entres outros. Já os mais conhecidos de origem animal são: o peixe, e alguns derivados do leite (HASLER 1998).

Dentre os derivados do leite, o principal grupo de alimentos funcionais são os leites fermentados. Os produtos probióticos apresentam um grande crescimento como alimentos funcionais e há um intenso esforço em pesquisas para desenvolver produtos lácteos nos quais microrganismos probióticos estejam incorporados (HOLZAPFEL, 2002).

O termo probiótico, de origem grega, significa “para a vida”, e tem sido utilizado de diversas maneiras ao longo dos últimos anos (GOMES; MALCATA, 1998). Salminen et al. (1998) definem probióticos como sendo alimentos que contêm microrganismos vivos que trazem benefícios à saúde.

Produtos lácteos fermentados contendo bactérias probióticas como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* têm sido usados no controle de diversas doenças, além de ser alvo de inúmeras pesquisas no meio científico. Tais alimentos funcionais, por conterem agentes probióticos, têm seu valor nutritivo e terapêutico potencialmente aumentados (GOMES; MALCATA 1998).

Além dos probióticos um outro grupo de alimentos funcionais que está sendo alvo de muitas pesquisas, pela estimulação de bactérias benéficas no intestino, são os prebióticos. Segundo Gibson; Roberfroid (1995) prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro por estimular, seletivamente, o crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon e desse modo melhorar a saúde do hospedeiro. Os oligossacarídeos são considerados prebióticos com o maior potencial de utilização na indústria de alimentos. Dentre os oligossacarídeos, os frutooligossacarídeos (FOS) apresentam efeito bifidogênico mais intenso, podendo ser encontrados naturalmente em vegetais e plantas, como a alcachofra, a raiz de chicória, a cebola, o alho e a banana. No

entanto, as concentrações presentes nestes alimentos não são suficientes para obtenção dos efeitos fisiológicos desejados (TOMOMATSU, 1994).

Ainda dentre os produtos com propriedades funcionais podem-se citar os simbióticos. São produtos que contêm uma bactéria probiótica e um prebióticos (ROBERFROID et al., 1998). No desenvolvimento de simbióticos é necessária a seleção de linhagens de microrganismos com melhor capacidade de utilização de um determinado prebiótico, para se obter um efeito sinérgico na implantação e proliferação das bactérias desejáveis (FERREIRA; TESHIMA, 2000).

Hasler (1998) ressalta que pesquisas com alimentos funcionais não irão trazer avanços para a saúde pública a menos que os benefícios dos alimentos sejam efetivamente comunicados ao consumidor e a indústria de alimentos.

3.2 Produtos lácteos fermentados e seus benefícios à saúde

Leites fermentados são produtos resultantes da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, por fermentos lácticos próprios. Os fermentos lácticos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (BRASIL, 2000).

A fermentação é um dos métodos mais antigos para a preservação do leite. Em muitos países, uma grande variedade de leites fermentados são consumidos devido às características sensoriais, ação terapêutica e importância econômica industrial.

O iogurte é um tipo de leite fermentado consumido há milhares de anos. Ilya Ilich Mechnikov ganhou o prêmio Nobel, em 1908, demonstrando que o consumo periódico de leites fermentados com bactérias ácido-láticas era responsável pela longevidade dos caucasianos (ROBERTS, 2006). A Bulgária foi um dos primeiros países a consumir o iogurte divulgando-o para o restante do mundo. Entretanto, a teoria da longevidade não foi

confirmada, mas o leite fermentado ganhou espaço, devido ao sabor e valor nutritivo, fazendo com que sua demanda aumentasse (BAXTER, 1985).

Os leites fermentados foram originalmente desenvolvidos com a finalidade de preservar os nutrientes. Com a fermentação do leite por diferentes microrganismos é possível o desenvolvimento de produtos com diferentes sabores, texturas, consistências e funções. Quanto ao valor nutricional, o iogurte é um alimento muito importante contribuindo beneficemente na dieta pelas suas propriedades e efeitos no organismo (BUTTRISS, 1997).

A composição nutricional dos leites fermentados é similar a do leite utilizado na sua fabricação, mas as concentrações de vitaminas em geral é um pouco maior, com possível exceção ao ácido fólico. Concentrações de ácido láctico, galactose, aminoácidos livres e ácidos graxos aumentam como resultado do processo fermentativo (GURR, 1987). Alguns dos benefícios para a saúde devido ao consumo de leites fermentados são: a melhora da tolerância à lactose, proteção contra infecções gastrointestinais, redução do nível de colesterol, uma significativa melhora na absorção de minerais, além de possuir correlação negativa com incidência de câncer (BUTTRISS, 1997).

O leite acidófilo é um produto lácteo fermentado exclusivamente com estirpes selecionadas de *Lactobacillus acidophilus*. O *L. acidophilus* tem características especiais como a de resistir à baixa tensão superficial e a capacidade de implantação no intestino humano mas devido ao seu forte sabor, o leite acidófilo tem seu consumo bastante limitado (FERREIRA, 1992). Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de produtos lácteos contendo *L. acidophilus*, tais como, a melhora do sistema imune (SCHIFFRIN et al., 1995), a diminuição de enzimas fecais associadas ao câncer de cólon (MARTEAU et al., 1990) dentre outros.

O buttermilk, antigamente era resultado da fermentação do leiteiro, líquido resultante da batida do creme fermentado na produção da manteiga, mas atualmente o produto já pode

ser encontrado como resultado da fermentação de leite desnatado e poderá conter ou não gordura em níveis variados (FERREIRA, 1992).

O consumo de produtos lácteos fermentados é responsável pelo aumento da comercialização de derivados do leite na Itália. O alto valor nutricional destes produtos deve-se primeiramente ao leite utilizado na sua fabricação e também pela eventual presença de outros ingredientes não lácteos, como por exemplo, polpa de fruta, suco de fruta e açúcar, além das culturas lácteas que afetam a textura e as características organolépticas dos produtos (GAMBELLI et al., 1999).

Outros produtos de leites fermentados que podem ser encontrados no mercado nacional e/ou internacional são: aco iogurte, bebida láctea, biogurt, iogurte, koumiss, labneh, LC1[®], leben, leite búlgaro, progurt, sour cream, quefir, taette, viili e yakult[®]. Todos estes produtos são produzidos através da fermentação do leite de vaca ou de outro animal. São utilizadas culturas, quantidade de inóculo, tempo e temperatura de incubação específicos na produção destes alimentos fermentados.

3.3 Quefir

O quefir é uma bebida láctea fermentada, obtida através de dupla fermentação: láctica e alcoólica. O resultado desta dupla fermentação é a produção de numerosos compostos orgânicos incluindo ácido láctico, ácido acético, CO₂ e álcool etílico que dão sabor e odor característicos do produto. É originado das montanhas dos Causos na antiga União Soviética, onde é consumido há milhares de anos, sendo produzido pela fermentação dos grãos de quefir no leite ou uso de cultura preparada a partir dos grãos (OTLES ; CAGIND, 2003; IRIGOYEN et al., 2005). Ele tem sido fabricado com uma variedade de nomes tais como khephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi e kippi (KOROLEVA, 1988).u

No Brasil, a Resolução Nº 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, trata de Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados e define o quefir como sendo um produto cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de quefir, *Lactobacillus quefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de quefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), além das bactérias *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

Na Ucrânia, o quefir é o leite fermentado com maior volume de produção. Sua manufatura tradicional é realizada adicionando-se os grãos de quefir ao leite com temperatura de 20-22°C. Após a incubação de 12 a 16 horas obtêm-se uma coagulação lisa e acidez titulável de 0,8-1% de ácido láctico. Os grãos de quefir são então retirados e reutilizados na próxima produção de quefir (ROBERTS, 2006).

A FAO/WHO (2001) tem proposto uma definição para o quefir, baseado na composição microbiana dos grãos de quefir (a cultura iniciadora usada para produzir o quefir) e ao produto final, quefir (Quadro 1).

Quadro 1- Descrição do quefir pelo Codex Alimentarius

Definição

Preparado com o uso de culturas iniciadoras dos grãos de quefir, *Lactobacillus kefir*, e espécies do gênero *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* crescendo em forte relação entre si. Os grãos de quefir contêm leveduras fermentadoras de lactose (*kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*).

Composição

Proteínas do leite (% m/v)	_____	min.2,8
Gordura do leite (%m/m)	_____	< 10
Acidez titulável expressa em % de ácido láctico (% v/m)	_____	min. 0,6
Etanol	_____	não estabelecido
Quantidade de microrganismos específicos constituintes da cultura “starter” (UFC/g, no total)	_____	min.10 ⁷
Leveduras (UFC/g)	_____	min. 10 ⁴

O quefir comercial é tradicionalmente fabricado com leite de vaca, mas também pode ser encontrado com leite de ovelha, cabra e búfalo. Também tem sido relatada a produção de quefir utilizando-se leite de soja (ISMAIL et al., 1983; KUO;LIN, 1999). As bactérias ácido-láticas encontradas nos grãos e quefir crescem mais lentamente no leite de soja quando comparado ao leite de vaca, mas a adição de um substrato, como por exemplo 1% de glicose, aumenta o número de leveduras, a produção de ácido lático e etanol, comparado com a produção do quefir em leite de soja puro (LIU;LIN, 2000).

Algumas desvantagens são observadas na fabricação do quefir com o uso dos grãos como inóculo. Duitschaeffer (1989) relata algumas destas desvantagens: desbalanceamento da composição microbiana, resultando na dificuldade de manter um padrão constante de qualidade do quefir, dificuldade no cuidado e manutenção dos grãos de quefir, alguns microrganismos não migram do interior dos grãos para o leite durante o processo fermentativo com isso as propriedades microbianas do quefir usado como inóculo é muito diferente da microbiota dos grãos, não havendo uniformidade no produto final. Em vista dessa dificuldade, estudos específicos têm avaliado o uso de culturas puras com uma mistura dos microrganismos isolados do quefir para a sua produção.

Beshkova et al. (2002) produziram uma cultura mista com duas bactérias (*Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) isolados dos grãos de quefir combinado com duas bactérias do iogurte (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*). Foram produzidos dois tipos de quefir, um adicionando a levedura antes da fermentação láctica, juntamente com os outros microrganismos e outro acrescentando a levedura após a fermentação láctica. Nos dois produtos de quefir foram observados um alto número de *Lactobacillus* e *Lactococcus* viáveis após a fermentação. As propriedades químicas e organolépticas foram similares ao quefir produzido tradicionalmente.

Nos Estados Unidos um quefir comercial é produzido utilizando uma cultura mista com microrganismos isolados dos grãos de quefir. Esta cultura mista é constituída de *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus diacetylatis*, *Leuconostoc cremoris* e *Saccharomyces florentinus* (HERTZLER; CLANCY, 2003).

No Brasil, estudos com o objetivo desenvolver produto lácteo com características físico-químicas e sensoriais similares ao quefir foram realizados utilizando como inóculo uma cultura balanceada de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* e uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, onde a levedura foi inoculada após a fermentação láctica seguindo-se assim a fermentação alcoólica. Foi observado que a produção desta bebida similar ao quefir é viável em nível laboratorial, sendo necessários testes para avaliação do produto em escala piloto (MESQUIARI, 1999).

3.3.1 Grãos de quefir

Os grãos do quefir (Figura 1) são uma matriz constituída de proteína e polissacarídeo em forma de couve-flor com 3 a 20 mm de diâmetro onde bactérias ácido lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), bactérias ácido acéticas e leveduras vivem em perfeita simbiose (LIBUDZISZ ; PIATKIEWICZ, 1990; PINTADO et al., 1996; GARROTE et al., 1997). Não se sabe ao certo a origem dos primeiros grãos e quefir. É praticamente impossível a formação espontânea dos grãos, mesmo isolando-se todos os componentes da microbiota natural do quefir. Novos grãos de quefir somente são obtidos com a repartição dos grãos pré-existentes formados pela multiplicação dos microrganismos que neles vivem.

Figura 1 - Grãos de quefir



Fonte: LIBUDZISZ et al., 1990

Alguns estudos têm avaliado fatores que podem aumentar a formação destes grãos para uso em diversas áreas. Os efeitos de várias concentrações e tipos de açúcares utilizados como substratos para produção da biomassa do quefir foram avaliados. Observou-se que a utilização de frutose como substrato produz 20,75g de biomassa em 24 horas de experimento. Quando se utilizou uma mistura de açúcares, glicose e sacarose na proporção de 1:3 foi observado o melhor efeito na produção de biomassa com 27,25g de biomassa de quefir em 24 horas de fermentação (HARTA et al., 2004).

Outros fatores também podem influenciar no aumento dos grãos de quefir, entre eles, a temperatura de incubação, o enriquecimento do leite com adição de substâncias nutritivas (triptose e extrato de levedura) e o uso de agitação durante o processo fermentativo do quefir (SCHOEVERS; BRITZ, 2003).

3.3.2 Microbiologia do quefir e dos grãos do quefir

A característica microbiológica dos grãos do quefir variam de acordo com a origem dos grãos (GUZEL-SEYDIM et al., 2005), porcentagem dos grãos inoculados (GARROTE et al., 1998). Outros fatores afetam drasticamente a microflora dos grãos de quefir, entre eles; tempo e temperatura de incubação, medidas sanitárias usadas durante a separação dos grãos, lavagem dos grãos e estocagem refrigerada (GUZEL-SEYDIM et al., 2005).

Estudos sobre a população microbiana de grãos de quefir portugueses identificaram apenas bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Streptococcus* e leveduras. Não foi observada a presença de bactérias ácido-acéticas, mas foram isoladas as bactérias; *Lactobacillus quefir*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e a levedura *Saccharomyces unisporus* (PINTADO et al., 1996). No entanto, Mothagi et al. (1997), em estudo sobre a produção de quefir no Iran isolou diferentes bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras. Dentre as bactérias isoladas houve uma predominância de *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus quefir*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Acetobacter aceti*. Já entre as leveduras, as identificadas foram *Candida quefir* e *Saccharomyces quefir*.

Bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e leveduras foram isoladas e identificadas em grãos de quefir da África do Sul. Todas as bactérias ácido-lácticas isoladas dos grãos de quefir da África já foram observadas em outros trabalhos, com exceção da bactéria *Lactobacillus curvatus*. Não foram encontradas bactérias ácido-acéticas (WITTUHN, 2004). Alguns trabalhos não consideram as bactérias ácido-acéticas como parte da microbiota natural do quefir, e sim um contaminante (ÂNGULO et al., 1993).

Simova et al. (2002), em uma investigação sobre a mudança da microflora (bactérias ácido-lácticas e leveduras) do quefir, observaram que existe uma grande variação da microflora dos grãos (A) quando comparado com a microflora do quefir produzido com esses grãos (B)

e também quando comparado com a microbiota do quefir obtido a partir da utilização do quefir, B, como inóculo (C). Ao longo do caminho A→B→C a proporção de *Streptococcus* aumentou de 26 a 30%, enquanto os *Lactobacillus* diminuíram de 13 a 23%. As leveduras lactose-negativa, dominantes na flora total de leveduras presentes nos grãos de quefir, diminuíram drasticamente no quefir (C).

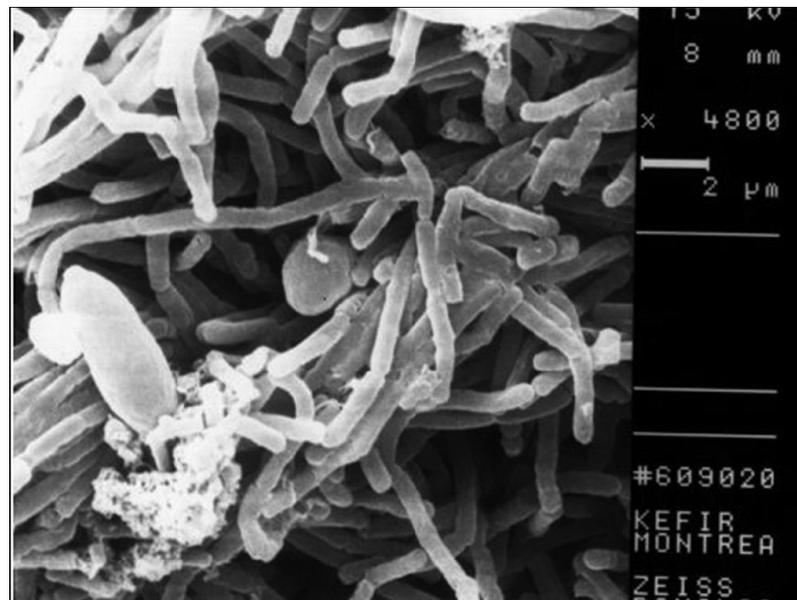
Em estudo comparativo da preservação dos grãos de quefir, Garrote et al. (1997) avaliaram a qualidade microbiológica dos grãos em diferentes temperaturas de armazenamento: 4⁰C, -20⁰C e -80⁰C. A estocagem a -80⁰C foi a que obteve menor alteração na microbiota dos grãos de quefir. Já os grãos estocados a 4⁰C mostraram grande mudança na microflora, além disso, o fermentado produzido destes grãos apresentou características desagradáveis e atípicas. O autor sugere que os grãos de quefir mantidos em domicílios caseiros sejam conservados em freezer a -20⁰C.

Pesquisas recentes constataram que as condições de embalagem também afetam as características microbiológicas dos grãos de quefir. Grãos liofilizados foram embalados em 3 tipos de filmes; polietileno de baixa densidade, poliéster orientado e poliéster orientado metalizado. Sendo este último o mais eficaz na preservação das características microbiológicas, devido provavelmente a dois fatores: melhor barreira ao oxigênio e a umidade (WITTHUHN et al., 2005).

Observações da microbiota dos grãos de quefir também foram realizadas através do uso da microscopia eletrônica de varredura. Rea et al. (1996), demonstraram que não há diferença somente entre o interior e o exterior dos grãos, mas no próprio interior há diferença quanto ao tipo de microrganismos encontrados. Em sua observação dos grãos, foram encontrados *Lactobacillus* longos e curvados em todo o interior dos grãos de quefir, enquanto que os *Lactococcus* foram observados apenas na superfície. No entanto, Guzel-Seydim, (2005) usando também microscópio eletrônico não observou a presença de *Lactococcus* em

nenhuma parte dos grãos e atribuiu tal fato a possível retirada dos *Lactococcus* durante a preparação dos grãos para observação em microscopia eletrônica de varredura. Também foi observada levedura na superfície e no meio dos grãos de quefir. Três tipos de *Lactobacillus* (curto, longo e curvado) foram notados em toda parte dos grãos. Na figura 2 podemos observar uma micrografia eletrônica de grãos de quefir obtidos do Moscow Dairy Institute (FARNWORTH, 2005).

Figura 2- Micrografia eletrônica de grãos de quefir



Fonte: FARNWORTH, 2005

No Brasil, os leites fermentados, entre eles o quefir, devem cumprir requisitos microbiológicos durante o período de estocagem conforme exposto no quadro 2.

Quadro 2- Contagem de microrganismos específicos requeridos durante o período de validade de leites fermentados

Produto	Contagem de bactérias lácticas totais (ufc/g)	Contagem de leveduras específicas (ufc/g)
Iogurte	min. 10^7	-
Leite cultivado ou fermentado	min. 10^6	-
Leite acidófilo ou acidofilado	min. 10^7	-
Quefir	min. 10^7	min. 10^4
Kumys	min. 10^7	min. 10^4
Coalhada	min. 10^6	-

Fonte: Resolução Nº 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento

3.3.3 Características físico-químicas do quefir e de seus grãos

A composição química dos grãos de quefir foi determinada por Zourari; Anifantakis, (1988), sendo constituída por: 89-90% de água, 0,2% de lipídeos, 3% de proteínas, 6% de carboidratos e 0,7% de cinzas. Grãos de quefir obtidos em domicílios familiares na Argentina apresentavam: 83% de água, 9-19% de polissacarídeos e 4,5% de proteínas (ABRAHAN ; DE ANTONI, 1999). Também a composição química do quefir foi determinada por Güven et al. (2003) apresentando: 86-89% de água, 11-14% de matéria seca, 2,8-3,3% de lipídeo, 1,7-2,9% de lactose e 0,7-0,9% de cinza.

As características físico-químicas (pH, viscosidade e produção de CO_2) de leites fermentados com grãos de quefir conservados por 120 dias em temperaturas de 4°C , -20°C e -80°C , foram avaliadas. Grãos repicados a cada 48 horas foram utilizados como controle. O leite fermentado com grãos estocados a 4°C foi notavelmente diferente do controle. A produção de CO_2 por Grama de grão diminuiu 57,1% e a viscosidade foi similar a um leite

não fermentado. Já o quefir feito a partir dos grãos estocados a -20°C não mostrou diferença significativa do controle em relação ao pH e viscosidade, contudo a concentração de CO_2 diminuiu em 30,8%. O quefir fabricado com os grãos estocados a -80°C apresentou propriedades praticamente idênticas ao controle (GARROTE et al., 1997).

Um outro fator que influenciou a qualidade físico-química do quefir é a proporção grãos : leite. Quanto maior a quantidade de grãos inoculados menor é o valor de pH após o período de fermentação. Com a proporção de 10g/l produziu-se uma bebida viscosa não muito ácida, enquanto que a concentração de 100g/l obteve-se uma bebida ácida, com baixa viscosidade e maior sabor efervescente (GARROTE et al., 1998).

Guzel-Seydim et al. (2000) constataram que os ácidos orgânicos afetam as características sensoriais dos leites fermentados assim como a aceitabilidade destes produtos pelo consumidor. O aumento da acidez de leites fermentados, como o iogurte, durante a refrigeração é um problema. Os autores não observaram diferença significativa nos valores de pH de amostras de quefir durante 21 dias de estocagem refrigerada.

Proteína, polissacarídeo e água contidos em 4 amostras de grãos de quefir argentinos foram determinados por Garrote et al. (2001). O teor de proteína ficou entre 4,7-6,6%, polissacarídeos 7,8-8,9% e o teor de água entre 7,93-8,38%.

A composição química de amostras de quefir, fabricados na Escócia e na Polônia usando leite de vaca, cabra e ovelha com diferentes inóculos, foram avaliadas. Verificou-se que a composição química dos produtos de quefir foram similares, mas o conteúdo de proteína de leite de ovelha foi o dobro quando comparado com o leite de vaca e cabra, devido a diferenças normais entre estes mamíferos (WSZOLECK et al., 2001).

As características físico-químicos do quefir fabricado com os grãos (A) quando comparado com o quefir fabricado a partir do quefir como inóculo (B) são bem distintas, principalmente quanto ao teor de álcool encontrado. A porcentagem de álcool de A→B

diminuiu significativamente, conseqüência da redução da população de leveduras. Houve também redução do pH e da concentração de CO₂. Afetando assim as características sensoriais do quefir, como aroma, flavor e textura (SIMOVA et al., 2002).

Irigoyen et al. (2005) observou mudanças nas características físico-químicas de quefir durante o período de estocagem refrigerada. O quefir foi preparado usando 1% e 5% dos grãos e amostras foram analisadas após 24 horas de fermentação e 2, 7, 14, 21, e 28 dias de armazenagem a 5^oC. Foram avaliados teor de gordura matéria seca, lactose, pH e viscosidade. Durante o período de estocagem o teor de lactose e o pH permaneceram constantes, enquanto que o total de gordura e matéria seca diminuíram. Amostras fabricadas com 1% de grãos de quefir apresentaram teor de lactose e pH superiores e viscosidade inferior do que as amostras fabricadas com 5% de grãos.

A Resolução N° 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento que trata de Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados define padrões físico-químicos para os leites fermentados, entre os quais, o quefir, conforme demonstra o quadro 2.

Quadro 3 - Requisitos físico-químicos para os leites fermentados

Produto	Acidez (g de ácido láctico/100g)	Etanol (% v/m)
Iogurte	0,6 a 1,5	-
Leite cultivado ou fermentado	0,6 a 2,0	-
Leite acidófilo	0,6 a 2,0	-
Quefir	0,5 a 1,5	Máximo de 1,5% no quefir fraco e até 3% no quefir forte
Kumys	> 0,7	Min. 0,5
Coalhada	0,5 a 1,5	-

Fonte: Resolução N° 5, de 13 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento

3.3.4 Aspectos nutricionais e bioterapêuticos do quefir

Além dos benefícios das bactérias e leveduras, o quefir contém vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que ajudam a manutenção da saúde do corpo. O quefir é rico em vitamina B₁, cálcio, aminoácidos essenciais, ácido fólico e vitamina K, e, por ter sua proteína parcialmente digerida, facilita sua absorção pelo corpo (SALOFF-COSTE, 1996). Kneifel; Mayer (1991) encontraram quantidades apreciáveis de piridoxina, vitamina B₁₂, ácido fólico e biotina sintetizados durante a produção do quefir.

Por longo tempo a Rússia tem usado o quefir para o tratamento de uma extensa gama de doenças. Observa-se que o quefir estimula o esvaziamento gástrico e que a administração do quefir, juntamente com outra bactéria probiótica, tem efeito benéfico no controle de certas infecções, como no tratamento de infecção por *Helicobacter pylori* (ZUBILLAGA et al., 2001).

Diversos estudos têm relatado a relação entre a ingestão de quefir e o aumento da imunidade do hospedeiro. Thourex; Schmucker (2001) observaram que a administração oral de quefir, eleva a imunidade intestinal específica contra *Cholera holotoxin* em ratos adultos novos. Recentemente, foi demonstrada a capacidade imunomodulatória dos microrganismos do quefir em mucosa intestinal de ratos, ressaltando a importância do número e da viabilidade das bactérias para a resposta desejada. Este foi o primeiro estudo *in vivo* referente aos mecanismos envolvidos na capacidade imunomodulatória da microbiota do quefir (VIDEROLEVA et al., 2005). O mesmo autor observou o efeito da microflora do quefir e de frações do quefir livre de bactérias na produção citoquímica de células do sistema imune natural, indicando que diversos componentes do quefir, além da sua microbiota, possuem funções bioterapêuticas capazes de estimular o sistema imune natural de ratos contra tumores

e contra infecções causadas por microrganismos patógenos (VINDEROLEVA et al., 2006a). A capacidade de estimular o sistema imune também foi observada pela administração oral de diversos produtos de leites fermentados com a microbiota do quefir (VINDEROLEVA et al., 2006b).

Propriedades antiinflamatórias foram observadas em leites fermentados com os grãos de quefir. Tecidos de ratos foram induzidos à formação de edemas e tratados com o uso de quefir. Observou-se uma inibição de $44\pm 6\%$ nos processos inflamatórios nos tecidos de ratos (RODRIGUES et al., 2005a).

A dieta com o quefir tem influência significativa na composição da microbiota intestinal de ratos, reduzindo levemente o número de enterobactérias. Porém, a contagem de bactérias anaeróbias e a contagem de bactérias aeróbias Gram-negativas diminuiu significativamente; esta diminuição foi mais pronunciada após 7 meses de tratamento dos ratos. Também o *Clostridium* sulfito-redutor diminuiu significativamente. O aumento da proporção de *Enterococcus*, observada no intestino durante o tratamento com o quefir, foi também muito importante. A extrapolação dos resultados em ratos para humanos deve ser evitada, contudo o desenvolvimento do epitélio intestinal de humanos é similar aos observados em roedores (MARQUINA et al., 2002).

Figler et al. (2006) avaliou o efeito do consumo de um quefir probiótico Húngaro, o Biofir[®], sobre a microbiota fecal de humanos. O Biofir[®] contendo 10^6 /mL de bactérias probióticas foi administrado em 120 voluntários humanos e um quefir tradicionalmente consumido na Rússia foi utilizado como controle. Vários grupos de microrganismos foram avaliados durante 6 semanas e observou-se uma diminuição significativa no número de microrganismos no grupo de pessoas tratadas com o Biofir[®], indicando que este produto é capaz de promover a multiplicação de bactérias probióticas no intestino grosso de humanos.

O primeiro estudo comparando a ação antioxidante do quefir com a da vitamina E em tecidos de ratos foi realizado por Güven et al. (2003). O estudo foi conduzido para investigar o efeito protetor do quefir contra danos oxidativos do CCl₄ (tetracloreto de carbono) em ratos comparado com a vitamina E. Embora ambos, vitamina E e o quefir, tenham demonstrado efeito contra os danos induzidos pelo CCl₄, o quefir teve maior efeito protetor.

No estudo realizado por Tamai et al. (1996) foi observado que o colesterol e os fosfolipídios de ratos diminuíram, significativamente, com o consumo de leite fermentado, usando uma cultura mista de bactérias ácido láticas e leveduras. Entretanto, St-Onge et al. (2002) avaliou o efeito do consumo de quefir sobre os níveis de colesterol e não observou diminuição significativa nas concentrações de lipídeos em humanos, indicando que o quefir não pode ser considerado um agente hipocolesterolêmico.

O efeito da administração oral de quefir de leite de vaca e leite de soja mostraram significativa diminuição em tumores de ratos, assim como melhora na produção de imunoglobulinas na mucosa intestinal. Esses resultados sugerem que o quefir pode ser considerado um dos alimentos mais promissores em termos de prevenção de câncer e melhora da resistência da mucosa contra infecções gastrointestinais (LIU et al., 2002).

O uso de leites fermentados como o iogurte, para melhorar a tolerância e a digestão da lactose tem sido recomendado há muitos anos. O quefir tem sido sugerido como uma possível opção, além do iogurte, para melhorar a digestão da lactose em adultos intolerantes à lactose. Pesquisa realizada comparando o iogurte e o quefir, quanto à digestão da lactose, demonstra que o quefir natural melhora a digestão da lactose, assim como o iogurte natural. (HERTZLER; CLANCY 2003).

3.3.5 Propriedades antimicrobianas do quefir

Vários estudos revelam que alguns *Lactobacillus* são capazes de produzir compostos antimicrobianos incluindo ácidos orgânicos (ácido láctico e acético), dióxido de carbono, peróxido de hidrogênio, etanol, diacetil e peptídeos, contribuindo para a redução de patógenos de origem alimentar e também usados no tratamento e prevenção de desordens gastrintestinais (TAHARA; KANATANI,1997; ZAMFIR et al., 1999; BONADÉ et al., 2001; MESSENS;DE VUYST, 2002; JAMUNA; JEEVARATNAM, 2004)

A sobrevivência de algumas bactérias de interesse para a segurança alimentar tem sido amplamente investigada em leites fermentados como o iogurte, no entanto um número limitado de estudos está sendo conduzido para avaliar o efeito do quefir contra patógenos transmitidos por alimentos (GARROTE et al., 2000).

A *Escherichia coli* é uma bactéria patogênica de grande importância na área alimentar, devido ao risco de infecção gastrointestinal ao se ingerir alimentos contaminados com esta bactéria. O quefir mostra importante poder de inibição contra *Escherichia coli*. Este poder de inibição pode variar dependendo da concentração de ácido láctico e acético encontrados no quefir, quanto maior a quantidade destes ácidos melhor é a atividade antimicrobiana do quefir (GARROTE et al., 2001).

O monitoramento da sobrevivência de três patógenos transmitidos por alimentos, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b e *Yersinia enterocolítica* 03, foi cuidadosamente realizado em quefir fermentado por 1 e 2 dias, durante o período de fermentação e por 21 dias de estocagem refrigerada. Durante o período de fermentação, no quefir fermentado por um dia, houve crescimento de todas as bactérias patogênicas, mas durante o período de estocagem refrigerada não ocorreu crescimento de nenhuma bactéria,

demonstrando que a contaminação antes da fermentação é bem mais perigosa do que a contaminação pós-fermentação (GULMEZ; GUVEN, 2003).

As propriedades antimicrobianas de 58 cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas a partir do quefir foram avaliadas. Grãos de quefir de 6 diferentes países (França, Itália, Portugal, Rússia, Turquia e Espanha) foram usados no estudo. Os seguintes patógenos: *Escherichia coli*, *Listéria monocytogenes*, *Salmonela typhimurium*, *Salmonela enteritidis*, *Shigella flexneri* e *Yersinia enterocolitica*, foram usados no estudo. Aproximadamente 75% dos *Lactobacillus* isolados mostraram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*. *Shigella flexneri* foi inibida por 64% dos *Lactobacillus* isolados. *Listéria monocytogenes* e *Salmonela enteritidis* foram inibidas por 50% e 40%, respectivamente dos isolados. Grande número de cepas (81%) apresentou inibição contra *Salmonela typhimurium*. De acordo com os dados aqui mostrados, sugere-se que o efeito antagônico dos *Lactobacillus* observados *in vitro*, podem ser atribuídos a substâncias antimicrobianas secretadas, de natureza não determinada (SANTOS et al., 2003).

Czamanski (2003) estudou a possibilidade de se utilizar o filtrado de quefir tradicional esterilizado como anti-séptico/desinfetante em agroindústria familiar ou produção de animal, através da determinação de sua atividade antibacteriana. Foram utilizadas no teste duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*). Observou-se um maior efeito bacteriostático frente as bactérias Gram-negativas e um melhor efeito bactericida contra as bactérias Gram-positivas. *Staphylococcus aureus* foi a bactéria que demonstrou maior resistência para a inibição bacteriostática, porém após sessenta minutos exposta ao quefir a inativação bactericida ocorreu com 100 ufc/mL. Já a *Salmonela* demonstrou sensibilidade a inibição, mas quando exposta ao quefir a inativação ocorreu com somente 10 ufc/mL. Segundo a autora, estes resultados despertam os interesses em prosseguir a avaliação de

desinfetantes biológicos a serem usados na agroindústria, dificultando a transmissão ou a redução da dose infectante por microrganismos indesejáveis.

O peróxido de hidrogênio é um componente antimicrobiano produzido por algumas bactérias. Yuksekdag et al. (2004) observaram que 11 de 21 estirpes de *Lactococcus* isoladas de quefir produzem peróxido de hidrogênio. Todas as linhagens isoladas mostraram efeito inibitório contra o crescimento de *Staphylococcus aureus*, mas sem efeito contra *E.coli* NRLL B-704 e *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.6 Outros usos dos grãos de quefir

A habilidade dos grãos de quefir crescerem em leite já é conhecida, mas estudos têm avaliado a capacidade dos grãos de fermentarem o soro do leite aumentando seu peso e produzindo exopolissacarídeo (kefiram) a partir de lactose. Varias proporções de grãos:soro foram avaliadas assim como tempo e temperatura de fermentação. Melhores resultados foram observados com a proporção de 100g de grãos por litro de soro a uma temperatura de 43°C por 5 dias, produzindo cerca de 103mg de kefiram por litro de leite (RIMADA; ABRAHAM, 2000).

Leveduras isoladas dos grãos de quefir estão sendo avaliadas quanto à produção de etanol a partir de glicose, produzindo quantidades significativas de etanol em varias temperaturas diferentes 5-30°C (ATHANASIADIS et al., 1999).

Recentemente os grãos de quefir foram avaliados quanto a sua eficiência em produzir pão de boa qualidade em termos de volume, “flavor”, textura e vida útil em substituição às leveduras tradicionalmente utilizadas na fermentação da massa do pão. Os resultados sugerem que os grãos de quefir podem ser usados com sucesso na fabricação de pão, melhorando seu

“flavor” e aumentando sua vida útil (PLESSAS et al., 2005). Harta et al. (2004) também sugerem a utilização dos grãos de quefir como uma possível substituição as leveduras do pão.

Quefir e quefiran estão sendo testados quanto sua atividade cicatrizante mostrando-se eficiente na cicatrização de feridas quando comparado com o uso de 5 mg/kg de neomicina-clostebol emulsão (RODRIGUES et al., 2005b).

3.4 Graviola

A graviola é uma fruta da região amazônica muito apreciada pela população local e cultivada praticamente durante todo o ano sendo assim de fácil obtenção. Por este motivo a polpa congelada da graviola será utilizada neste trabalho para agregar sabor e valor nutritivo ao quefir.

A graviola é da família *Annonaceae*, do gênero *Annona* e espécie *muricata*. Alguns sinônimos são atribuídos à fruta, entre eles: *Annona macrocarpa*, *A. bonpladiana*, *A. cearensis*, *Guanabanus muricatus*. A árvore é pequena, sempre verde, de tronco reto, chegando a medir de 5-6 metros de altura, tendo folhas largas verde escuras. Seu fruto é comestível, medindo de 15-23 cm de diâmetro, de cor verde-amarelada e sua polpa interna é branca. A graviola é nativa dos trópicos da América do Sul, incluindo a Amazônia (TAYLOR, 2002)

Todas as partes da gravioleira têm sido usadas na medicina natural, nos trópicos, incluindo sua casca, folhas, raiz, fruto e as sementes dos frutos. Diversas propriedades e usos são atribuídos a diferentes partes das árvore. Na Amazônia brasileira, suas folhas são usadas em chás para problemas no fígado, e o óleo das folhas é misturado com o óleo de oliva e usado, externamente, no alívio de dores de cabeça, reumatismo e artrite (TAYLOR, 2002).

O sabor, uma resposta integrada das sensações de gosto e aroma, é um fator decisivo na escolha e aceitação de alimentos e bebidas. A graviola (*Annona muricata* L.) é uma fruta tropical bastante apreciada por seu sabor único (OLIVEIRA et al., 2003).

A polpa da graviola é fibrosa e contém uma boa quantidade de proteínas, gorduras, carboidratos, vitaminas C e B, potássio e fósforo. Uma vez madura, a graviola se decompõe com bastante rapidez e, por esse motivo, é normalmente comercializada na forma de polpa congelada.

A produção de polpa de fruta congelada, tem grande aceitação no mercado nacional, por preservar as características organolépticas dos frutos (SALGADO et al., 1999).

A seguir, na tabela 1, algumas características físico-químicas de polpa de graviola:

Tabela 1- Características físico-químicas da polpa congelada de graviola

Polpa Graviola	pH	⁰ Brix	Acidez (mg%)	⁰ Brix/Acidez	Açúcares Redutores(g%)	Açúcares Totais(g%)	Umidade (g%)
	3,61±0,02	12,66 ± 2,08	1,46 ± 0,03	008,67	07,31 ± 3,30	09,50 ± 2,60	87,12 ± 0,62

Fonte: Salgado et al, 1999

4. METODOLOGIA

O trabalho experimental dessa dissertação de mestrado foi executado nos laboratórios de Microbiologia de Alimentos e de Bromatologia do Departamento de Medicamentos e Alimentos do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amazonas, Manaus – AM.

4.1 Origem e manutenção dos grãos de quefir

Amostras de grãos de quefir foram gentilmente cedidos pela professora Célia Lucia de Luces Fortes Ferreira, coordenadora do Laboratório de Culturas Lácticas da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

Para a manutenção dos grãos durante a realização do experimento, esses grãos foram repicados em leite integral UHT (Ultra High Temperature) comercial, duas vezes na semana. A repicagem constou da lavagem dos grãos em água destilada estéril com o auxílio de uma peneira plástica, previamente esterilizada. Após a lavagem, os grãos foram transferidos para erlenmeyer estéril, capacidade de 250 mL e realimentados com 200 mL de leite UHT, sendo mantidos em temperatura ambiente por um período de 24 horas. Em seguida, o quefir foi estocado em geladeira a 4°C até a próxima repicagem.

4.2. Produção do quefir natural e do quefir com polpa de graviola

Para a preparação do quefir, utilizou-se a metodologia adaptada descrita por FERREIRA, 1987. Os grãos foram repicados em leite UHT, sequencialmente, para a ativação da cultura. Após a terceira incubação, os grãos de quefir foram lavados com água destilada estéril e inoculados em 1 L de leite UHT, em erlenmeyer estéril, na proporção de 5% (g/L),

sendo incubados em temperatura de 25°C, por um período de 24 horas. Os grãos foram então separados do leite com peneira esterilizada e o leite fermentado foi mantido a 7°C, por mais 24 horas. Após a segunda fermentação obteve-se então o quefir natural (controle). Em seguida, adicionou-se ao quefir natural 12% de açúcar e 15% de polpa de graviola. O açúcar utilizado foi do tipo cristal e polpa comercial pasteurizada e congelada. Todos os ingredientes foram adquiridos em supermercado local.

4.3 Análises microbiológicas

Realizou-se acompanhamento dos principais grupos de microrganismos presentes no quefir durante o período de estocagem de 28 dias a 4°C. Foram feitas análises nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenagem refrigerada. A contagem de *Lactobacillus* foi realizada em ágar MRS (DE MAN, ROGOSA E SHARPE, 1960), pelo método de plaqueamento em profundidade, incubada a 30°C, em anaerobiose, por 48 horas. Para contagem de *Lactococcus* pelo método de plaqueamento em profundidade, o meio de cultura utilizado foi o M17 ágar, sendo posteriormente incubado em anaerobiose a 30°C por 48 horas.

Para a determinação do número de leveduras, o meio utilizado foi MEA (Malt Extract Agar), incubado em aerobiose por 5 dias a 25°C. (PINTADO *et al.* 1996). As bactérias acéticas foram cultivadas em meio APM (Acetobacter Peroxim Médium) ágar e incubadas a 25°C por 48 horas. A contagem dos microrganismos foi expressa em Log de ufc/g de quefir.

4.4 Isolamento de bactérias lácticas dos grãos de quefir

Para o isolamento das bactérias lácticas, os grãos de quefir foram plaqueados em ágar MRS, tendo sido previamente adicionados a esse meio 0,004% de púrpura de bromocresol e

0,5% de carbonato de cálcio. Os grãos foram lavados com água destilada estéril e 25 gramas foram pesados e misturados a 225 mL de água peptonada, (0,1% de peptona). Foram realizadas diluições decimais sucessivas de 10^{-1} a 10^{-9} transferindo-se 1mL da diluição anterior para 9 mL de água peptonada, seguindo-se plaqueamento pelo método de profundidade (pour plate).

As placas inoculadas foram incubadas, por um período de 48 h, a temperatura de 37°C , em jarras de anaerobiose (Pemution, modelo JA 0400), contendo um becker com 0,5 gramas de carbonato de cálcio, 2,5 mL de água destilada e 2,5 mL de ácido clorídrico 1N para a geração de CO_2 . Foram escolhidas 30 colônias das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . As colônias selecionadas eram regulares, de tamanhos variados que apresentaram coloração amarela pela redução do púrpura de bromocresol (Figura1).

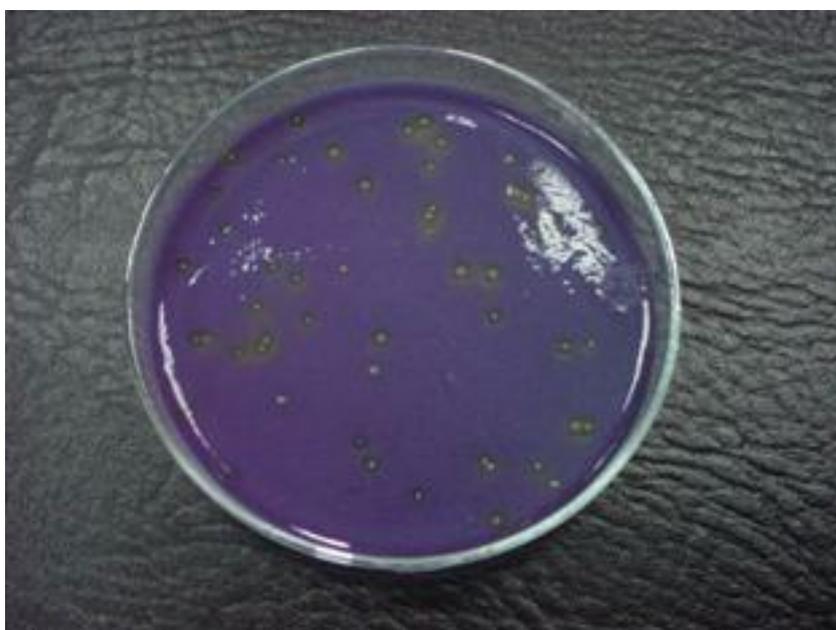


Figura 3 – Colônias características de bactérias lácticas crescidas em MRS agar.

As colônias selecionadas foram transferidas para 10 mL de caldo MRS e cultivadas a 37°C , durante 48 horas, por três vezes consecutivas. Após a terceira ativação, cada cultura foi

plaqueada em MRS ágar pelo método do esgotamento do inóculo e incubada a 37⁰C, por 48 horas. As colônias isoladas foram submetidas à coloração de gram e ao teste de catalase. As colônias foram mantidas congeladas a -80⁰C em caldo MRS com 30% de glicerol para posterior identificação.

4.5 Caracterização dos isolados por perfil de fermentação de carboidratos

4.5.1 Preparo do inóculo

As culturas de colônias que apresentaram morfologia de cocos e catalase negativas foram descongeladas e ativadas três vezes em 10mL de caldo MRS. Após o crescimento, cada cultura foi distribuída em tubos falcon estéreis e, posteriormente, centrifugada a 1500g, por 20 minutos, em centrífuga Nova Técnica modelo NT - 810.

Após o descarte do sobrenadante, ressuspendeu-se o concentrado de células de cada cultura em 5 mL de solução tampão-fosfato, pH 7,2, esterilizado, para lavagem das células. Procedeu-se a nova centrifugação, nas mesmas condições já descritas. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células foi ressuspenso em 2 mL de solução tampão-fosfato, pH 7,2, esterilizado, e usado como inóculo.

4.5.2 Ajuste do inóculo

O ajuste da quantidade de inóculo necessária para sua padronização foi feito adicionando-se gotas do inóculo em 5 mL de água destilada, até se obter uma densidade óptica de $0,70 \pm 0,2$ em espectrofotômetro CELM-E-225D a 550nm. O dobro da quantidade do inóculo foi adicionado em 10 mL do meio CHL , adquirido junto com o kit API.

4.5.3 Inoculação e Incubação

Para a caracterização dos isolados foi utilizado o kit API CHL50 (BioMérieux-França) que se baseia na fermentação de 49 carboidratos. As bandejas foram ordenadas com cinco subunidades, cada uma constituída de 10 cápsulas numeradas, contendo 49 substratos distintos. O meio CHL contendo a suspensão bacteriana foi distribuído nas 50 cápsulas da bandeja com o auxílio de uma pipeta de Pasteur esterilizada e cada cápsula foi recoberta com óleo mineral para fornecer condições de anaerobiose.

As bandejas foram incubadas a temperatura de 37°C por 48 horas. Realizou-se leitura para cada isolado após 24 e 48 horas de incubação. O resultado positivo observado pela mudança de cor do meio de violeta para amarelo foi provocado pela reação de redução do indicador púrpura de bromocresol. Este resultado foi anotado em folheto fornecido pelo fabricante do meio CHL e, posteriormente, analisado em um programa de informática também fornecido pelo laboratório Biomérieux, fabricante do kit API CHL 50.

4.6 Análises físico-químicas do quefir

4.6.1 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido diretamente pela introdução do eletrodo do potenciômetro em alíquotas de 10mL do produto, à temperatura ambiente. O pHmetro utilizado foi da marca TECNAL modelo pHmeter TEC-2 (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

4.6.2 Acidez titulável

A acidez das amostras foi determinada por titulação direta com uma solução de NaOH 0,1 M, fatorada com biftalato de potássio, utilizando-se 10 gramas de amostra adicionados de três gotas de fenolftaleína como indicador, sendo os resultados expressos em porcentagem de ácido láctico.

4.6.3 Determinação do teor de Etanol

A determinação do teor alcoólico foi realizada através de uma destilação simples do quefir em destilador Tecnal TE-036/1 e medição do teor alcoólico em Densímetro Portátil pra Laboratório DM-340.2, versão V11 da Lemis Baltic.

4.7 Caracterização centesimal do quefir

4.7.1 Extrato seco total

As determinações de extrato seco total foram realizadas pelo método gravimétrico, que consiste na perda de umidade por dessecação e pesagem do extrato seco total de uma quantidade determinada de amostra, até que a diferença entre duas pesagens consecutivas seja menor ou igual 0,1mg (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

4.7.2 Resíduo Mineral fixo (cinzas)

As determinações do teor de cinzas foram realizadas pela dessecação das amostras, seguidas pela incineração a 550⁰C, aproximadamente, até coloração cinza clara ou branca e estabilização do peso. Foram pesadas cinco gramas da amostra em cápsula de porcelana, previamente aquecida em mufla a 550⁰C, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e pesada. A amostra foi seca, carbonizada e depois incinerada. Desta forma, a fração orgânica da amostra volatiliza-se sob a forma de dióxido de carbono e água, permanecendo as cinzas no recipiente, que são uma estimativa do teor de minerais do quefir. As amostras foram resfriadas em dessecador até a temperatura ambiente e pesadas (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

4.7.3 Proteínas

Foram diluídas cinco gramas da amostra em um balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se 5 mL da solução da amostra para um tubo de digestão. Adicionou-se, em seguida, 3 mL de ácido sulfúrico concentrado, 1,5 gramas de sulfato de potássio e 0,1 grama de sulfato de cobre. As amostras foram aquecidas por um período de 6 horas, até que a solução se tornasse transparente. Após o resfriamento foi adicionado ao tubo 30 mL de água destilada até dissolução do digerido. Procedeu-se a destilação, acrescentando-se 15 mL de hidróxido de sódio, sendo o destilado recolhido em um erlenmeyer de 250 mL contendo 10 mL de solução de ácido ortobórico. A titulação foi conduzida com ácido clorídrico 0,05 mol/L.. Para o cálculo da concentração de proteínas, utilizou-se o fator 6,35 como sendo o valor relativo ao teor de nitrogênio na proteína (SILVA et al 1997).

4.7.4 Gordura

A amostra foi preparada pesando-se 10 gramas da bebida que foram diluídas em um balão volumétrico de 100mL. Com o auxílio de uma pipeta, 10 mL de ácido sulfúrico, foram transferidos para o butirômetro de Gerber. Adicionou-se, lentamente, 11 mL da amostra e 1 mL de álcool amílico. Os butirômetros foram devidamente arrolhados e agitados até completa dissolução da amostra. Procedeu-se a centrifugação 1500xg durante cinco minutos. Manejando a rolha, colocou-se a camada amarela clara (gordura), dentro a haste graduada do butirômetro. O número de mL ocupado pela camada oleosa foi anotado e a percentagem de gordura foi obtida pela fórmula:

$$\%(m/v) \text{ Gordura} = 10 \times \text{Teor de gordura lido no butirômetro} \quad (\text{Instituto Adolfo Lutz, 1985}).$$

4.7.5 Carboidratos

O teor de carboidrato foi determinado pela diferença da soma dos demais componentes.

4.8 Análise Sensorial

Foi realizado teste de aceitação do quefir com polpa de graviola utilizando-se para isto um formulário com escala hedônica de nove pontos (9-excelente, 1-péssimo), adaptada de Stone; Sidel (1985) conforme a figura 4.

Foram realizadas três repetições e em cada repetição foram empregados 30 julgadores não-treinados (CHAVES, 1981). No formulário do teste, além de atribuir uma característica

ao produto, os provadores fizeram comentários com sugestões para aperfeiçoamento da bebida.

Para cálculo da aceitação utilizou-se a seguinte equação (PEDRERO; PANGBORN, 1997):

$$A = \frac{M}{9} \times 100\%$$

9

Onde:

A = Aceitação

M= Média das notas obtidas

9= Nota máxima

Figura 4 – Ficha de resposta para o teste de aceitação

TESTE DE ACEITAÇÃO	
NOME: _____	DATA: __/__/__
Por favor, avalie a amostra e marque o termo que melhor reflete a sua opinião sobre o produto	
<input type="checkbox"/> EXCELENTE	
<input type="checkbox"/> ÓTIMO	
<input type="checkbox"/> MUITO BOM	
<input type="checkbox"/> BOM	
<input type="checkbox"/> RASOÁVEL	
<input type="checkbox"/> NÃO MUITO BOM	
<input type="checkbox"/> RUIM	
<input type="checkbox"/> MUITO RUIM	
<input type="checkbox"/> PÉSSIMO	
Comentários: _____	

4.9 Delineamento experimental

Os resultados de pH, acidez e contagem de microrganismos foram avaliados utilizando-se análise de variância (ANOVA) tendo-se 2 variáveis: tempo (0, 7, 14, 21 e 28 dias) e produto (controle e bebida). O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi utilizado para as comparações de médias.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e identificação de bactérias lácticas dos grãos do quefir

Das amostras plaqueadas em meio MRS (DE MAN, ROGOSA E SHARPE, 1960) colônias características de bactérias lácticas de coloração amarela foram selecionadas para o teste de catalase, coloração de Gram e observação da morfologia, cujos resultados estão indicados na tabela 2.

Tabela 2 – Características dos isolados dos grãos de quefir, quanto à morfologia, coloração de Gram e teste da catalase

Amostra	Coloração de Gram	Teste de catalase	Arranjo
IGQ01	+	-	estafilococos
IGQ02	+	-	estreptococos
IGQ03	+	-	estreptococos
IGQ04	+	-	estafilococos
IGQ05	+	-	cocos
IGQ06	+	-	estafilococos
IGQ07	+	-	estreptococos
IGQ08	+	-	estafilococos
IGQ09	+	-	estafilococos
IGQ10	+	-	estafilococos
IGQ11	+	-	estreptococos
IGQ12	+	-	estreptococos
IGQ13	+	-	cocos
IGQ14	+	-	estreptococos
IGQ15	+	-	estafilococos
IGQ16	+	-	estafilococos
IGQ17	+	-	cocos
IGQ18	+	-	estafilococos
IGQ19	+	-	cocos
IGQ20	+	-	cocos
IGQ21	+	-	cocos
IGQ22	+	-	estreptococos
IGQ23	+	-	estreptococos
IGQ24	+	-	estreptococos
IGQ25	+	-	estafilococos
IGQ26	+	-	cocos
IGQ27	+	-	estreptococos
IGQ28	+	-	estreptococos
IGQ29	+	-	cocos
IGQ30	+	-	cocos

IGQ: isolado dos grãos de quefir

Todos os isolados foram Gram positivos e catalase negativos. Todos os isolados mostraram-se na forma de cocos, sendo que observou-se os seguintes arranjos: 33,3% como estafilococos, 36,6% de estreptococos e 30% de cocos isolados não tendo sido detectados bacilos. Conga et al. (1997) também não observou a presença de bactérias em forma de bacilo. Em contraste, grãos de quefir da Argentina possuíam número de bacilos duas vezes maior em relação ao de cocos (GARROTE et al., 2001). A diferença encontrada entre os grupos de microrganismos dos grãos de quefir pode ser explicada pela variação na origem dos grãos.

Os isolados em forma de cocos foram selecionados para o teste de assimilação de carboidratos para bactérias lácticas em kit API CHL 50, da BioMérieux cujos resultados estão apresentados na Tabela 3. Os outros isolados permaneceram congelados em freezer -80°C para análises posteriores. As bactérias em forma de cocos foram escolhidas para identificação por fazerem parte da microbiota de grãos de quefir de diversas origens geográficas (KOROLEVA, 1991; ÂNGULO et al., 1993; DOUSSET e CAILLET, 1993; PINTADO et al., 1996; GARROTE et al., 2001; SIMOVA et al., 2002; YUKSEKDAG et al., 2004) enquanto que bactérias lácticas em forma de estreptococos foram pouco observadas (SIMOVA et al., 2002; YUKSEKDAG et al., 2004) não havendo relatos de isolamento de bactérias lácticas em forma de estafilococos.

Todos os isolados submetidos ao teste API CHL 50 foram classificados como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Figura 5). Com exceção dos isolados IGQ13, IGQ19 e IGQ20, os demais apresentaram o mesmo perfil bioquímico. O isolado IGQ13 não fermentou os carboidratos amido e gluconato, assimilado pelos demais. Já o isolado IGQ19 não fermentou os açúcares arbutina e β -Gentibiose, que também foram fermentados pelos outros isolados. O IGQ20 diferenciou-se dos demais por não fermentar o gluconato assim como o IGQ13, mas estes dois isolados não apresentaram o

Tabela 3 – Perfil da fermentação de carboidratos de bactérias lácticas, após 48 horas de incubação, em Kit API CHL50 (Biomèriux – França).

Carboidratos	Isolados								
	IGQ5	IGQ17	IGQ21	IGQ19	IGQ26	IGQ29	IGQ30	IGQ13	IGQ20
1-Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2-Eritriol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4-L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6-D-Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7-L-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9-β-Metil-Xilosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11-D-Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12-D-Frutose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13-D-Manose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14-L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15-Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16-Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17-Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18-Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20-α-M. D-Manosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21- α-M. D-Glicosídeo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22-N-Acetil-Glicosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23-Amidalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
24-Arbutina	+	+	+	-	+	+	+	+	+
25-Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26-Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27-Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29-Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31-Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32-Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33-Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34-Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35-D-Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36-Amido	+	+	+	+	+	+	+	-	+
37-Glicogênio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-Xilitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39-β-Gentibiose	+	+	+	-	+	+	+	+	+
40-D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-L-Xilose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42-D-Tagnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43-D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44-L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45-D-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46-L-Arabitól	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47-Gluconato	+	+	+	+	+	+	+	-	-
48-2-Ceto-Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49-5-Ceto-Gluconato	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: resultado positivo; -: resultado negativo

mesmo perfil bioquímico de fermentação de carboidratos, pois o IGQ20 fermentou o amido que não foi assimilado pelo IGQ13. Pela análise do perfil de assimilação de carboidratos das estirpes estudadas, pode-se reuni-las em 4 grupos distintos, conforme indica a tabela 4.

Figura 5 – Perfil bioquímico do isolado IGQ20 apresentado no Kit API CHL50



amarelo: reação positiva
violeta: reação negativa

O *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, isolado de grãos de quefir da Argentina, apresentou capacidade de produção de ácido através da fermentação dos seguintes carboidratos: L-arabinose, ribose, galactose, D-glucose, D-frutose, D-manose, D-manitol, arbutima, salicina, celobiose, maltose, lactose, sacarose, trealose e D-turanose (GARROTE, 1997). Com exceção dos açúcares L-arabinose e D-turanose, os outros açúcares fermentados pelo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolados dos grãos de quefir da Argentina também foram fermentados por todos os isolados deste experimento, citados na tabela 3.

Tabela 4- Classificação dos isolados de *Lactococcus* pela análise do perfil de fermentação de carboidratos

Isolados	Classificação	Probabilidade(%) ^a
IGQ5, IGQ17, IGQ21, IGQ26, IGQ29 e IGQ30	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99,9
IGQ13	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	96,8
IGQ19	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99,9
IGQ20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	99,2

a: Probabilidades de acordo com proGrama APILAB PLUS versão 5.1 (BioMérieux – França).

De acordo com Sanches et al. (2000) onze estirpes de *Lactococcus lactis* foram isoladas de queijo artesanal e suas características quanto à fermentação de 49 carboidratos foram avaliadas utilizando-se o Kit API CHL50 (Biomérieux – França). Os isolados foram reunidos em 5 grupos distintos pelo perfil de utilização dos carboidratos. Todas as estirpes isoladas fermentaram a ribose, galactose, glucose, frutose, manose, α -Metil D-Glicosídeo, N-Acetil-Glicosamina, arbutina, esculina, salicina, maltose, lactose e trealose. Duas estirpes fermentaram a xilose e o manitol e, o amido, foi assimilado por seis estirpes; a sacarose e a amidalina foram fermentadas por sete estirpes; a celobiose foi utilizada por oito estirpes e a gentibiose foi parcialmente utilizada por dez estirpes (SANCHEZ, 2000). Os carboidratos que foram assimilados por todos os isolados citados no artigo de Sanchez, também foram utilizados por todos os isolados deste experimento, com exceção da arbutina que não foi fermentada pelo isolado IGQ19, conforme mostra a tabela 3.

Verificou-se que houve uma grande variação quanto à fermentação de carboidratos por uma mesma espécie bacteriana. Mainville (2006) comparou o metabolismo de carboidratos de estirpes de *Lactococcus* isolados de grãos de quefir em seu experimento com estirpes de um banco de culturas, BCCM/LMG - Bactéria Collection Laboratory for Microbiology (LMG), Bélgica e constatou que uma mesma espécie bacteriana, *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, pode

apresentar comportamento diferente quanto à assimilação de carboidratos, conforme mostra a tabela 5.

Tabela 5 - Comparação do metabolismo de carboidratos de estirpes de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Estirpe Bacteriana	amidalina	celebiose	galactose	lactose	maltose	manitol	manose	melibiose	rafinose	salicina	sacarose	trealose	arabinose	esculina	melizitose	ribose	xilose	gluconato	sorbitol	arbutina	gentibiose	amido	N-acetil-glucosamina
LMG6890	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+
IM101	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
IM102	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
IM106 ^e	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
IM108	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+

Fonte: MAINVILLE et al. (2006)

O autor observou, ainda, que a bactéria identificada, através da técnica de fermentação de carboidratos, como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* (LMG 7931), quando submetida à análise do seu DNA cromossomal, sugeriu que esta bactéria pertencia a subsp. *cremoris*. Para que uma identificação tenha um melhor nível de confiança é necessário que, após identificação das bactérias pela técnica de fermentação de carboidratos, seja realizada, também, a análise genética.

As bactérias lácticas em forma de cocos podem ser encontradas em grande número nos grãos de quefir de diversas origens geográficas. Em análises anteriores, já foram identificadas as espécies *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus durans* em grãos de quefir da Turquia (YUKSEKDAG, 2004). Na Argentina, a microbiota dos grãos de quefir tem sido amplamente estudada, tendo sido identificadas, além

do *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, o *Lactococcus lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* (GARROTE, 2001).

Garrote et al. (1998) constataram que quanto maior a quantidade de grãos para fermentação do leite menor era a proporção de bactérias do gênero *Lactococcus*, provavelmente devido a diminuição rápida do pH e inibição das referidas bactérias. Esta diminuição foi observada, apenas, no fermentado de quefir, mas não nos grãos. O autor sugeriu que os grãos de quefir exerciam um papel protetor a este grupo de bactérias.

Além do grupo de *Lactococcus*, um outro tipo de microrganismo que faz parte da microbiota natural dos grãos de quefir é o *Lactobacillus*. No entanto, no presente trabalho, não foi isolado nenhum microrganismo do gênero *Lactobacillus*. Possivelmente, quando os grãos de quefir foram diluídos com água peptonada os microrganismos deste gênero ficaram protegidos no interior dos grãos. Witthun et al. (2004) afirmam que além da origem dos grãos, do modo de produção do quefir, um outro fator que pode influenciar na variação da população microbiana é método usado para identificar os microrganismos isolados dos grãos.

Em observações da microbiota dos grãos de quefir, realizadas com o uso da microscopia eletrônica de varredura, foi constatada que os *Lactobacillus* são encontrados no interior dos grãos de quefir, enquanto que os *Lactococcus* foram verificados, apenas, na superfície dos grãos (REA et al., 1996). No entanto, em outra observação da microbiota dos grãos de quefir, não foi constatada a presença de *Lactococcus* em nenhuma parte dos grãos, tal fato foi atribuído a possível retirada dos *Lactococcus* durante a preparação dos grãos para observação em microscopia eletrônica de varredura (GUZEL-SEYDIM et al., 2005).

Conga et al. (1997) ao avaliar a caracterização de bactérias lácticas em diversos produtos de laticínios produzidos artesanalmente na Europa, obteve 4379 isolados de 35 produtos diferentes, dentre eles o quefir. A maioria dos seus isolados foram classificados como sendo do grupo dos *Lactococcus*, mas foram também encontrados microrganismos dos

grupos: *Enterococcus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Em conformidade com o artigo de Conga, não foi observada a presença de *Lactobacillus* nos microrganismos isolados do quefir. Conga isolou um total de 402 microrganismos do quefir, sendo que 361 foram identificados como sendo do gênero *Lactococcus* e 41 do gênero *Leuconostoc*.

Em contraposição, grãos de quefir da África do Sul, quando avaliados quanto a sua microbiota, verificou-se um domínio do grupo *Lactobacillus* dentre as espécies isoladas. Foram analisados grãos de oito regiões diferentes desse país e, em apenas uma região, foi observada a presença de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, numa proporção muito pequena em relação aos outros microrganismos encontrados nestes grãos (WITTHUHN et al., 2004).

Sucedâneos do quefir estão sendo desenvolvidos a partir de culturas isoladas com o intuito de obter-se uma bebida com propriedades físico-químicas e sensoriais semelhantes ao do quefir tradicional (MESQUIARI, 1999). Para que as culturas utilizadas tenham características microbiológicas semelhantes aos grãos de quefir, a microbiota deve ter, em sua composição, uma prevalência de bactérias da espécie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (BESHKOVA et al., 2002).

As bactérias lácticas utilizadas na fermentação do leite estão incluídas em duas categorias gerais: os microrganismos mesofílicos, com temperatura ótima de crescimento < 30 °C e os termofílicos, com temperatura ótima > 37 °C. O gênero *Lactococcus* encontra-se no grupo das culturas mesofílicas. As características fenotípicas importantes deste gênero que as diferenciam em espécies ainda não estão bem definidas, existindo opiniões que ressaltam a possibilidade dessas espécies apresentarem-se em contínua variação fenotípica (MARSHALL, 1987).

A espécie *Lactococcus lactis* tem sido bastante isolada não somente de produtos lácteos fermentados como também de leites de diferentes mamíferos, entre eles a cabra. Após

isoladas e identificadas estudos das características tecnológicas do *Lactococcus lactis subsp. lactis* demonstram seu alto potencial no uso como inóculo em produtos lácteos com excelente qualidade sensorial (BADIS et al., 2004a; BADIS et al., 2004b)

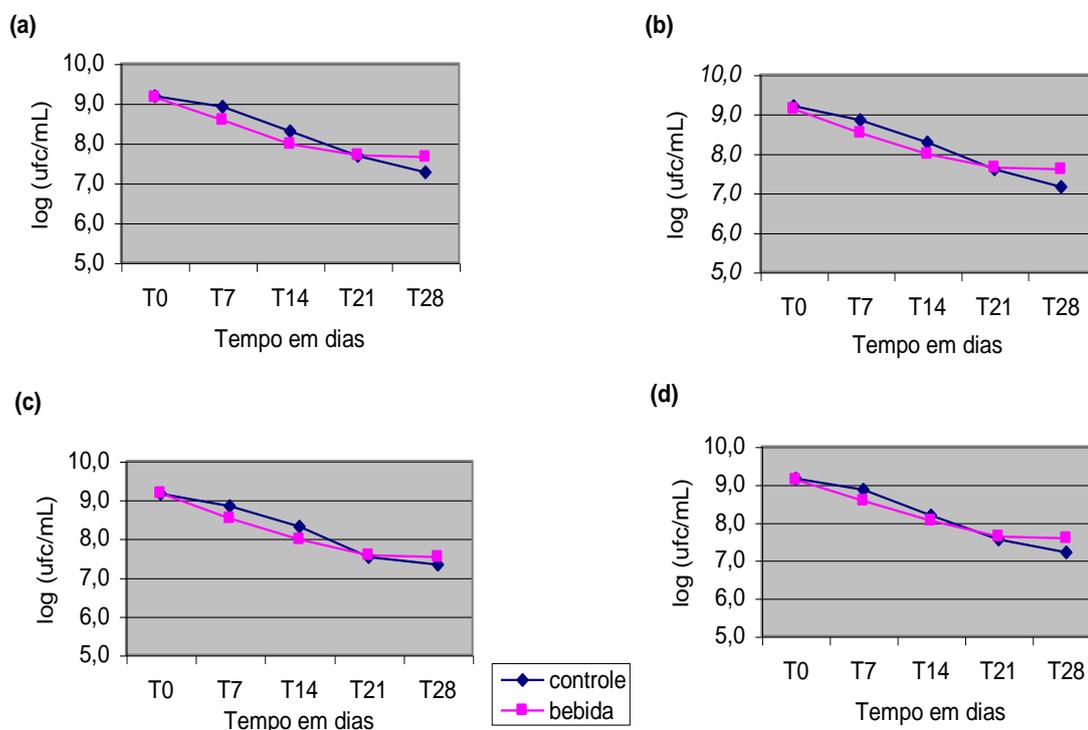
Uma única característica que difere as bactérias lácticas *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, é a capacidade desta última em produzir amônia a partir de arginina. A característica que distingue o *Lactococcus lactis* spp. *lactis* do *Lactococcus lactis* spp. *diacetylactis* é a habilidade deste último em metabolizar o citrato (KEMPLER; McKAY, 1981).

Grãos de quefir liofilizados foram embalados em três tipos diferentes de filme. Foi avaliada a influência do tipo de embalagem nas características microbiológicas dos grãos de quefir. O *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, isolado dos grãos antes do armazenamento, não foi encontrado nos grãos de quefir após serem embalados e armazenados por um período de três meses, indicando que o tipo de embalagem utilizada no acondicionamento dos grãos de quefir pode interferir em sua população microbiana (WITHUHN et al., 2005).

5.2 Avaliação dos principais grupos de microrganismos presentes no quefir

Durante o período de 28 dias de estocagem refrigerada do quefir natural (controle) e do quefir com polpa de graviola (bebida) produzidos conforme metodologia descrita no item 4.2, o crescimento dos principais grupos de microrganismos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, bactérias acéticas e leveduras foram quantificadas através da contagem de ufc/mL nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias e os resultados expressos em log ufc/mL podem ser observados na figura 6.

Figura 6- Contagem de *Lactobacillus* (A), *Lactococcus* (B), Leveduras (C) e bactérias acéticas (D) durante o período de estocagem



Pela análise de variância (ANOVA) realizada observou-se que os tipos de produto (controle e bebida) não influenciaram no crescimento de nenhum dos grupos de microrganismos analisados como está exposto no apêndice A.

A contagem inicial (tempo 0) dos grupos de microrganismos: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, bactérias acéticas e leveduras foi em torno de 10^9 ufc/mL (Figura 6). Este valor está próximo ao observado por Garrote et al. (1998); Irigoyen et al. (2005) Fontán et al. (2006) em relação ao número de *Lactobacillus* e *Lactococcus*, que foi em torno de 10^8 , no entanto superior em relação à contagem de leveduras e bactérias acéticas que foram de 10^5 e 10^6 respectivamente. Beshkova et al. (2002) também relataram contagem de 10^8 ufc/mL para *Lactobacillus* e 10^5 ufc/mL para leveduras, contudo um número maior para os *Lactococcus* 10^{11} .

O número de microrganismos diminuiu significativamente do tempo 0 até 21 dias de estocagem refrigerada, enquanto que a partir de 21 até 28 dias não houve diferença significativa no número de microrganismos encontrados, conforme mostra o apêndice A. Irigoyen et al. (2005) observou um declínio significativo no número de *Lactobacillus* e *Lactococcus* até 14 dias de estocagem refrigerada enquanto que a população de leveduras e bactérias acéticas permaneceram constantes durante o período de 28 dias de estocagem.

No final do período de estocagem (28 dias) todos os grupos de microrganismos tiveram contagem em torno de 10^7 ufc/mL para todas as populações microbianas avaliadas, valor superior ao encontrado por Irigoyen et al. (2005) que ao final de 28 dias de estocagem sob refrigeração observaram contagem entre 10^4 a 10^6 . Este decréscimo no número de microrganismos pode ser atribuído ao aumento da acidez e a diminuição de substrato no meio.

Bactérias ácido lácticas, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e leveduras foram quantificadas em grãos de quefir da Turquia, com contagem aproximada de 10^9 , 10^9 , 10^8 e 10^6 ufc/mL respectivamente. A proporção de bactérias ácido lácticas e leveduras foi de $10^9 : 10^6$. Também foi observado que durante a fermentação do leite houve um rápido crescimento de bactérias ácido lácticas, *Lactobacillus* e *Lactococcus* e um crescimento menor das leveduras. Já durante a estocagem refrigerada, ocorreu um crescimento lento das bactérias ácido lácticas, *Lactobacillus* e *Lactococcus* até 14 dias de estocagem. Após este período, observou-se um pequeno declínio dessas bactérias. Ao contrário das leveduras que decresceram durante os primeiros 7 dias de estocagem e a partir daí, houve um acréscimo de sua população até 21 dias de estocagem refrigerada (GUZEL-SEYDIM et al., 2005).

A quantidade de grãos utilizada como inóculo na produção do quefir pode influenciar significativamente a contagem de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, leveduras e bactérias acéticas. As leveduras aumentam de número proporcionalmente a quantidade de grãos inoculados enquanto que os *Lactobacillus* e *Lactococcus* tem uma relação inversamente proporcional a

quantidade de grãos inoculados (IRIGOYEN et al., 2005). Garrote et al. (1998) também observou a influência da concentração de grãos de quefir utilizados como inóculo na produção de quefir, indicando que um aumento na concentração dos grãos diminui a porcentagem de *Lactococcus* encontrados, provavelmente pelo aumento rápido do pH do meio.

5.3 Composição centesimal e teor alcoólico do quefir

A composição centesimal do quefir natural e do quefir com polpa de graviola foi determinada de acordo com a metodologia de IAL, 1985; SILVA et al. 1997, conforme os dados apresentados na Tabela 6.

O quefir natural diferiu do quefir com polpa de graviola pela adição de dois ingredientes, o açúcar e a polpa de graviola. A polpa de graviola com o seu alto teor de umidade adicionado ao quefir natural aumentou seu conteúdo de água e, conseqüentemente, diluiu a concentração de todos os macronutrientes, como pode ser constatado na Tabela 6.

Tabela 6 Composição química e energética do quefir natural e do quefir com polpa de graviola^a

	Água	Gordura	Cinza	Proteína	Carboidrato	Energia ^b
Quefir Natural	86,5	3,5	0,63	3,04	6,33	69
Quefir com polpa de graviola	88,3	3,00	0,42	2,32	5,96	60

a: os valores foram expressos em g/100g

b: A energia foi expressa em Kcal

Segundo Gambelli et al. (1999) níveis baixos de gorduras podem ser observados em amostras de leite fermentado, sendo a gordura do leite diluída pela presença de outros ingredientes não gordurosos como, por exemplo, as frutas. Quantidades diferentes de frutas adicionadas aos leites fermentados comercializados na Itália alteraram a concentração dos seus macronutrientes. Constatou-se variação nos teores de carboidratos de 3,5 a 13,1%, gordura de 3,2 a 3,8% e proteína de 4,0 a 4,8%. Como conseqüência dessa variação alterou-

se, também, o valor energético das amostras de leite fermentado. O autor confirma a alta qualidade nutricional dos leites fermentados produzidos com diferentes bactérias lácticas utilizadas durante o processo de fermentação.

Os resultados da análise centesimal do quefir natural estão de acordo com os dados apresentados por Guven et al. (2003), com exceção do teor de lipídeos que ficou entre 2,8-3,3%. Esta pequena variação é normal e pode ser atribuída à diferença no teor de gordura do leite utilizado na preparação do quefir. Não foi observado, na literatura, relatos da produção de quefir adicionado de polpa de fruta.

A composição do quefir é variável e ainda não está bem definida e depende da origem do leite, da composição das culturas dos grãos de quefir, bem como do processo tecnológico utilizado na fabricação do quefir (ZUBILLAGA et al., 2001).

A porcentagem de álcool no controle e na bebida foi de 0,1 e 0,2% respectivamente. O valor de álcool encontrado na bebida foi maior em relação ao controle, possivelmente pela adição de açúcar na bebida. A legislação brasileira não exige presença de quantidade mínima de álcool na produção de quefir, mas o classifica de fraco quando este apresenta até 1,5% de etanol e de forte quando apresenta o máximo de 3%. Os baixos níveis de álcool encontrados tanto na bebida quanto no controle possivelmente estão relacionados à temperatura de fermentação que não favorece o crescimento das leveduras responsáveis pela produção de álcool no quefir.

Simova et al. (2002) observou diferença significativa no teor alcoólico do quefir produzido utilizando-se, separadamente, os grãos e outro quefir como inóculo, sendo que os valores variaram entre 0,25% a 0,09% respectivamente. Esta diminuição no teor alcoólico é atribuída à diminuição no número de leveduras no processo fermentativo.

Beshkova et al. (2002) observou que o teor alcoólico do quefir fermentado com os grãos de quefir não excedeu 0,25% enquanto que o quefir produzido com culturas puras isoladas dos grãos de quefir alcançou teores de até 0,48% de álcool.

Em contraste, Fontán et al. (2006) encontrou teores bem menores de álcool após a fermentação do quefir. Os autores observaram um aumento leve de 0,002 para 0,008% no conteúdo de álcool nas primeiras 48 horas de fermentação, mas significativa de 48 até 168 horas de fermentação chegando a 0,018% de álcool no final do processo fermentativo.

5.4 Avaliação do pH e acidez do quefir durante o período de estocagem

Foi realizado acompanhamento da variação do pH e acidez titulável durante 28 dias de estocagem refrigerada e os resultados estão apresentados na tabela 7 e 8 respectivamente.

Os valores de pH do controle e da bebida foram submetidos à análise de variância utilizando-se 5% de probabilidade conforme mostra o apêndice A. O tempo de estocagem influenciou significativamente nos valores de pH. Não houve diferença significativa entre os tempos 0, 7, 14 e 21 dias de estocagem, havendo diferença significativa somente no tempo de 28 dias. O tipo de produto (controle e bebida) também influenciou significativamente na variação do pH durante o tempo de estocagem, mas a interação entre tempo e produto não foi significativa, $p=0,060$ (apêndice A).

Tabela 7 – Valores de pH durante o tempo (dias) de estocagem refrigerada

	T0	T7	T14	T21	T28
controle	4,25	4,29	4,28	4,24	4,31
bebida	4,19	4,19	4,24	4,24	4,30

Controle: quefir natural. Bebida: quefir com polpa de graviola

O pH de alguns leites fermentados tais como o iogurte e o labneh tende a diminuir significativamente durante o período de estocagem refrigerada (ABRAHAMSEN; HOLMEN, 1981; KATISIARI et al., 2002; AL-KANAMANY, et al., 2003). No quefir natural (controle) assim como no quefir com polpa de graviola o pH ao final de 28 dias de estocagem refrigerada foi maior do que o pH no tempo zero, conforme indica a tabela 7. O mesmo foi observado por Irigoyen et al. (2005) para quefir natural. O autor não constatou variação significativa no pH durante a estocagem e atribuiu que tal fato a presença das leveduras. Colar (1996) verificou que as bactérias lácticas multiplicam-se e produzem ácido lático mais lentamente quando cultivadas com uma cultura de levedura.

Tabela 8 - Valores da acidez titulável, expresso em % de ácido lático, durante o tempo (dias) de estocagem refrigerada do controle e da bebida

	T0	T7	T14	T21	T28
controle ^a	1,27	1,42	1,42	1,48	1,48
bebida ^b	1,25	1,32	1,35	1,40	1,41

Controle: quefir natural. Bebida: quefir com polpa de graviola

A acidez titulável das amostras avaliadas, conforme mostra a tabela 8, aumentou progressivamente durante os 28 dias de estocagem com valores que variaram de 1,27 a 1,48 % no controle e de 1,25 a 1,41%, na bebida. Este aumento na acidez dos produtos (controle e bebida) foi significativo somente do tempo 0 para o tempo 7 dias, no entanto, entre os tempos 7, 14, 21 e 28 não houveram diferenças significativas entre as amostras analisadas. A interação entre tempo e produto na variação da acidez titulável não foi significativa, $p=0,441$, conforme está exposto no apêndice A.

Fontán et al. (2006) avaliaram a acidez titulável durante 168 horas de fermentação do quefir e os valores variaram de 0,14% no tempo 0 de fermentação para 1,32% com 168 horas de fermentação. O autor sugere que os altos valores de acidez titulável se devem não somente a presença de ácido láctico, mas, também, de outros ácidos orgânicos tituláveis por NaOH e quantificados como ácido láctico.

5.5 Análise Sensorial

Foram realizadas três repetições da produção do quefir com polpa de graviola com a respectiva aplicação do teste de aceitação em 90 provadores não treinados (30 para cada repetição). O teste de aceitação do quefir com polpa de graviola obteve uma média de 7,5, indicando que, o produto na escala hedônica, ficou entre os escores muito bom e ótimo, conforme item 4.7. Os resultados estão expostos na Tabela 9.

A qualidade sensorial do quefir tem sido avaliada utilizando-se além do leite de vaca para a fermentação, o leite de outros animais como, por exemplo, a ovelha. Em geral, todos os quefirs produzidos com leite de ovelha apresentaram escores sensoriais menores quando comparado com os quefirs produzidos com leite de vaca. Esta superioridade na qualidade do quefir produzido com leite de vaca é referente não somente ao sabor, mas, também, a cor, odor e consistência do quefir (WSZOLEK, 2001; TRATNIK, 2006).

Tabela 9 - Teste de aceitação do quefir com polpa de graviola

Repetição	Média aceitação	% Aceitação
1	7,46	82,88
2	7,4	82,22
3	7,6	84,44
Média dos Testes	7,48	83,18

Os atributos sensoriais de leites fermentados, em geral, são influenciados, significativamente, pelo tipo de cultura lática utilizada no processo fermentativo. As culturas láticas ao fermentarem o leite produzem diversos ácidos orgânicos tais como: ácido cítrico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético dentre outros, que vão influenciar diretamente no sabor e odor dos leites fermentados (TORRE, 2003).

A aceitabilidade de um tipo de queijo popularmente conhecido na Turquia é maior quando se utiliza na sua fabricação o quefir como inóculo. Já a utilização de cultura de iogurte na fabricação deste mesmo queijo produziu um produto inaceitável pelos provadores (GONCU; ALPKENT, 2005).

Guzel-seydim (2000), observou mudanças na concentração dos ácidos orgânicos e nos componentes voláteis do flavor do quefir durante o período de estocagem refrigerada e constatou aumento significativo dos ácidos láctico e cítrico e outros grupos químicos como etanol e o acetaldeído. No entanto, o diacetil, um componente muito comum no flavor de produtos lácteos, não foi detectado durante o processo fermentativo e nem durante o tempo de estocagem do quefir.

A apreciação do flavor é governada pela percepção do aroma, sabor e textura dos alimentos (MARSHALL,1987). No presente trabalho, os provadores foram convidados a degustar a bebida e expressar sua opinião quanto ao sabor, mas muitos comentários em relação à textura e aroma foram observados. A adição de polpa de graviola ao quefir fez com que este apresentasse uma consistência bem menos viscosa quando comparado com o quefir natural. Quanto ao aroma, comentaram da semelhança ao aroma da coalhada.

Apesar da adição de 15% de polpa de graviola ao quefir, 5,5% dos provadores não perceberam o sabor da fruta na bebida. O quefir natural é uma bebida de sabor e aroma bem pronunciados, podendo ter mascarado o sabor da fruta que foi adicionada.

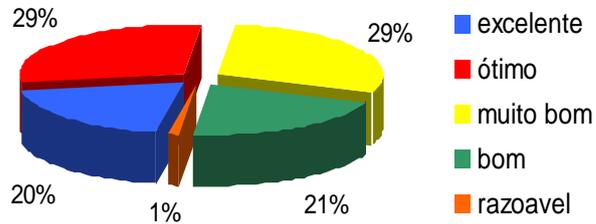
A aceitação média do quefir com polpa de graviola foi de 83,18% conforme mostra a tabela 9, indicando que o quefir, apesar de não ser fabricado industrialmente e pouco conhecido em nosso país, quando adicionado de polpa de fruta, poderá tornar-se uma boa opção para o mercado local.

Vários estudos têm investigado as propriedades e os benefícios do consumo do quefir à saúde humana, no entanto, estudos detalhados são necessários para que o quefir se torne uma bebida mais aceitável pelos consumidores, incrementando, assim, o seu consumo. Uma alternativa para o aumento da aceitabilidade do quefir é a adição de frutas ou de aromas de frutas. Pesquisas quanto às características sensoriais do quefir demonstraram que a adição de aroma de morango, amora e framboesa ao quefir poderá ser uma excelente alternativa para aumentar a sua aceitação (YILMAZ, 2006). A adição de aroma de pêsego ao quefir ou modificação no seu processo fermentativo adicionando-se *Lactococcus*, *Lactobacillus* ou leveduras, aumentam sua aceitabilidade, comparado ao quefir fabricado tradicionalmente (MUIR et al. 1999).

Para que um produto seja considerado como aceito, em termos de suas propriedades sensoriais, é necessário que se obtenha um índice de aceitabilidade de no mínimo 70% (TEIXEIRA, 1987). As características sensoriais determinam a aceitabilidade ou não de um produto. Os atributos sensoriais, tais como cor, odor, textura e o sabor entre outros, são fatores que influenciam a utilização em vários produtos, sendo que o sabor é a mais importante propriedade na determinação da aceitabilidade de um alimento (CHAIB, 1983).

A quantificação, em porcentagem, da qualidade sensorial do quefir atribuída pelos provadores pode ser observada no gráfico 1. Não foi atribuída nenhuma indicação ou índice negativo ao produto, tais como: não muito bom, ruim, muito ruim ou péssimo, que constavam na ficha do teste de aceitação da bebida.

Grafico 1- Teste de aceitabilidade do quefir com polpa de graviola



Irigoyen et al. (2005) avaliou a aceitabilidade do quefir natural produzido com 5% dos grãos como inóculo e constatou uma aceitação de 71,4% do quefir com 24 horas de estocagem refrigerada e de 35,7% no quefir com 14 dias de armazenagem refrigerada. A aceitabilidade do quefir com polpa de graviola foi superior à aceitação do quefir natural avaliado por Irigoyen. Não foi observado relatos na literatura de pesquisa da aceitabilidade do quefir com polpa de fruta.

6- CONCLUSÕES

- Todos os isolados dos grãos de quefir foram identificados como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sendo possivelmente o microrganismo predominante na microbiota dos grãos de quefir em estudo;
- A adição de polpa de fruta e açúcar ao quefir não influenciou no crescimento dos grupos de microrganismos analisados sendo eles: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, leveduras e bactérias acéticas;
- Todos os grupos de microrganismos avaliados obtiveram contagem aproximada de 10^9 UFC/mL no início do período de estocagem (tempo 0) decrescendo para aproximadamente 10^7 ufc/mL após 28 dias de armazenagem sob refrigeração;
- Os testes e análise sensorial realizados indicam que o produto teve uma aceitação muito boa a ótima;
- A adição de polpa de fruta e açúcar ao quefir natural influenciou nos valores de pH assim como o tempo de estocagem;
- A acidez aumentou progressivamente durante o tempo de estocagem não havendo, no entanto, interação entre os valores de acidez observados para o quefir natural e o quefir com polpa de graviola

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Characterization of milky kefir grains grown in milk and in soy milk. **Journal of Dairy Research**, v.66, p.327-333, 1999.
- ABRAHAMS, R.K.; HOLMEN, T.B. Goat's milk yoghurt made from non-homogenized milks, concentrated by different methods. **Journal of Dairy Science**, v.48, p.457-463, 1981.
- AL-KANAMANY, E.; KHATTAR, M.; HADDAD, T.; TOUFEILI, I. Estimation of shelf-life of concentrated yogurt by monitoring selected microbiological and physicochemical changes during storage. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.36, p.407-414, 2003.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, p. 171-176, 2002.
- ANGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C.. Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain). **Journal of Dairy Research**, v.60, p.263-267, 1993.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of analysis. 14 ed. Washington D. C.:AOAC, 1980 198 p
- ARAI, S. Studies on functional foods in Japan State of the art. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.60, p.9-15, 1996.
- ASSADI, M.M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.16, p.541-543, 2000.
- ATHANASIADIS, I.; BOSKOU, D.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A.A. Low-temperature alcoholic fermentation by delignified cellulosic material supported cells for kefir yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.4474-4477, 1999.
- BADIS, A.; GUETARNI, D.; BOUDJEMA, B.M.; HENNI, D.E.; TORNADIJO, M.E.; KIHAL, M. Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**, v.21, p.342-349, 2004a.
- BADIS, A.; GUETARNI, D.; BOUDJEMA, B.M.; HENNI, D.E.; KIHAL, M. Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk of four Algerian races. **Food Microbiology**, v.21, p.570-588, 2004b.
- BAXTER, K. Yogurt as a fast food, **Cultured Dairy Products Journal**, v.20, p.10-11, 1985.
- BESHKOVA, D.M.; SIMOVA, E.D.; SIMOV, G.I.; FRENGOVA, G.I.; SPASOV, Z.N. Pure cultures for making kefir. **Food Microbiology**, v.19, p.537-544, 2002.
- BONADÉ, A.; MURELLI, F.; VESCOVO, M.; SCOLARI, G. Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.33, p.153-158, 2001.

BORGES, V.C. Alimentos Funcionais: Prebióticos, Probióticos, Fitoquímicos e Simbióticos. In: WAITZBERG, D. L. **Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica**. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu p.1495-1509, 2000.

BRASIL, Ministério da Agricultura e Agropecuária, Padrões de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Resolução nº 5, de 13 de novembro de 2000. Publicada no **Diário Oficial da União** de 02 de janeiro de 2001, Seção I, p.19-22, 2000.

BRASIL, Portaria Nº 398 **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, de 30 de Abril de 1999 Disponível em WWW.anvisa.gov.br

BUTTRISS, J. Nutritional properties of fermented milk products. **International Journal of Dairy Technology**, v.50, p.21-27, 1997.

CHAIB, M.A. **Métodos para avaliação sensorial dos alimentos**. 4 ed. Campinas: Unicamp, 1983, 62p.

CHAVES, J. B. P. Avaliação Sensorial de Alimentos. **Imprensa Universitária**, U.F.V. Viçosa, MG, 1981.

COLLAR, C. Biochemical and technological assessment of the metabolism of pure and mixed cultures of yeast and lactic acid bacteria in bread making application s. **Food Science and Technology International**, v.2, p.349-367, 1996.

CONGAN, T.M.; BARBOSA, M.; BEUVIER, E.; BIANCHI-SALVADORI, B.; COCCONCELLI, P.S.; FERNANDES, I.; GOMEZ, J.; GOMEZ, R.; KALANTZOPoulos, G.; LEDDA, A.; MEDINA, M.; REA, M.; RODRIGUEZ, E. Characterization of the acid bacteria in artisanal dairy products. **Journal of Dairy Research**, v.64, p.409-421, 1997.

CZAMANSKI, R. T. Avaliação da atividade antibacteriana de filtrado de quefir artesanal **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, p.143-144, 2003.

DUGGAN, C.; GANNON, J.; WALKER, W.A. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract. **American Journal Clinical Nutrition**, v.75, p.789-808, 2002.

DUITSCHAEVER, C.L. What is kefir and how it can be made? **Modern Dairy**, v.68, p.18-19, 1989.

DOUSSET, X.; CAILLET, F. Aspects microbiologiques et biochimiques de la fermentation du kefir. **Microbiologie Aliments Nutrition**, v.11, p.463-470, 1993.

FAO/WHO. 2001. CODEX Stantard for Fermented Milks #243. Disponível em http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp

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

FERREIRA, C.L.L.F. Produtos lácteos fermentados: aspectos bioquímicos e tecnológicos. Viçosa: **Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa**, 1987, 94p.

FERREIRA, C.L.L.F. Tecnologia de produtos lácteos fermentados. Viçosa: **Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa**, 1992, 58p.

FERREIRA, C. L.L.; TESHIMA, E. Prebióticos, estratégia dietética para a manutenção da microbiota colônica desejável. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v.16, p.22-25, 2000.

FIGLER, M.; MÓZSIK, G.; SCHAFFER, B.; GASZTONYI, B.; ÁCS, P.; SZILI, B.; RAB, R.; SZAKÁLY, S. Effect of special Hungarian probiotic kefir on faecal microflora. **World Journal Gastroenterol**, v.12, p.1129-1132, 2006.

FONTÁN, M.C.G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I.; CARBALLO, J. Microbiological and chemical changes during the manufacture of kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. **International Dairy Journal**, v.16, p.762-767, 2006.

GAMBELLI, L.; MANZI, P.; PAN.LI, G.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L.. Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialized in Italy. **Food Chemistry**, v.66, p.353-358, 1999.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G.L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **Lebensmittel-Wiss Technology**, v.30, p.77-84, 1997.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G.L. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. **Journal of Dairy Research**, v.65, p.149-154, 1998.

GARROTE, G.; ABRAHAM, A.; DE ANTONI, G.L. Inhibitory power of kefir: The role de organic acids. **Journal of Food Protection**, v.63, p.364-369, 2000.

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

GIBSON, G.E ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic mibrobiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal Nutrition**, v.125 p.1401-1412, 1995.

GOMES, A.M.P.; MALCATA, F.X. Agentes Probióticos em Alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas **Boletim de Biotecnologia Alimentar**, p.12-22, 1998.

GONCU, A.; ALPKENT, Z. Sensory and chemical properties of white pickled cheese produced using kefir, yoghurt or uma commercial cheese culture as a starter. **International Dairy Journal**, v.15, p.771-776, 2005.

GULMEZ M.; GUVEN, A. Note: Behavior os *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b e *Yersinia enterocolitica* 03 in Pasteurised and Non-pasteurized Kefir Fermented for One or Two Days. **Food Science and Technology International**, v.9, p. 365-370, 2003.

GURR, I.M. Nutritional aspects of fermented milk products. **FEMS Microbiology Reviews**, v.46, p.337-342, 1987.

GUVEN A.; GUVEN A.; GÜLMEZ M. The Effect of kefir on the Activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH, and LPO Levels in Carbon Tetrachloride-Induced Mice Tissues. **Journal Veterinary Medicinal B**, v.50, p.412-416, 2003.

GUZEL-SEYDİM Z.; SEYDİM, A.C.; GREENE, A.K Organic Acids and Volatile Flavor Components Evolved During Refrigerated Storage of Kefir. **Journal of Dairy Science**, v.83 p.275-277, 2000.

GUZEL-SEYDİM, Z.; WYFFELS, J. T.; SEYDİM, A. C.; GREENE, A. K. Turkish Kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscopic observation. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, p.275-277, 2005.

HARTA, O.; ICONOMOPOULOU, M.; BEKATOROU, A.; NIGAM, P.; KONTOMINAS, M.; KOUTINAS, A.A. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. **Food Chemistry**, v.88, p.237-242, 2004.

HASLER, C. M. Functional Food: Your role in the prevention of diseases and in the promotion of the health. **Food Technology**, v.52, p.57-62, 1998.

HERTZLER S.R.; CLANCY S.M. kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v.13, p.582-587, 2003.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v.35, p.109-116, 2002.

IAL (Instituto Adolfo Lutz) Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz – métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 3 ed. **São Paulo**: IAL, 1985 v.3 533p.

IRIGOYEN, A.; ARANA I.; CASTIELLA M.; TORRES P.; IBÁÑEZ F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chemistry**, v.90 p.613-620, 2005.

ISMAIL, A.A.; EL-NOCKRASHY, S.A.; KHORSHID, M.A. A beverage from separated buffalo milk fermented with kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v.36, p.117-118, 1983.

JAMUNA, M.; JEEVARATNAM, K. Isolation and characterization of *Lactobacilli* from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocin. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.50, p.79-90, 2004.

KATSIARI, M.C.; VOUTSINAS, L.P.; KONDYLI, E. Manufacture of yoghurt from stored frozen sheep's milk. **Food Chemistry**, v.77, p.413-420, 2002.

KEMPLER, G.M.; McKAY, L.L. Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. **Journal of Dairy Science**, v.64, p.1527-1539, 1981.

KNEIFEL, W.; MAYER, H.K. Vitamin profiles of kefirs made from milks of different species. **International Journal of Food Science and Technology**, v.26, p.423-428, 1991.

KOROLEVA, N.S. Technology of kefir and kumys. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.227, p.96-100, 1988.

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

LIBUDZISZ, Z.; PIATKIEWICZ, A. Kefir production in Poland. **Dairy Industry International**, v.55, p.31-33, 1990.

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

LIU, J-R.; WANG, S-Y.; LIN, Y-Y.; LIN, C-W. Antitumor Activity of Milk Kefir and Soy Milk Kefir in Tumor-Bearing Mice. **Nutrition and Cancer**, v.44, p.183-187, 2002.

MAINVILLE, I.; ROBERT, N.; LEE, B.; FARNWORTH, R.E. Polyphasic characterization of the lactic acid bacteria in kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p.59-68, 2006.

MARQUINA D.; SANTOS A.; CORPAS I.; MUÑOZ J.; ZAZO J.; PEINADO J.M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, v.35 p.136-140, 2002.

MARSHALL, M.V. Lactic acid bacteria: starters for flavour. **FEMS Microbiology Reviews**, v.46, p.327-336, 1987.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; FLOURIÉ, B.; PELLIER, P.; SANTOS, L.; DESJEUX, J-F.; RAMBAUD, J-C. Effect of chronic ingestion of a fermented dairy product containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* on metabolic activities of the colonic flora in humans. **American Journal Clinical Nutrition**, v.52, p.685-688, 1990.

MESQUIARI, Mayara. Desenvolvimento tecnológico de um sucedâneo de quefir-iofir® 1999. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MESSENS, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.72, p.31-43, 2002.

MILNER, J.A. Functional foods and health promotion. **The Journal of Nutrition**, v.129, p.1395-1402, 1999.

MOTAGHI, M.; MAZAHERI, M.; MOAZAMI, N.; FARKHONDEH, M.H.; GOLTAPPEH, E.M. Kefir production in Iran. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.579-581, 1997.

MUIR, D.D.; TAMINE, A.Y.; WSZOLEK, M. Comparison of the sensory profiles of kefir, buttermilk and yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v.52, p.129-134, 1999.

OLIVEIRA A.P.; ALVES G.L.; FRANCO M.R.B. Identificação dos Compostos Voláteis da Graviola e sua Importância ao Aroma da Fruta. **Resumo XI Congresso Interno de Iniciação Científica da UNICAMP**, 2003.

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

PEDRERO, A.L.; PANGBORN, R.M. **Evaluacion sensorila de los alimentos: Método Analíticos**. México: Alambra, 1997.

PLESSAS, S.; PHERSON, L.; BEKATOROU, A.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A.A. Bread making using kefir grains as baker's yeast. **Food Chemistry**, v.93, p.585-589, 2005.

PINTADO, M.E.; LOPES, S.J.A.; FERNANDES, P.B.; MALCATA, F.X.; HOGG, T.A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v.31, p.15-26, 1996.

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

RIMADA, P.S.; ABRAHAM, A.G. Polysaccharide production by kefir grains during whey fermentation. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.653-661, 2000.

ROBERFROID, M.D.; VAN LOO, J.A.E.; GIBSON, G.R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1-9, 1998.

ROBERTS, B. Fermented Milks of Ukraine. **Dairy Foods**, v.107, p.44-45, 2006.

RODRIGUES, K.L.; CARVALHO, J.C.T.; SCHNEEDORF, J.M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v.13, p.485-492, 2005a.

RODRIGUES, K.L.; CAPUTO, L.R.G.; CARVALHO, J.C.T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J.M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.404-408, 2005b.

SALGADO, S.M.; GUERRA, N.B.; MELO FILHO, A.B. Polpa de Fruta Congelada: Efeito do Processamento Sobre o Conteúdo de fibra Alimentar **Revista de Nutrição Campinas**, v.12, p.303-308, 1999.

SALOFF-COSTE, C. J. Kefir **Danone World Newsletter**, n^o:11, 1996.

SÁNCHEZ M.M., DELGADO T., ALONSO L., MAYO B. Phenotypic and genetic characterization of a selected set of *Lactococcus lactis* strains isolated from a starter-free farmhouse cheese. **Food Microbiology**, v.17, p.449-460, 2000.

SANTOS A., MAURO M. S., SANCHEZ A., TORRES J.M. E MARQUINA D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* ssp. Isolated from Kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, v.26 p.434-437, 2003.

SCHIFFRIN, E.J.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J.M.; DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v.78, p.491-497, 1995.

SCHOEVERS, A.; BRITZ, T.J. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. **International Journal of Dairy Technology**, v.56 p.183-187, 2003.

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L.; COSTA Jr, L.C.G. Físico-química do leite e derivados – métodos analíticos. Juiz de Fora: **Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda.**, 1997. 190p.

SIMOVA, E.; BESHKOVA, D.; ANGELOV, A.; HRISTOZOVA TS.; FREGOVA, G.; SPASOV, Z. Lacti acid bactéria and yeasts in kefir grains and kefir made from them **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.28, p.1-6, 2002.

STONE, Herbert; SIDEL, Joel L.. **Sensory evaluation practices**. Redwood City : Academic Press, 1985, 311 p.

ST-ONGE, M-P.; FARNWORTH, E.R.; SAVARD, T.; CHABOT, D.; MAFU, A.; JONES, P.JH. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.2, p.1-7, 2002.

TAHARA, T.; KANATANI, K. Isolation and partial amino acid sequence of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.61, p.884-886, 1997.

TAMAI, Y.; YOSHIMITSU, N.; WATANABE, Y.; KUWABARA, Y.; NAGAI, S. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.81, p.181–182, 1996.

TAYLOR L. **Technical Data Report for Graviola (*Annona muricata*)** Proprinted from Herbal Secrets of the Rainforest, 2 edition, 2002.

TEIXEIRA, E; MEINERT. E, BARBETA, P. A. **Análise sensorial dos alimentos**. Florianópolis: ed da UFSC, 1987, 180p.

THOUREX K.; SCHMUCKER L.D. Kefir Milk Enhances Intestinal Immunity in Young but Not Old Rats. **Journal Nutrition**, v.131, p.807-812, 2001.

TOMOMATSU, H. Health Effects of Oligosaccharides. **Food Technology**, v.48, p.61-65, 1994.

TORRES, L.L.; TAMINE, Y.A.; MUIR, D.D. Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, 2003.

TRATNIK, L.; ANIC, B.R.; HERCEG, Z.; DRGALIC, I. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. **International Journal of Dairy Technology**, v.59, p.40-46, 2006.

VIDEROLEVA, G.C.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v.72, p.195-202, 2005.

VIDEROLEVA, G.C.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology** v.211, p.149-156, 2006a.

VIDEROLEVA, G.C.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of the oral administration of de products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research** v.73, p.472-479, 2006b.

YILMAZ, L.; YILSAY, O.T.; BAYIZIT, A.A. The sensory characteristics of berry-flavoured kefir. **Journol Food Science**, v.24, p.26-32, 2006.

YUKSEKDAG, Z.N.; BEYATLI, Y.; ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish Kefirs with natural probiotic. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 37, p. 663-667, 2004.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v.57, p.33-37, 2004.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, v.22, p.337-344, 2005.

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

ZAMFIR, M.; CALLEWAERT, R.; COENEEA, P.C.; SAVU, L.; VATAFU, I.; DE VUYST, L. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.923-931, 1999.

ZOURARI, A.; ANIFANTAKIS, E.M. Le kefir caracteres physico-chimiques, microbiologiques et nutrionnels. Technologie de production.Une revue. **Le Lait** v. 68, p. 373-392, 1988.

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

APÊNDICE A - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análise Estatística Descritiva para *Lactobacillus*

Resultados para Tempo = T0

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	5	9,1319	0,0673	0,1505	8,9685	8,9776	9,1523
	Controle	5	9,1752	0,0141	0,0316	9,1303	9,1459	9,1761

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	9,2760	9,2967
	Controle	9,2040	9,2122

Resultados para Tempo = T7

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	5	8,455	0,171	0,383	8,037	8,049	8,572
	Controle	5	8,9048	0,0332	0,0741	8,8062	8,8318	8,9096

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	8,802	8,826
	Controle	8,9754	8,9777

Resultados para Tempo = T14

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	5	7,9386	0,0749	0,1674	7,7634	7,7671	7,9638
	Controle	5	8,2490	0,0972	0,2174	8,0170	8,0232	8,2900

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	8,0974	8,1303
	Controle	8,4542	8,4771

Resultados para Tempo = T21

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	5	7,6641	0,0746	0,1669	7,4771	7,5043	7,6902
	Controle	5	7,6457	0,0733	0,1638	7,4624	7,4769	7,6693

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	7,8110	7,8976
	Controle	7,8028	7,8062

Resultados para Tempo = T28

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	5	7,566	0,141	0,316	7,230	7,233	7,648
	Controle	5	7,2452	0,0792	0,1771	7,0569	7,0625	7,2718

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactobacillus</i>	Bebida	7,857	7,875
	Controle	7,4147	7,4314

Análise de Variância para *Lactobacillus*

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tempo	4	20,7910	20,7910	5,1978	119,08	0,000
Produto	1	0,1080	0,1080	0,1080	2,48	0,124
Tempo*Produto	4	0,9012	0,9012	0,2253	5,16	0,002
Error	40	1,7460	1,7460	0,0436		
Total	49	23,5463				

Teste de TukeyResponse Variável *Lactobacillus*

All Pairwise Comparisons among Levels de Tempo

Tempo = T0 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T1	-0,474	0,1107	-4,28	0,0009
T2	-1,060	0,1107	-9,58	0,0000
T3	-1,499	0,1107	-13,54	0,0000
T4	-1,748	0,1107	-15,80	0,0000

Tempo = T1 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T2	-0,586	0,1107	-5,30	0,0000
T3	-1,025	0,1107	-9,26	0,0000
T4	-1,274	0,1107	-11,52	0,0000

Tempo = T2 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T3	-0,4389	0,1107	-3,966	0,0023
T4	-0,6883	0,1107	-6,220	0,0000

Tempo = T3 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T4	-0,2495	0,1107	-2,255	0,1789

Análise Estatística Descritiva para *Lactococcus*

Resultados para Tempo = T0

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactococcus</i>	Bebida	5	9,1238	0,0379	0,0849	9,0334	9,0374	9,1303
	Controle	5	9,1904	0,0363	0,0813	9,1072	9,1089	9,1959

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactococcus</i>	Bebida	9,2068	9,2095
	Controle	9,2691	9,2878

Resultados para Tempo = T1

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactococcus</i>	Bebida	5	8,421	0,154	0,344	8,053	8,066	8,522
	Controle	5	8,8431	0,00920	0,0206	8,8195	8,8260	8,8432

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactococcus</i>	Bebida	8,726	8,839
	Controle	8,8601	8,8751

Resultados para Tempo = T2

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
<i>Lactococcus</i>	Bebida	5	7,902	0,137	0,307	7,556	7,579	7,981	8,186
	Controle	5	8,293	0,127	0,285	8,000	8,011	8,286	8,580

Variável	Produto	Maximum
<i>Lactococcus</i>	Bebida	8,190
	Controle	8,580

Resultados para Tempo = T3

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactococcus</i>	Bebida	5	7,6166	0,0774	0,1730	7,3979	7,4447	7,6435
	Controle	5	7,5725	0,0640	0,1431	7,3979	7,4302	7,5911

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactococcus</i>	Bebida	7,7752	7,8261
	Controle	7,7055	7,7482

Resultados para Tempo = T4

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
<i>Lactococcus</i>	Bebida	5	7,485	0,170	0,380	7,041	7,083	7,600
	Controle	5	7,1124	0,0895	0,2001	6,8573	6,9082	7,1461

Variável	Produto	Q3	Maximum
<i>Lactococcus</i>	Bebida	7,829	7,839
	Controle	7,2998	7,3096

Análises de Variância para Lactococcus

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tempo	4	22,8270	22,8270	5,7067	105,12	0,000
Produto	1	0,1072	0,1072	0,1072	1,97	0,168
Tempo*Produto	4	1,0822	1,0822	0,2706	4,98	0,002
Error	40	2,1716	2,1716	0,0543		
Total	49	26,1879				

Teste de Tukey

Response Variável Lactococcus
 All Pairwise Comparisons among Levels de Tempo
 Tempo = T0 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T1	-0,525	0,1222	-4,29	0,0008
T2	-1,059	0,1222	-8,67	0,0000
T3	-1,563	0,1222	-12,78	0,0000
T4	-1,859	0,1222	-15,21	0,0000

Tempo = T1 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T2	-0,534	0,1222	-4,37	0,0007
T3	-1,038	0,1222	-8,49	0,0000
T4	-1,334	0,1222	-10,91	0,0000

Tempo = T2 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T3	-0,5032	0,1222	-4,117	0,0015
T4	-0,7992	0,1222	-6,539	0,0000

Tempo = T3 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T4	-0,2960	0,1222	-2,422	0,1282

Análise Estatística Descritiva para Leveduras

Resultados para Tempo = T0

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Leveduras	Bebida	5	9,0902	0,0511	0,1143	8,9542	8,9660	9,1553
	Controle	5	9,1249	0,0219	0,0491	9,0719	9,0755	9,1303

Variável	Produto	Q3	Maximum
Leveduras	Bebida	9,1818	9,1903
	Controle	9,1715	9,1847

Resultados para Tempo = T1

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Leveduras	Bebida	5	8,456	0,122	0,274	8,161	8,169	8,520
	Controle	5	8,8347	0,0308	0,0688	8,7243	8,7752	8,8388

Variável	Produto	Q3	Maximum
Leveduras	Bebida	8,712	8,716
	Controle	8,8921	8,8976

Resultados para Tempo = T2

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
Leveduras	Bebida	5	7,923	0,109	0,244	7,633	7,671	7,974	8,149
	Controle	5	8,254	0,110	0,246	7,982	7,998	8,307	8,484

Variável	Produto	Maximum
Leveduras	Bebida	8,190
	Controle	8,505

Resultados para Tempo = T3

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Leveduras	Bebida	5	7,5488	0,0672	0,1502	7,3222	7,4068	7,5682
	Controle	5	7,5110	0,0405	0,0905	7,3979	7,4225	7,5185

Variável	Produto	Q3	Maximum
Leveduras	Bebida	7,6811	7,6902
	Controle	7,5957	7,6232

Resultados para Tempo = T4

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
Leveduras	Bebida	5	7,512	0,161	0,360	7,134	7,150	7,520	7,869
	Controle	5	7,240	0,142	0,317	6,881	6,905	7,326	7,531

Variável	Produto	Maximum
Leveduras	Bebida	7,886
	Controle	7,544

Análises de Variância para Leveduras

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tempo	4	21,5006	21,5006	5,3752	112,93	0,000
Produto	1	0,0946	0,0946	0,0946	1,99	0,166
Tempo*Produto	4	0,7296	0,7296	0,1824	3,83	0,010
Error	40	1,9040	1,9040	0,0476		
Total	49	24,2288				

Teste de Tukey

Response Variável Leveduras

All Pairwise Comparisons among Levels de Tempo

Tempo = T0 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T1	-0,462	0,1101	-4,20	0,0011
T2	-1,019	0,1101	-9,26	0,0000
T3	-1,578	0,1101	-14,33	0,0000
T4	-1,732	0,1101	-15,73	0,0000

Tempo = T1 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T2	-0,557	0,1101	-5,06	0,0001
T3	-1,116	0,1101	-10,13	0,0000
T4	-1,270	0,1101	-11,53	0,0000

Tempo = T2 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T3	-0,5584	0,1101	-5,071	0,0001
T4	-0,7125	0,1101	-6,471	0,0000

Tempo = T3 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T4	-0,1542	0,1101	-1,400	0,6309

Análise Estatística descritiva para Leveduras

Resultados para Tempo = T0

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Bactérias Acétic	Bebida	5	9,0980	0,0730	0,1632	8,9138	8,9316	9,1139
	Controle	5	9,1121	0,0234	0,0523	9,0531	9,0550	9,1461

Variável	Produto	Q3	Maximum
Bactérias Acétic	Bebida	9,2565	9,2601
	Controle	9,1523	9,1553

Resultados para Tempo = T1

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Bactérias Acétic	Bebida	5	8,490	0,135	0,303	8,164	8,173	8,567
	Controle	5	8,8495	0,0415	0,0929	8,7404	8,7556	8,8573

Variável	Produto	Q3	Maximum
Bactérias Acétic	Bebida	8,768	8,820
	Controle	8,9394	8,9494

Resultados para Tempo = T2

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Bactérias Acétic	Bebida	5	7,949	0,157	0,351	7,431	7,601	8,041
	Controle	5	8,1587	0,0633	0,1415	7,9823	8,0157	8,1761

Variável	Produto	Q3	Maximum
Bactérias Acétic	Bebida	8,251	8,272
	Controle	8,2930	8,3096

Resultados para Tempo = T3

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Bactérias Acétic	Bebida	5	7,6197	0,0134	0,0300	7,5798	7,5909	7,6201
	Controle	5	7,5342	0,0467	0,1045	7,3979	7,4302	7,5441

Variável	Produto	Q3	Maximum
Bactérias Acétic	Bebida	7,6483	7,6532
	Controle	7,6334	7,6435

Resultados para Tempo = T4

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median
Bactérias Acétic	Bebida	5	7,548	0,174	0,389	7,143	7,152	7,577
	Controle	5	7,079	0,157	0,351	6,663	6,705	7,212

Variável	Produto	Q3	Maximum
Bactérias Acétic	Bebida	7,929	7,929
	Controle	7,385	7,431

Análises de Variância para Bactérias Acéticas

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tempo	4	22,1951	22,1951	5,5488	99,31	0,000
Produto	1	0,0004	0,0004	0,0004	0,01	0,933
Tempo*Produto	4	1,0028	1,0028	0,2507	4,49	0,004
Error	40	2,2348	2,2348	0,0559		
Total	49	25,4332				

Teste de Tukey

Response Variável Bactérias Acéticas

All Pairwise Comparisons among Levels de Tempo
Tempo = T0 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T1	-0,435	0,1200	-3,63	0,0062
T2	-1,051	0,1200	-8,76	0,0000
T3	-1,528	0,1200	-12,74	0,0000
T4	-1,792	0,1200	-14,94	0,0000

Tempo = T1 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T2	-0,616	0,1200	-5,13	0,0001
T3	-1,093	0,1200	-9,11	0,0000
T4	-1,356	0,1200	-11,31	0,0000

Tempo = T2 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T3	-0,4770	0,1200	-3,976	0,0022
T4	-0,7406	0,1200	-6,173	0,0000

Tempo = T3 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T4	-0,2636	0,1200	-2,197	0,1994

Análise Estatística Descritiva para pH

Resultados para Tempo = T0

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
pH	Bebida	5	4,1900	0,00447	0,0100	4,1800	4,1800	4,1900	4,2000
	Controle	5	4,2540	0,0157	0,0351	4,2200	4,2200	4,2500	4,2900

Variável	Produto	Maximum
pH	Bebida	4,2000
	Controle	4,2900

Resultados para Tempo = T1

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
pH	Bebida	5	4,1880	0,0269	0,0602	4,1300	4,1300	4,1800	4,2500
	Controle	5	4,2940	0,0157	0,0351	4,2600	4,2600	4,2900	4,3300

Variável	Produto	Maximum
pH	Bebida	4,2500
	Controle	4,3300

Resultados para Tempo = T2

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1
pH	Bebida	5	4,2400	0,000000000	0,000000000	4,2400	4,2400
	Controle	5	4,2840	0,0201	0,0451	4,2400	4,2400

Variável	Produto	Median	Q3	Maximum
pH	Bebida	4,2400	4,2400	4,2400
	Controle	4,2800	4,3300	4,3300

Resultados para Tempo = T3

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
pH	Bebida	5	4,2400	0,00894	0,0200	4,2200	4,2200	4,2400	4,2600
	Controle	5	4,2440	0,00678	0,0152	4,2300	4,2300	4,2400	4,2600

Variável	Produto	Maximum
pH	Bebida	4,2600
	Controle	4,2600

Resultados para Tempo = T4

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
pH	Bebida	5	4,3040	0,0291	0,0650	4,2400	4,2400	4,3000	4,3700
	Controle	5	4,3540	0,0112	0,0251	4,3100	4,3350	4,3600	4,3700

Variável	Produto	Maximum
pH	Bebida	4,3700
	Controle	4,3700

Análise de variância para o pH

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tempo	4	0,068908	0,068908	0,017227	12,57	0,000
Produto	1	0,035912	0,035912	0,035912	26,21	0,000
Tempo*Produto	4	0,013548	0,013548	0,003387	2,47	0,060
Error	40	0,054800	0,054800	0,001370		
Total	49	0,173168				

S = 0,0370135 R-Sq = 68,35% R-Sq(adj) = 61,23%

Teste de Tukey

Response Variável pH
All Pairwise Comparisons among Levels de Tempo
Tempo = T0 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T1	0,01900	0,01763	1,078	0,8168
T2	0,04000	0,01763	2,269	0,1743
T3	0,02000	0,01763	1,135	0,7874

T4 0,10700 0,01763 6,071 0,0000

Tempo = T1 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T2	0,021000	0,01763	1,19143	0,7562
T3	0,001000	0,01763	0,05673	1,0000
T4	0,088000	0,01763	4,99265	0,0001

Tempo = T2 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T3	-0,02000	0,01763	-1,135	0,7874
T4	0,06700	0,01763	3,801	0,0038

Tempo = T3 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T4	0,08700	0,01763	4,936	0,0001

Análise Estatística Descritiva para acidez

Resultados para Tempo = T0

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
acidez	Bebida	5	1,2520	0,0132	0,0295	1,2300	1,2300	1,2400	1,2800
	Controle	5	1,2680	0,0156	0,0349	1,2100	1,2400	1,2700	1,2950

Variável	Produto	Maximum
acidez	Bebida	1,3000
	Controle	1,3000

Resultados para Tempo = T1

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
acidez	Bebida	5	1,3240	0,0112	0,0251	1,3000	1,3000	1,3200	1,3500
	Controle	5	1,4180	0,0254	0,0567	1,3700	1,3750	1,3800	1,4800

Variável	Produto	Maximum
acidez	Bebida	1,3500
	Controle	1,4800

Resultados para Tempo = T2

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
acidez	Bebida	5	1,3500	0,0205	0,0458	1,3000	1,3000	1,3800	1,3850
	Controle	5	1,4320	0,0196	0,0438	1,4000	1,4000	1,4000	1,4800

Variável	Produto	Maximum
acidez	Bebida	1,3900
	Controle	1,4800

Resultados para Tempo = T3

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
acidez	Bebida	5	1,3960	0,0312	0,0699	1,3200	1,3200	1,4400	1,4500
	Controle	5	1,4780	0,0254	0,0567	1,4300	1,4350	1,4400	1,5400

Variável	Produto	Maximum
acidez	Bebida	1,4600
	Controle	1,5400

Resultados para Tempo = T4

Variável	Produto	N	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Q1	Median	Q3
acidez	Bebida	5	1,4060	0,0271	0,0607	1,3400	1,3400	1,4400	1,4550
	Controle	5	1,4800	0,0245	0,0548	1,4400	1,4400	1,4400	1,5400

Variável	Produto	Maximum
acidez	Bebida	1,4600
	Controle	1,5400

Análises de Variância para acidez

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tempo	4	0,218192	0,218192	0,054548	22,05	0,000
Produto	1	0,060552	0,060552	0,060552	24,48	0,000
Tempo*Produto	4	0,009488	0,009488	0,002372	0,96	0,441
Error	40	0,098960	0,098960	0,002474		
Total	49	0,387192				

Teste de Tukey

Response Variável acidez
All Pairwise Comparisons among Levels de Tempo
Tempo = T0 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T1	0,1110	0,02220	4,999	0,0001
T2	0,1310	0,02220	5,900	0,0000
T3	0,1770	0,02220	7,972	0,0000
T4	0,1830	0,02220	8,242	0,0000

Tempo = T1 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T2	0,02000	0,02220	0,9008	0,8950
T3	0,06600	0,02220	2,9727	0,0365
T4	0,07200	0,02220	3,2429	0,0183

Tempo = T2 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T3	0,04600	0,02220	2,072	0,2504
T4	0,05200	0,02220	2,342	0,1511

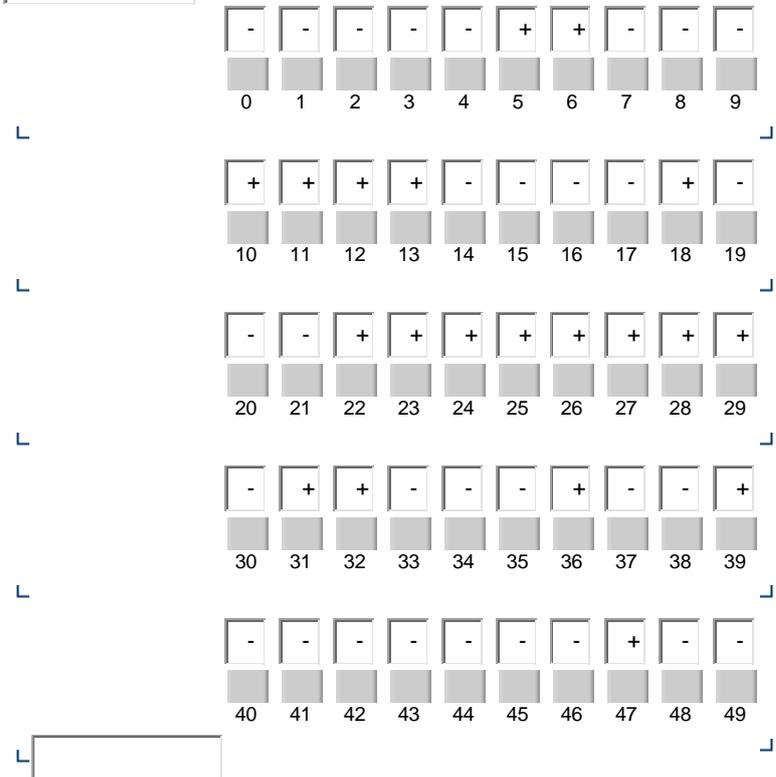
Tempo = T3 subtracted from:

Tempo	Difference de Means	SE de Difference	T-Value	Adjusted P-Value
T4	0,006000	0,02220	0,2702	0,9988

**APÊDICE B - IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PELO
PROGRAMA API 50 CHL V5.1**

API 50 CHL V5.1

false



REFERÊNCIA

IIGQ5, IGQ17, IGQ21, IGQ26, IGQ29 e IGQ30

DATA

22-11-2006

COMENTÁRIO

EXCELENTE IDENTIFICAÇÃO

Galeria	API 50 CHL V5.1
Perfil	-----+-----++++-----+-----+++++++++-----+-----+-----
Nota(s)	

Taxons significativos	% ID	T	Teste(s) por aproximação
Lactococcus lactis ssp lactis 1	99.9	0.95	

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) por aproximação
Lactobacillus brevis 1	0.1	0.61	AMD 0%

API 50 CHL V5.1

false

-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29

-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49

REFERÊNCIA **DATA**
 IGQ20 22-11-2006
COMENTÁRIO

MUITO BOA IDENTIFICAÇÃO

Galeria	API 50 CHL V5.1
Perfil	-----++++-----++++-----++++++++-----
Nota(s)	

Taxons significativos	% ID	T	Teste(s) por aproximação
Lactococcus lactis ssp lactis 1	99.2	0.98	
Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) por aproximação
Lactococcus lactis ssp lactis 2	0.7	0.65	DXYL 1% MAN 20% SAC 20%

API 50 CHL V5.1

false

-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29

-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
30	31	32	33	34	35	36	37	38	39

-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	41	42	43	44	45	46	47	48	49



REFERÊNCIA **DATA**
 IGQ13 22-11-2006
COMENTÁRIO

BOA IDENTIFICAÇÃO

Galeria	API 50 CHL V5.1
Perfil	-----++++-----++++-----++++-----++++-----
Nota(s)	

Taxons significativos	% ID	T	Teste(s) por aproximação
Lactococcus lactis ssp lactis 1	96.8	0.98	

Taxon seguinte	% ID	T	Teste(s) por aproximação
Lactobacillus brevis 1	1.6	0.84	GNT 85%

API 50 CHL V5.1

**APÊNDICE C – VALORES ATRIBUIDOS AO QUEFIR PELOS
PROVADORES DURANTE O TESTE DE ACEITAÇÃO**

Valores atribuídos ao quefir no teste de aceitação

Provdador	Repetição 01	Repetição 02	Repetição 03
1	9	8	6
2	8	9	6
3	8	7	8
4	7	7	7
5	9	8	8
6	8	8	7
7	6	7	8
8	9	8	7
9	7	7	8
10	6	7	7
11	9	8	7
12	7	9	9
13	9	6	9
14	6	8	8
15	8	9	6
16	8	6	7
17	7	7	9
18	8	8	6
19	7	9	8
20	7	6	7
21	8	8	9
22	6	6	6
23	7	9	8
24	8	6	7
25	6	7	9
26	7	6	5
27	6	7	8
28	7	9	7
29	8	7	8
30	9	8	9
Total	224	222	228
Média	7,46	7,4	7,6

Média geral **7,48**