

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

TESE DE DOUTORADO

ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA
DE PRODUTOS LÁCTEOS OBTIDOS A BASE DE KEFIR

SIMONE WESCHENFELDER

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS (PPGCTA)

**ELABORAÇÃO E AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA
DE PRODUTOS LÁCTEOS OBTIDOS A BASE DE KEFIR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como um dos requisitos para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Simone Weschenfelder

Bacharel em Química Industrial de Alimentos

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Porto Alegre

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Weschenfelder, Simone

Elaboração e avaliação físico-química e microbiológica de produtos lácteos obtidos a base de kefir / Simone Weschenfelder. -- 2016.

113 f.

Orientadora: José Maria Wiest.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Leite fermentado kefir. 2. Atividade antibacteriana. 3. Composição físico-química. 4. Queijo de kefir. 5. Soro de kefir. I. Wiest, José Maria, orient. II. Título.

Simone Weschenfelder

TESE DE DOUTORADO

**Elaboração e avaliação físico-química e microbiológica de produtos lácteos obtidos
a base de kefir**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

DOUTORA EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 22/02/2016

Pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. José Maria Wiest

Orientador – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Eduardo César Tondo

PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. Guiomar Pedro Bergmann

PPGAOA/UFRGS

Prof^a. Dr^a. Gilberti Helena Hübscher

Lopes

Departamento de Tecnologia e Ciência
dos Alimentos - UFSM

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os jovens oriundos do meio rural e que estudaram em escolas públicas. Pessoas que encararam o desafio de lutar por seus sonhos, deixando de lado casa, família e amigos para desbravar os grandes centros urbanos e as grandes universidades.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer a Deus, pela vida, pela saúde e por me ajudar a manter a serenidade necessária frente aos obstáculos enfrentados.

A toda família, que sempre esteve comigo. De modo especial a minha mãe Ida, meu pai Mario, meus irmãos Franciele e Cristiano, muito obrigada pelo amor, pelas orações e pela força. A minha sobrinha Ana Clara, que encanta e traz vida, amor e alegria por onde passa. Amo muito todos vocês.

Ao Leandro, que esteve comigo ao longo dos últimos anos, acompanhando o lado bom e os momentos de dificuldades.

A todos os amigos, de modo especial ao Marcelo e a Carin, que compartilharam angustias e conquistas. Sem vocês eu não teria conseguido, obrigada de coração.

Aos alunos, colegas e bolsistas do programa de pós-graduação.

Ao meu orientador, professor José Maria e a professora Heloisa. O que aprendi com vocês foi muito além da área acadêmica, vou levar essa experiência por toda minha vida.

Aos professores que fizeram parte da banca na qualificação do projeto e da defesa da tese, obrigada pelas contribuições.

Aos professores do programa de pós-graduação e da UFRGS pelos ensinamentos.

Aos alunos, colegas de trabalho e amigos da Universidade Feevale, com os quais muito aprendi ao longo dos últimos anos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

A crescente busca por uma alimentação mais saudável e com valor agregado aumenta a necessidade de desenvolvimento de pesquisas que visem não só conhecer os alimentos, como também desenvolver e caracterizar novos produtos. Assim é fundamental que profissionais da área técnica que atuam em indústrias de alimentos e em institutos de pesquisa, trabalhem em conjunto com os profissionais da área da saúde, contribuindo para a prevenção de doenças e promoção da saúde da população. O objetivo geral do estudo foi elaborar e avaliar a atividade antibacteriana *in loco* de derivados lácteos elaborados a partir de grãos de kefir frente a microrganismos padrão de interesse em alimentos; e determinar a composição físico-química e microbiológica dos produtos. Inicialmente duas formulações de leite fermentado kefir (kefir 1 e 2) foram elaboradas, a primeira com leite pasteurizado e grãos de kefir e a segunda com leite pasteurizado, leite em pó e grãos de kefir. A composição centesimal e de minerais foi avaliada no leite utilizado como matéria-prima e nas formulações de leite fermentado, onde determinou-se também o pH e foi realizada a contagem de bactérias lácticas totais. Com base na composição centesimal do kefir, foi verificada a possibilidade de atribuição de propriedade nutricional ao alimento e a conformidade em relação ao regulamento técnico de identidade e qualidade dos leites fermentados. Na sequência, duas formulações de queijo (Q1 e Q2) e soro (S1 e S2) de kefir foram elaboradas a partir da coagulação microbiana realizada com grãos de kefir e determinada a composição centesimal e o pH. Cinco diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11229) referidas no estudo como A, B, C, D e E (sendo $A > B > C > D > E$) foram inoculadas nas formulações de kefir, queijo e soro, sendo determinada a atividade antibacteriana *in loco* após 0, 24, 48 e 72 horas de confronto. Paralelamente cinco lotes de dez marcas comerciais de leite pasteurizado e leite UHT foram avaliados quanto à conformidade em relação à legislação de rotulagem e aos padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira. As formulações de kefir apresentaram atividade antibacteriana significativa frente às diferentes densidades populacionais dos patógenos em estudo após de 24 horas de exposição, não sendo observada atividade antibacteriana entre 24 e 72 horas de confronto. Kefir 1 e 2 atenderam aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos previstos no regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados avaliados no estudo. A formulação 1 pode receber a declaração de “fonte de proteínas”, “reduzido em calorias” e “baixo teor de sódio” e a formulação 2 de “alto conteúdo de proteínas”, “baixo teor de sódio” e “alto conteúdo de zinco”. As formulações de queijo e soro de kefir também apresentaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos alimentares testados, principalmente após 24 horas de confronto. A atividade antibacteriana foi mais intensa frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229), obtendo-se atividade antibacteriana máxima após 48 e 72 horas de confronto de Q1, Q2, S1 e S2 com diferentes densidades populacionais do microrganismo testadas. As formulações do soro de kefir foram as que apresentaram maior atividade antibacteriana quando comparadas com o kefir e o queijo. Todas as marcas comerciais de leite avaliadas estavam em conformidade com a legislação brasileira de rotulagem. Uma marca de leite pasteurizado integral e três marcas de leite UHT integral não atenderam aos parâmetros mínimos de identidade e qualidade em pelo menos dois dos cinco lotes avaliados, apontando falhas no processo de beneficiamento. Mais pesquisas relacionadas à

qualidade dos alimentos e aos derivados lácteos obtidos mediante o emprego de grãos de kefir são indicadas, explorando aspectos sensoriais, físico-químicos e microbiológicos destes alimentos, ampliando sua utilização em dietas.

Palavras-chave: Leite fermentado kefir, queijo de kefir, soro de kefir, leite, atividade antibacteriana, características físico-químicas, qualidade de alimentos.

ABSTRACT

The growing demand for a healthier and value-added food increases the need for research that aims not only to know food, but also to develop and characterize new products. So it is essential that technical professionals working in the food industry and research institutes to work together with health professionals, contributing to the prevention of disease and promotion of health. The overall objective of the study was to develop and evaluate the *in loco* antibacterial activity of dairy products made from kefir grains against standard foodborne; and to determine the physicochemical and microbiological characteristics of these products. Initially two formulations of kefir fermented milk (kefir 1 and 2) were prepared, the first with pasteurized milk and kefir grains and the second with pasteurized milk, powdered milk and kefir grains. The chemical and mineral composition of raw material (milk and powdered milk) and kefir products was evaluated, and were also determined the pH and the total lactic acid bacteria count. Based on the chemical composition of kefir, there was verified the possible nutritional property statements and also the compliance of the products with the standards of identity and quality for fermented milks. In sequence, two cheese formulations (Q1 and Q2) and serum (S1 and S2) of kefir were prepared from microbial coagulation made with kefir grains and determined the chemical composition and pH. Five different bacterial densities of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 11229) referred as A, B, C, D and E (where A > B > C > D > E) were inoculated in kefir, cheese and whey formulations and determined the *in loco* antibacterial activity after 0, 24, 48 and 72 hours of confrontation. Five batches of ten commercial brands of pasteurized and UHT milk were evaluated according to the rules for labeling and the identity and quality standards established by the Brazilian food law. The kefir formulations showed significant antibacterial activity against different population densities after 24 hours of exposure and no antibacterial activity was observed between 24 and 72 hours of confrontation. Kefir 1 and 2 met the physicochemical and microbiological parameters established by the technical regulation of identity and quality of fermented milks. Formulation 1 fit the nutrition claims "source of protein", "low calories" and "low sodium", and kefir 2 "high protein content", "low sodium" and "high zinc content". The cheese formulations and kefir whey also showed antibacterial activity against the microorganisms, especially after 24 hours of confrontation. The antibacterial activity was more pronounced against *Escherichia coli* (ATCC 11229), with highest antibacterial activity after 48 and 72 hour confrontation of different population densities with Q1, Q2, S1 and S2. The kefir whey formulations showed higher antibacterial activity than kefir and cheese. All trademarks evaluated were in accordance with the Brazilian food labeling regulations. One pasteurized milk brand and three whole UHT milk brands did not meet the minimum standards of identity and quality in at least two of the five lots assessed, indicating flaws in the production process. More research related to quality of food and dairy products obtained through the use of kefir grains are indicated by exploring sensory, physicochemical and microbiological aspects of these foods, what could expand its use in diets.

Keywords: Kefir fermented milk, kefir cheese, kefir whey, milk, antibacterial activity, physicochemical characteristics, food quality.

SUMÁRIO

INDEXAÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE	11
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 KEFIR	16
1.1.1 Doenças transmitidas por alimentos e atividade antibacteriana	20
1.2 QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA E CARACTERÍSTICAS DOS DERIVADOS LÁCTEOS	23
1.2.1 Regulamento técnico de identidade e qualidade de alimentos de origem animal	26
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1 PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO KEFIR	32
2.1.1 Análises no leite fermentado kefir	33
2.2 PRODUÇÃO DE QUEIJO E SORO DE KEFIR	36
2.2.1 Análises no queijo e no soro de kefir	37
2.3 AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM NUTRICIONAL E DAS CARACTERÍSTICAS DO LEITE	38
CAPÍTULO III – KEFIR: COMPOSIÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA <i>IN LOCO</i> FRENTE A BACTÉRIAS DE INTERESSE ALIMENTAR.....	41
CAPÍTULO IV – ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE QUEIJO E SORO DE KEFIR	64
CAPÍTULO V – AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM NUTRICIONAL E DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE DIFERENTES MARCAS DE LEITE PASTEURIZADO E LEITE	

UHT	81
CAPÍTULO VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS	99
CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS	103

INDEXAÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO DA TESE

Grande Área: Ciências Agrárias.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Programa: Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Linha de Pesquisa/Especialidade: Qualidade de Alimentos.

Projeto de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Avaliação e controle de qualidade em alimentos.

Tese: Elaboração e avaliação físico-química e microbiológica de produtos lácteos obtidos a base de kefir

Aderências à área temática e subordinação do assunto:

Qualidade de alimentos.

Avaliação e controle de qualidade em alimentos.

- Higiene de alimentos.
- Composição físico-química de alimentos.
- Parâmetros de identidade e qualidade.

Palavras-chave: Leite fermentado kefir, queijo de kefir, soro de kefir, leite, atividade antibacteriana, características físico-químicas, qualidade.

INTRODUÇÃO

A busca por uma alimentação mais saudável e diferenciada tem levado ao desenvolvimento de uma série de estudos que visam não só conhecer os alimentos disponíveis no mercado, como também desenvolver e caracterizar novos alimentos, elencando sua composição físico-química, sua constituição microbiológica, aspectos sensoriais e propriedades reológicas. Nesse contexto é de grande importância que profissionais que atuam em indústrias de alimentos e institutos de pesquisa, trabalhem em conjunto com os profissionais da área da saúde, contribuindo para a promoção da saúde da população. Considerando a busca por alimentos mais saudáveis destaca-se o contexto dos alimentos obtidos via processo fermentativo e que fazem parte do cotidiano do homem a milênios. Inicialmente, a finalidade da fermentação era a conservação e a manutenção dos nutrientes encontrados em matérias-primas como o leite, sendo hoje empregada também para ampliar e diversificar a gama de produtos lácteos existentes, que tem dentre as principais características, o sabor peculiar (Ordóñez 2005; Khan et al., 2010; Saad et al., 2011).

Alimentos fermentados são obtidos a partir de um processo no qual ocorrem trocas químicas em um substrato orgânico, produzidas pela ação de enzimas elaboradas por microrganismos específicos. O tipo de microrganismo envolvido, a composição físico-química do substrato e o modo como o processo fermentativo é conduzido, influenciarão nas características do produto final. Assim, é fundamental atentar para as características intrínsecas e extrínsecas da matéria-prima empregada, uma vez que um bom processo fermentativo só acontece quando os microrganismos se adaptam adequadamente ao substrato a ser fermentado. Aspectos relacionados à qualidade da matéria-prima e do produto final são importantes de serem monitorados. Relatos de adulterações de alimentos são cada vez mais frequentes e não vão ao encontro da necessidade dos consumidores, preocupados com sua saúde e com a qualidade de vida (Jay, 2005; Fellows, 2006; Cruz; Schneider, 2010; Saad, et al., 2011).

Os leites fermentados podem ser definidos como derivados lácteos em que o leite de diferentes espécies animais é exposto a ação de cultivos de microrganismos específicos, que irão provocar a coagulação e diminuição do pH do leite. Nos leites fermentados os microrganismos empregados na fermentação devem ser viáveis, ativos e

abundantes no produto final durante seu prazo de validade. Iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, kumys, coalhada e kefir, são os principais tipos de leites fermentados existentes, sendo que a principal característica que os diferencia é o tipo de microrganismo utilizado na fermentação (Ordóñez 2005; Brasil, 2007; Saad et al., 2011).

O kefir é um tipo de leite fermentado resultante da dupla fermentação do leite promovida pelos grãos de kefir. Estes grãos são constituídos por uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias acéticas, os grãos de kefir são envoltos por uma matriz gelatinosa, referida como “kefiran”, que apresenta em torno de 13% de proteínas e 24% de lipídeos e polissacarídeos. Essa matriz serve de sustentação para os diferentes constituintes dos grãos, que quando acrescidos ao leite resultam em um produto diferenciado (Rimada; Abraham, 2006; Magalhães et al., 2011).

O kefir é um leite fermentado ácido e levemente alcoólico. É considerado excelente fonte de nutrientes, apresenta baixo teor de lactose, proteínas de alto valor biológico, vitaminas (principalmente do complexo B) e minerais, onde o cálcio é um dos mais importantes. O leite fermentado é apreciado mundialmente e a produção artesanal merece destaque, uma vez que a produção em escala industrial é limitada a alguns países (Schauff; Werner, 1985; Irigoyen et al., 2005; Weschenfelder et al., 2010; Machado et al., 2012; Magalhães et al., 2011; Leite et al., 2013).

Tanto o kefir quanto os produtos elaborados a partir dos grãos de kefir tem sido objeto de estudo, principalmente em função de propriedades benéficas a saúde atribuídas aos alimentos. Efeitos sobre a intolerância a lactose, reconstituição da flora intestinal, modulação da imunidade, potencial antioxidante e atividade antibacteriana estão entre os mais explorados. Os efeitos na promoção da saúde podem estar relacionados com a atividade biológica dos microrganismos presentes nos grãos e com os metabólitos gerados durante o processo fermentativo, como o peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil e as bacteriocinas (Pintado et al., 1996; Motaghi et al., 1997, Hertzler; Clancy, 2003; Weschenfelder et al., 2009; Oelschlaeger, 2010; Magalhães et al, 2011).

Tendo relação direta com a saúde, mais estudos relacionados ao kefir e, principalmente, aos derivados lácteos produzidos a partir dos grãos de kefir devem ser realizados. Assim, considerando as características e atributos já referidos pela literatura,

quanto pelo conhecimento tradicional e pelas experiências e publicações realizadas pelo Grupo de Pesquisa Alimentos de Origem Animal no qual a autora e seu orientador se integram, o trabalho desenvolvido teve por objetivo geral elaborar e avaliar a atividade antibacteriana *in loco* de derivados lácteos elaborados a partir de grãos de kefir frente a microrganismos padrão de interesse em alimentos e determinar a composição físico-química e microbiológica dos produtos.

Os objetivos específicos foram:

- Avaliar a atividade antagonista/antibacteriana de formulações de leite fermentado kefir, queijo e soro de kefir frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
- Avaliar a atividade antagonista/antibacteriana de formulações de leite fermentado kefir, queijo e soro de kefir frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229);
- Determinar a composição centesimal e de minerais das diferentes formulações de leite fermentado kefir;
- Determinar a composição centesimal das diferentes formulações de queijo e soro de kefir;
- Analisar se o kefir elaborado atende aos principais parâmetros físico-químicos e microbiológicos previstos no regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados, estabelecidos pela legislação vigente;
- Verificar se pode ser atribuída “declaração de propriedade nutricional” ao leite fermentado kefir, tomando por base a legislação vigente;
- Analisar a qualidade de diferentes marcas comerciais de leite pasteurizado e leite UHT;
- Avaliar se diferentes marcas comerciais de leite pasteurizado e leite UHT, atendem a legislação de rotulagem vigente;

O trabalho foi estruturado em capítulos, o capítulo I referente à revisão bibliográfica, o capítulo II apresentando o item material e métodos, os capítulos III, IV e V com os artigos científicos submetidos à publicação e o capítulo VI com as considerações finais do trabalho.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 KEFIR

O kefir é um leite fermentado resultante de um sistema biológico complexo e intrigante. É originário das montanhas do Cáucaso, do Tibet e da Mongólia e expandiu-se para a Europa Ocidental no final do século XIX a partir da intelectualidade médica russa. O povo do Cáucaso obteve a cultura mãe do kefir ao estocar leite de cabra e de ovelha em potes de barro, acrescentando fragmentos de estômago de carneiro e agitando de tempos em tempos até a coagulação do produto. Este processo originou (nas paredes do pote) uma crosta constituída de um aglomerado de microrganismos vivos, conhecidos hoje como grãos de kefir (figura 1), que apresentam tamanhos variados, cor branca ou amarelada e tem aparência de fragmentos de couve-flor. Os microrganismos se adaptaram ao meio e nele se propagaram (Liu; Moon, 1983; Souza et al., 1984).



Figura 1. Grãos de kefir

Fonte: Laboratório Higiene de Alimentos - UFRGS

Uma associação de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias acéticas é encontrada nos grãos de kefir e os microrganismos permanecem envoltos em uma matriz gelatinosa, conhecida como “kefiran”, que serve de sustentação para os diferentes constituintes dos grãos (Rimada; Abraham, 2006). Estes grãos se multiplicam e dobram de peso quando transferidos com frequência para o leite, e mesmo quando manipulados em condições artesanais, mantém suas características estruturais e de aparência durante várias décadas de propagação (Magalhães et al., 2010). Fatores como

a qualidade e a quantidade de substrato a ser fermentado também podem influenciar no crescimento dos grãos, como foi relatado por Weschenfelder et al., (2011), onde observou-se um crescimento médio de 20% em relação ao peso inicial dos grãos após o processo fermentativo.

A constituição microbiana dos grãos de kefir é variável. Questões como a região geográfica de origem, o tempo de utilização, o tipo de substrato utilizado como matéria-prima, as técnicas empregadas na manipulação e o tempo e a temperatura adotados na fermentação influenciam na composição microbiana dos grãos e dos derivados a partir deles produzidos. Novos grãos de kefir só se originam da multiplicação espontânea e da repartição de grãos já existentes, assim muitos estudos avaliando as características e propriedades do leite fermentado kefir, acabam trabalhando com culturas isoladas dos grãos tradicionais (Häfliger et al., 1991; Witthuhn et al., 2004; Ordóñez 2005; Weschenfelder et al., 2011).

A diversidade de microrganismos presentes nos grãos de kefir faz com que ao longo da produção do leite fermentado ocorram pelo menos duas fermentações simultâneas e não excludentes, a fermentação ácido-lática e a fermentação alcoólica. Este processo confere ao produto características físico-químicas e sensoriais distintas e que atraem os consumidores. Embora não sendo produzido em escala industrial em países como o Brasil, na Alemanha, na Irlanda, Turquia e Espanha já existe um amplo mercado instituído de leite fermentado kefir (figura 2) (Schauff; Werner, 1985; Irigoyen et al., 2005; Weschenfelder et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Machado et al., 2012).



Figura 2. Exemplos de kefir produzidos em escala industrial

Fonte: sites de empresas

O principal obstáculo para ampliação da produção continua sendo a dificuldade de padronização do produto, uma vez que a constituição microbiológica variável dos grãos de kefir pode resultar em leites fermentados com características distintas entre um lote e outro, apresentando-se como um entrave para a comercialização. Contudo, a produção em escala industrial não reflete o real consumo do leite fermentado, que é amplamente difundido pelo mundo, devido às elaborações caseiras e tradicionais (que remetem aos primórdios), associadas às propriedades funcionais conferidas ao alimento (Irigoyen et al., 2005; Weschenfelder et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Machado et al., 2012; Nambou et al., 2014).

Assim como outros alimentos fermentados, em épocas de excesso de neve e frio, leites fermentados e queijos representaram a segurança nutricional para a população em diferentes partes do mundo, principalmente para aquelas que controlavam e usufruíam da produção leiteira. Estes povos assim que constataram que a acidificação do leite resultava em um alimento agradável, refrescante e altamente nutritivo, começaram a produzi-lo e transportá-lo em viagens e deslocamentos com os mais variados fins. Assim, leites fermentados e queijos começaram a ser sinônimos de saúde, difundindo-se pelo mundo em uma época em que a qualidade da água e o tratamento de dejetos não eram cogitados (Blasco, 2000; Weschenfelder et al., 2010).

Nesse sentido e valorizando o conhecimento empírico da população, a avaliação da composição físico-química, microbiológica e das propriedades de alimentos como o kefir se tornam fundamentais, apresentando-se como uma forma de verificar a disponibilidade de nutrientes, propiciando a relação da adequação nutricional de dietas, o desenvolvimento de pesquisas com foco no alimento, na dieta e na saúde, bem como a indicação de técnicas de processamento e conservação específicas a serem adotadas pela indústria de alimentos (Lajolo; Menezes, 1997, Magalhães et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Saad et al., 2011).

Estudos com o kefir oriundo de diferentes locais indicam que ele é um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos. Apresenta baixo teor de lactose, é fonte de cálcio e de proteínas de alto valor biológico, tendo alta digestibilidade em função da desnaturação proteica que acontece ao longo da fermentação. Pode ser produzido com substrato de origem animal (leite de diferentes espécies animais) e de origem vegetal (açúcar mascavo, leite de

coco, arroz e soja), sendo o leite bovino o mais empregado. O kefir é um alimento de baixa caloria e os atributos nutricionais estão relacionados à composição físico-química do leite (matéria-prima), dos microrganismos envolvidos no processo fermentativo e dos produtos resultantes da fermentação (Hertzler; Clancy, 2003; Antunes et al., 2007; Weschenfelder et al., 2010; Saad et al., 2011; Magalhães et al., 2011).

A acidez característica do kefir (pH na faixa de 3,5 a 4,0), classifica o leite fermentado como um alimento muito ácido, o que pode ser considerado um entrave do ponto de vista da aceitação sensorial, mas uma barreira do ponto de vista microbiológico, uma vez que o pH muito ácido dos alimentos contribuirá para a inibição de microrganismos patogênicos e deteriorantes que por ventura sobrevivam ao tratamento térmico do leite ou que venham a contaminar o alimento pós processamento (Garrote et al., 2000; Franco; Landgraf, 2005; Weschenfelder et al., 2009; Magalhães et al., 2011).

Inúmeros microrganismos já foram identificados no leite fermentado produzido com grãos de kefir, o que o difere de outros leites fermentados como o iogurte, por exemplo, onde a diversidade de microrganismos costuma ser bem menor. Magalhães et al., (2011) isolaram 359 espécies no kefir brasileiro, dentre elas 60,5% eram de bactérias ácido-láticas, 30,6% leveduras e 8,9% bactérias acéticas. Bactérias como *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e leveduras como *Klyveromyces spp*, *Klyveromyces marxianus*, *Klyveromyces lactis*, *Saccharomyces spp*, *Saccharomyces cerevesiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces turicensis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida tenuis*, *Candida inconspícua*, *Candida kefir*, *Candida maris* costumam ser os principais microrganismos encontrados no leite fermentado kefir, independente do contexto da produção (Sarkar, 2008; Simova et al., 2002; Miguel et al., 2010).

A riqueza de microrganismos encontrada no kefir, associada à composição físico-química, instiga a realização de pesquisas científicas, onde os resultados apontam que o consumo do mesmo pode conferir vários benefícios a saúde. No entanto, para que os efeitos sejam atingidos, recomenda-se a ingestão contínua e diária de pelo menos 200g do produto, que pode ser acrescido de frutas, mel e cereais. O consumo deve estar associado a hábitos de vida saudáveis e a prática de exercícios físicos. Propriedades antibióticas e antifúngicas e combate a desordens metabólicas, arteriosclerose, alergias, má digestão, osteoporose e problemas cardiovasculares relacionados à hipercolesterolemia são alguns dos benefícios relatados ao leite fermentado (Anvisa, 2002a; Saad, 2006; Ulusoy et al., 2007; Ballus et al., 2010; Wendling; Weschenfelder, 2013).

1.1.1 Doenças transmitidas por alimentos e atividade antibacteriana

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são todas as ocorrências clínicas decorrentes da ingestão de alimentos ou água contaminados com microrganismos patogênicos (bactérias, vírus e parasitas), produtos químicos, agrotóxicos e metais pesados. A contaminação pode acontecer de diversas maneiras, que estão atreladas a toda a cadeia produtiva de alimentos, da matéria-prima ao produto acabado, podendo causar desde um simples desconforto abdominal até a morte. Os sintomas mais comuns das DTAs são vômitos, diarreias, dor de cabeça, dores abdominais e febre, podendo evoluir para casos mais graves. Com gestantes, crianças, idosos, pessoas imunodeprimidas e convalescentes os cuidados devem ser redobrados, pois eles são mais vulneráveis as DTAs (Jay, 2005; Silva Júnior, 2008).

A contaminação de alimentos é um problema de saúde pública e gera impacto negativo na economia mundial. Todos os anos milhares de toneladas de alimentos são inutilizados em função do ataque de microrganismos deteriorantes, assim como muitas pessoas adoecem em função da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos patogênicos. Após ter sido contaminado, o alimento serve como meio para o crescimento do microrganismo, que quando encontra um ambiente favorável, se multiplica, atingindo quantidades significativas (Jay, 2005, Tondo; Bartz, 2011).

No contexto das doenças transmitidas por alimentos, o gênero *Staphylococcus* merece destaque, considerando que o portador humano constitui a principal fonte de

contaminação, estimando-se que 35 a 40% das pessoas sadias albergam esta bactéria na nasofaringe ou na pele, valor este que pode ser ainda maior quando se trata de suínos e aves. Seu envolvimento na mastite bovina constitui outra preocupação constante, podendo os animais produtores de carne e de leite contribuir, significativamente, na contaminação das diferentes cadeias alimentares (Acha; Szyfres, 2003; Jay, 2005, Tondo; Bartz, 2011).

O *Staphylococcus* é uma bactéria esférica (coco) e Gram-positiva, mesófila, não formadora de esporos. É anaeróbia facultativa, com maior crescimento em condições aeróbias, desenvolve-se em pH 4 a 9,8, com ótimo crescimento entre 6 e 7. São necessários de entre 10^5 e 10^6 UFC/g de *Staphylococcus aureus* e/ou de 1 µg de toxina por grama de alimento para se iniciarem os sintomas clínicos, que incluem náusea, vômito, espasmo abdominal e ocasionalmente diarreia (Franco; Landgraf, 2005).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, não formadora de esporos, anaeróbica facultativa. Capaz de se desenvolver em temperaturas entre 7 e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima. O pH próximo da neutralidade, encontrado principalmente em alimentos de origem animal, propicia condições ótimas para o desenvolvimento da bactéria. As cepas patogênicas de *Escherichia coli* são divididas de acordo como os sintomas clínicos e os mecanismos de patogenicidade, em grupos que apresentam variação em relação ao período de incubação e duração da enfermidade. Em infecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas doses pequenas (10 células ou menos) podem causar enfermidades graves, enquanto a *Escherichia coli* enterotoxigênica requer um número de células estimado em 10^8 a 10^{10} UFC/g para causar a enfermidade (Franco; Landgraf, 2005; Forsythe, 2013).

A *Escherichia coli* tem como habitat principal o intestino de animais e do homem e é eliminada pelas fezes, propiciando e favorecendo a contaminação do solo e da água. As diarreias causadas pela *Escherichia coli* afetam a população mundial, principalmente em países subdesenvolvidos, onde existem sérios problemas de saneamento básico. Contudo a real extensão da incidência do microrganismo não está dimensionada, principalmente devido à falta de notificação dos casos (Acha; Szyfres, 2003; Jay, 2005; Tondo; Bartz, 2011).

Considerando a contaminação e os efeitos oriundos da ação de microrganismos deteriorantes e patogênicos, estudos relacionados à atividade antimicrobiana de

diferentes compostos são pertinentes, melhorando a qualidade e a segurança dos alimentos. Quando do emprego de sistemas antimicrobianos naturais, como é o caso dos produtos elaborados com grãos de kefir, para que ocorra a “conservação/preservação” vários elementos devem ser avaliados, como os componentes de origem animal, os de origem microbiana, os processos físico-químicos envolvidos, bem como as condições de embalagem e armazenamento dos alimentos. Estes aspectos justificam os diferentes resultados apresentados nos estudos envolvendo a avaliação da atividade antibacteriana de derivados lácteos produzidos com grãos de kefir, como os abaixo apresentados (Weschenfelder et al., 2009; Anselmo et al., 2010; Dias et al., 2012; Wendling; Weschenfelder, 2013; Saad et al., 2011).

Weschenfelder et al (2009) verificaram em estudo *in vitro* que tanto o kefir como o soro de kefir apresentaram total inibição e inativação frente ao inóculo *Escherichia coli* ATCC (11229), em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL. Os resultados são relevantes, pois dificilmente em preparações alimentares seriam encontradas concentrações tão elevadas da bactéria. Ota (1998) sinalizou que o uso do kefir auxilia na prevenção da contaminação por *Escherichia coli* O-157 enterohemorrágica, pois ele aumenta o número de bactérias ácido-láticas e bífidas que estão originalmente presentes no trato gastrointestinal e que competem com a *Escherichia coli*.

No estudo de Anselmo et al., (2010) cepas de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* foram inoculadas (10^6 UFC/g) em kefir de origem italiana e peruana sendo mantidos a 4°C por 30 dias. Nas condições do experimento foi necessário pelo menos 12 dias para redução total da carga microbiana confrontada, sendo o *Clostridium perfringens* o mais sensível. O pH dos leites fermentados manteve-se entre 3,6 e 4,1, apontando que as bactérias patogênicas podem sobreviver a um pH baixo e em temperatura de refrigeração por um tempo significativo.

Santos et al., (2013) testaram a capacidade de inibição do kefir produzido a partir de três manipulações artesanais de grãos de kefir e encontraram pelo menos 30% de redução frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4), sendo a maior inibição apresentada frente ao *Bacillus cereus*. Nas condições do experimento, o pH de 6,05 não foi o responsável pela inibição, sendo sugerido pelos autores que outras substâncias presentes no leite

fermentado, como o peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas, estejam associadas a capacidade de inibição constatada.

Dias et al., (2012) contaminaram amostras de leite com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, realizando posteriormente a produção de kefir com a matéria-prima contaminada. As análises foram realizadas após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de fermentação. *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis sobreviveram por 24 horas de fermentação e as demais bactérias confrontadas continuavam presentes após 72 horas de fermentação. Rodrigues et al., (2005) em estudo sobre a ação inibitória de produtos elaborados com grãos de kefir, observaram atividade antimicrobiana do kefir de leite frente ao *Staphylococcus aureus*. Ulusoy et al. (2007) ao testar a atividade antibacteriana do kefir fermentado por 24 e 48 horas frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella* enteritidis (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) verificaram atividade frente a todos os agentes testados, sendo o *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) o microrganismo mais sensível.

1.2 QUALIDADE DA MATÉRIA-PRIMA E CARACTERÍSTICAS DOS DERIVADOS LÁCTEOS

A discussão sobre a qualidade dos alimentos tem aumentado nos últimos anos e a preocupação em relação a essa temática, tornou-se pauta de grandes debates e discussões no meio acadêmico, nos órgãos de fiscalização, em conversas informais e em matérias divulgadas pela imprensa. A qualidade dos alimentos ofertados à população é uma questão de saúde pública e um problema mundial, sendo necessária a detecção de produtos adulterados ou contaminados e/ou que tenham sido fabricados com matéria-prima de má qualidade (Egito et al., 2006; Cruz; Schneider, 2010; Mareze et al., 2015).

Especificamente em relação ao leite e derivados lácteos consumidos pela população, os aspectos relacionados à qualidade, tem sido motivo de preocupação de indústrias e de autoridades ligadas à área de fiscalização e de saúde. Percebe-se nos últimos anos, um aumento no número de fraudes e adulterações, que geram prejuízo financeiro as empresas do setor, redução do rendimento dentro das indústrias, alteração nas características dos produtos elaborados, perda de credibilidade perante o

consumidor, diminuição do valor nutricional e riscos a saúde da população que consome estes alimentos (Cortez et al., 2010; Robim, et al., 2012; Mareze et al., 2015).

Os primeiros estudos realizados para verificar a qualidade do leite cru, apontavam que as adulterações realizadas envolviam basicamente a adição de água e o desnate. A primeira praticada com o objetivo de aumentar o volume, uma vez que a quantidade de leite produzida tinha relação direta com o retorno financeiro dado a produtores e transportadores; e a segunda, realizada para obtenção do creme de leite (nata), que era utilizado para consumo próprio, produção de derivados como a manteiga ou para ser comercializado separadamente. Contudo, novos tipos de adulteração começaram a surgir, incluindo a adição de várias substâncias, como o soro oriundo da fabricação de queijos, substâncias com ação neutralizante e conservante como o bicarbonato, formol, ácido bórico, peróxido de hidrogênio, hipocloritos, ácido salicílico, soda caustica e de reconstituintes da densidade e da crioscopia, como o sal, o açúcar, o amido, sangue e urina (Cruz; Schneider, 2010; Robim, et al., 2012; Abrantes, et al., 2014).

Muitas das substâncias adicionadas ao leite cru, embora não sendo diretamente nocivas a saúde do consumidor, indicam a utilização de matéria-prima de qualidade inferior, uma vez que podem ser empregadas para encobrir a falta de higiene, o armazenamento em temperaturas inadequadas ou simplesmente para mascarar a diluição do alimento. Essa prática vai contra o direito do consumidor e classifica a matéria-prima como não apta para o consumo, pois uma vez adulterado o alimento não atende mais os parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação, que prevê que em alimentos como o leite cru refrigerado não devam ser adicionados nenhum tipo de aditivo ou coadjuvante, como os neutralizantes da acidez e os reconstituintes da densidade. Assim, de acordo com a legislação brasileira, nenhum derivado lácteo poderá ser produzido com matéria-prima de má qualidade, que tenha sofrido alterações em sua composição original (Cruz; Schneider, 2010; Moura et al., 2010; Brasil, 2011; Mareze et al., 2015).

A adulteração de alimentos praticada na produção, no transporte ou no beneficiamento do leite traz consigo uma série de implicações, criando uma competição desleal e trazendo impactos negativos também para a economia. As inconformidades aumentam a insegurança do consumidor, pois revelavam fragilidades do sistema de

produção de alimentos, onde grandes empresas que apresentam sistema de inspeção e ferramentas de controle de qualidade não garantem, necessariamente, a segurança dos alimentos produzidos. Considerando o mercado competitivo e globalizado, produzir alimentos com qualidade é requisito obrigatório, e o acesso a estes produtos, um direito do consumidor (Cruz; Schneider, 2010; Abrantes, et al., 2014; Magalhães et al., 2015; Mareze et al., 2015).

No contexto dos derivados lácteos, a pesquisa de adulteração só é obrigatória para o leite cru (Brasil, 2011) e caso o controle de qualidade não seja criterioso, derivados como o leite pasteurizado, leite UHT, queijos e leites fermentados poderão ser produzidos com matéria-prima ruim, chegando ao consumidor (Mareze et al., 2015). Assim, pesquisas envolvendo a avaliação da qualidade da matéria-prima e dos alimentos ofertados a população se fazem necessárias, bem como o desenvolvimento de métodos de detecção de adulteração e contaminação mais eficientes.

Crítérios e regulamentações relacionadas à produção e a comercialização de alimentos tem aumentado nos últimos anos em função da diversidade de alimentos produzidos, do aumento dos casos de adulteração e contaminação e da preocupação com a qualidade dos produtos e a saúde da população (Cruz; Schneider, 2010; Ribeiro, et al., 2012). Surgem neste contexto, legislações específicas, como as relacionadas à rotulagem de alimentos. A rotulagem nutricional é uma poderosa ferramenta de educação alimentar, pois possibilita ao consumidor o acesso à composição do alimento, a presença de possíveis alergênicos, apresentando características de armazenamento e perecibilidade do produto, além de dados do fabricante. Estudos e pesquisas relacionados à área da saúde destacam a relevância da rotulagem nutricional para a promoção de uma alimentação mais saudável e redução de inúmeras doenças. Assim, os rótulos devem apresentar informações claras e objetivas e as empresas não podem apresentar dados incorretos, ou atributos que o alimento não possui, induzindo o consumidor ao erro (Silva; Nascimento, 2007; Silva; Dutra, 2011; Ribeiro, et al., 2012; Camara; Weschenfelder, 2014).

1.2.1 Regulamento técnico de identidade e qualidade de alimentos de origem animal.

No Brasil o regulamento técnico de identidade e qualidade para alimentos de origem animal é estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Segundo o MAPA “Produto de origem animal comestível” é toda substância de origem animal, elaborada, semi-elaborada ou bruta, que se destina ao consumo humano. Nos regulamentos técnicos são apresentadas informações relevantes sobre o alimento, como a definição do produto, os ingredientes obrigatórios e opcionais, as características sensoriais, os requisitos físico-químicos e microbiológicos, os aditivos e coadjuvantes de fabricação que podem ser empregados, dentre outras características que devem ser atendidas pelos fabricantes, para que o alimento possa ser comercializado, sem oferecer riscos para a população (Brasil, 1996; Brasil, 2007; Brasil, 2011).

Segundo a instrução normativa nº 62/2011 (Brasil, 2011) leite pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do leite cru refrigerado na propriedade rural. É classificado quanto ao teor de gordura como integral (mínimo 3%), semidesnatado (0,6 a 2,9%) ou desnatado (máximo 0,5%) e para ser destinado ao consumo humano, deve ser submetido a tratamento térmico de 72 a 75°C durante 15 a 20 segundos, em equipamento de pasteurização, sendo imediatamente resfriado até temperatura igual ou inferior a 4°C. O envase deve ser feito no menor prazo possível, em condições que minimizem contaminações. O processo de pasteurização é obrigatório para todo o leite cru refrigerado que for utilizado para elaboração de derivados lácteos, sendo uma importante barreira do ponto de vista microbiológico do alimento, uma vez que minimiza possíveis riscos a saúde do consumidor, devido à contaminação com microrganismos patogênicos (Ordóñez 2005; Fellows, 2006).

Após a pasteurização o produto deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina e teste positivo para peroxidase e apresentar valor menor de 0,3 NMP/ml para coliformes 35°C. O leite pasteurizado deve apresentar acidez de 14 a 18°D, ser estável ao teste do alizarol (72%), apresentar no mínimo 8,4% sólidos não gordurosos e índice crioscópico entre -0,530 a -0,550°H. Na contagem padrão em placas os valores devem ficar entre $4,0 \times 10^4$ UFC/mL e $8,0 \times 10^4$ UFC/mL e apresentar ausência da bactéria *Salmonella* (Brasil, 2011). Atendendo a estas características o leite pasteurizado pode ser direcionado para consumo humano ou então para fabricação dos derivados lácteos. A

pasteurização costuma ser um método intermediário de conservação do leite, o prazo de validade médio do produto após o processo é de cinco dias em refrigeração (Fellows, 2006; Brasil, 2011).

O leite em pó é definido pela portaria nº 146/1996 (Brasil, 1996) como produto obtido através da desidratação do leite bovino integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados. O leite em pó deverá conter apenas proteínas, açúcares, gorduras e outras substâncias minerais presentes no leite, sendo envasado em recipientes herméticos, adequados para as condições previstas de armazenamento e que confirmam uma proteção apropriada contra a contaminação.

A desidratação é um método de conservação amplamente empregado na área de laticínios, principalmente em épocas de alta produção de leite, o que garante a oferta de matéria-prima ao longo de todo o ano. O leite em pó quando permitido em derivados lácteos, costuma ser referido nos regulamentos técnicos de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação como “leite reconstituído” (Brasil, 1996; Ordóñez 2005; Jay, 2005; Fellows, 2006).

Podem ser adicionados ao leite em pó aditivos do tipo emulsionante e antiuementante, não sendo permitidos coadjuvantes de fabricação. É classificado quanto ao teor de gordura como integral (mínimo 26%), semidesnatado (1,5 a 25,9%) ou desnatado (máximo 1,5%). O leite em pó desnatado deve apresentar no máximo 4% de umidade, acidez de no máximo 18°D, índice de solubilidade de no máximo 1. Deve ser realizada a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* e *Salmonella* (Brasil, 1996).

A portaria que define o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite em pó (Brasil, 1996) também apresenta o regulamento técnico do queijo e do leite UHT (Ultra Alta Temperatura). Segundo ela o leite UHT é o leite homogeneizado que foi aquecido a uma temperatura na faixa de 130°C durante 2 a 4 segundos, através de um processo técnico de fluxo contínuo, sendo imediatamente resfriado a 32°C, envasado em condições assépticas em embalagens estéreis e hermeticamente fechadas.

O leite UHT deve ser produzido com leite bovino, sendo permitida a adição de creme. É classificado quanto ao teor de gordura como integral (mínimo 3%), semidesnatado (0,6 a 2,9%) ou desnatado (máximo 0,5%). Deve apresentar acidez de 14

a 18°D, ser estável ao teste do alizarol (68%) e ter no mínimo 8,2% extrato seco desengordurado. Ao produto é permitida a adição de aditivos do tipo estabilizante. Após o processo o leite não deve ter microrganismos capazes de proliferar em condições normais de armazenamento e distribuição, e após uma incubação (35-37°C) por sete dias na embalagem original fechada deve apresentar valores $< 1,0 \times 10^2$ UFC/mL de microrganismos aeróbios mesófilos (Brasil, 1996).

O leite submetido ao processo UHT é o mais aceito pela população em função de sua praticidade, conveniência e prazo de validade, que pode chegar a seis meses. A esterilização tem como objetivo a obtenção de um produto seguro do ponto de vista microbiológico e que mantenha, na medida do possível, as características nutritivas e organolépticas do produto fresco (Moura et al., 2010; Tronco, 2010; Camara; Weschenfelder, 2014).

O queijo é um dos derivados lácteos mais antigos relatados na história, existem no mercado queijos para todos os tipos de gostos. Os sabores vão do suave ao forte e a aparência e a textura estão diretamente relacionados ao processo de fabricação (Perry, 2004). A classificação dos queijos é regulamentada no Brasil, pela portaria nº 146/1996 (Brasil, 1996). Ela define que queijo é o produto fresco ou maturado que se obtém por separação parcial do soro do leite ou do leite reconstituído (integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos. A coagulação pode ser realizada pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactéria específica, de ácido orgânico (isolado ou combinado), todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem agregação de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e matérias corantes.

Os queijos podem ser classificados em queijo fresco ou queijo maturado. Queijo fresco é a classificação dada aquele queijo que está pronto para consumo logo após a fabricação. São queijos de massa crua que necessitam de refrigeração e tem textura macia. Já o queijo maturado passa por trocas bioquímicas e físicas antes de ser comercializado e apresenta um sabor mais acentuado, textura variável, podendo ser armazenado em temperatura ambiente (até 25°C) (Brasil, 1996; Oliveira et al., 2012).

Em relação ao percentual de lipídeos os queijos podem ser classificados (em base seca) em extra gordo (mínimo 60%), gordo (entre 45 e 59,9%), semigordo (entre 25 e 44,9%), magros (entre 10 e 24,9%) e desnatados (menos de 10%). Em relação à

umidade em queijo de baixa umidade (até 35,9%), média umidade (entre 36 e 45,9%), alta umidade (entre 46 e 54,9%) e muito alta umidade (superior a 55%). No que se refere ao aspecto microbiológico, queijos de muita alta umidade devem ser avaliados quanto a fungos e leveduras, coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* (Brasil, 1996).

O soro de leite é o produto lácteo líquido extraído da coagulação do leite utilizado no processo de fabricação de queijos, caseína e produtos similares. Inicialmente descartado, representava um sério problema para as indústrias, pois gerava sérios impactos ambientais. Com o passar dos anos o soro foi sendo empregado na alimentação animal e hoje é amplamente utilizado para alimentação humana, sendo matéria-prima de inúmeros produtos, como a bebida láctea e a ricota. O soro pode ser classificado em soro de leite doce ou soro de leite ácido. O soro doce é obtido quando a coagulação do leite acontece principalmente por ação enzimática, devendo apresentar pH entre 6,0 e 6,8. Já o soro de leite ácido é obtido quando a coagulação se produz principalmente por acidificação, devendo apresentar pH inferior a 6,0. Em ambos os casos ele pode ser apresentado na forma líquida, concentrada ou em pó. No soro de leite não podem ser adicionados neutralizantes de acidez e reconstituintes de densidade. Do ponto de vista microbiológico, o soro deve ser avaliado quanto a coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* e aeróbios mesófilos (Thamer; Penna, 2005; Magalhães et al., 2010; Brasil, 2013).

Leites fermentados são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou do leite reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, que passam pela fermentação láctica realizada por cultivos de microrganismos específicos. Os microrganismos empregados na fermentação devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade (Ordóñez 2005; Brasil, 2007; Saad et al., 2011).

Os leites fermentados podem ser classificados em leite fermentado ou cultivado, iogurte, leite acidófilo ou acidofilado, kumys, coalhada e kefir, sendo obtidos através da ação de fermentos lácticos próprios, que caracterizam e diferenciam estes alimentos. Especificamente em relação ao kefir, a fermentação ocorrida durante a produção deve ser realizada com cultivos acidoláticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus*

kefir, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp e *Streptococcus salivarius* subsp *thermophilus* (Brasil, 2007).

O kefir deve apresentar acidez expressa em g de ácido láctico/100g de alimento de 0,5 a 1,5, no mínimo 2,9% de proteínas lácteas e o percentual de etanol deve ser de até 1,5% no kefir fraco e de até 3% no kefir forte. De acordo com o percentual de gordura o leite fermentado poderá ser classificado em alimento com creme (mínima de 6%), integral (mínimo de 3%), parcialmente desnatado (máximo de 2,9%) e desnatado (máximo de 0,5%). No kefir produzido exclusivamente com ingredientes lácteos não deverá ser adicionado aditivo químico, exceto ao desnatado, onde é permitida a adição de espessantes e estabilizantes (Brasil, 2007).

Durante seu prazo de validade, o leite fermentado kefir deverá apresentar um mínimo de 10^7 UFC/g de bactérias lácticas totais e um mínimo de 10^4 UFC/g de leveduras específicas, devendo ainda ser analisado quanto à presença de coliformes totais e fecais, e bolores e leveduras. Poderão ser acrescentados ao kefir ingredientes opcionais como o leite concentrado, creme, manteiga, gordura anidra de leite, leite em pó, caseinatos alimentícios, proteínas lácteas, outros sólidos de origem láctea, soros lácteos, concentrados de soros lácteos. Ingredientes de origem não láctea como frutas em forma de pedaços, polpa, suco, preparados à base de frutas, maltodextrina, mel, coco, cereais, vegetais, chocolate, especiarias, café, açúcares, cultivos de bactérias lácticas subsidiárias e amidos poderão ser acrescentados isolados ou combinados e não deverão superar 30% da constituição do produto. Nestes casos o kefir será classificado como leite fermentado com adições (Brasil, 2007).

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 PRODUÇÃO DO LEITE FERMENTADO KEFIR

Foram preparadas duas formulações de leite fermentado kefir, referidas como kefir 1 e kefir 2, a primeira utilizando como substrato leite pasteurizado e grãos de kefir e a segunda utilizando leite pasteurizado, leite em pó desnatado (12%) e grãos de kefir. O leite em pó foi utilizado como coadjuvante na fabricação da formulação 2, com o intuito de aumentar a capacidade tamponante do leite fermentado, retardando a queda do pH (Lima et al., 2006). Ao longo do experimento, apenas uma marca de leite pasteurizado integral e uma marca de leite em pó desnatado foram utilizadas, ambas de fabricantes registrados junto ao SIF (Sistema de Inspeção Federal), observando-se no momento da aquisição, o prazo de validade e a integridade da embalagem. Os grãos de kefir utilizados para o processo fermentativo foram oriundos do Laboratório de Higiene de Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os grãos de kefir foram pesados e acrescentados ao leite em recipiente de vidro esterilizado, na proporção de 1:10 sendo incubados em meio aeróbio em Câmara Incubadora, tipo B.O.D. (modelo SP-500, SPLABOR) por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (1ª fermentação) e posteriormente mantidos a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por mais 24 horas (2ª fermentação) (Simova et al., 2002; Weschenfelder et al., 2011). Após a fermentação foi realizada a quebra do gel e a separação do leite fermentado dos grãos foi feita com o auxílio de uma peneira de aço inoxidável esterilizada, obtendo-se assim, as formulações de leite fermentado kefir 1 e 2.

Os grãos de kefir retidos na peneira foram novamente inoculados a outra alíquota de substrato, repetindo-se as etapas anteriormente descritas ao longo do experimento (figura 3).

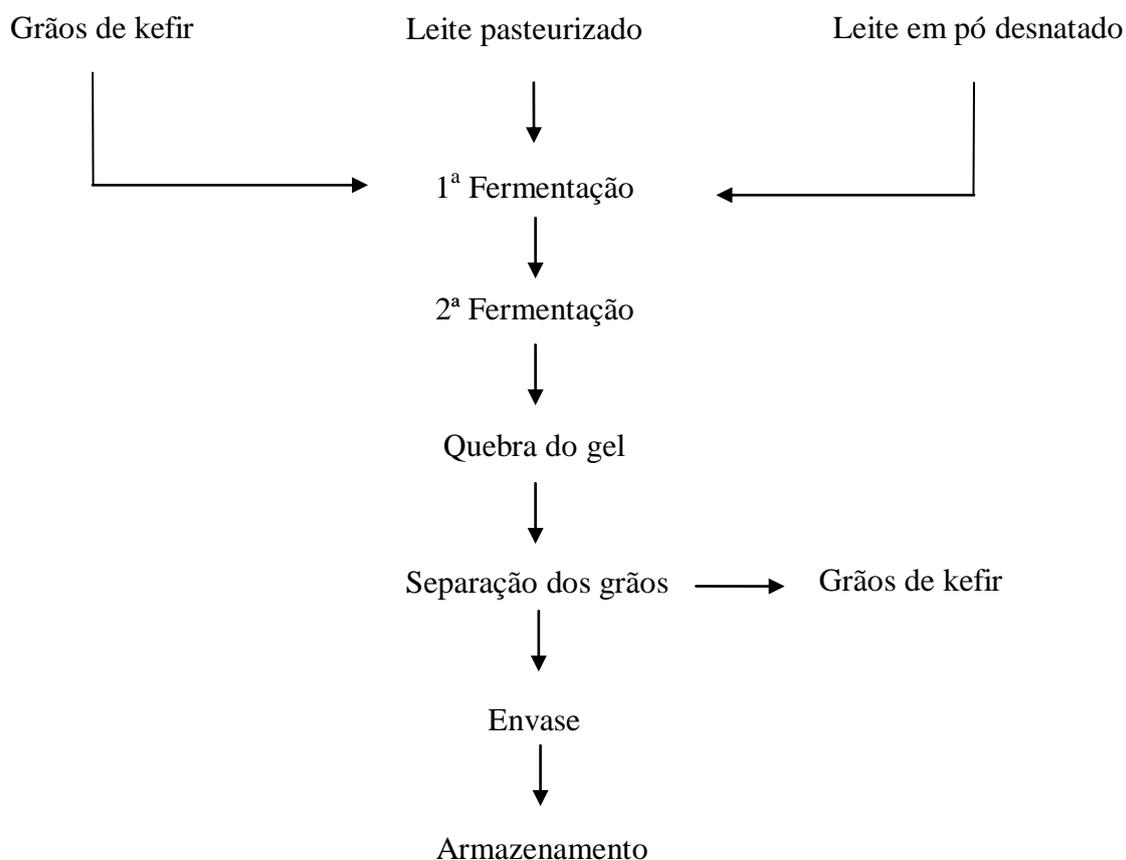


Figura 3. Fluxograma representativo do processo de produção do leite fermentado kefir.

O leite fermentado foi armazenado em recipiente de vidro com tampa, contendo 180g em cada, devidamente identificado e mantido sob-refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sendo imediatamente realizados os testes microbiológicos e físico-químicos. Ao longo da produção do kefir, a bancada e os utensílios utilizados foram submetidos à assepsia com álcool 70, respeitando-se ao longo de todo o processo as Boas Práticas de Fabricação (BPF).

2.1.1 Análises no leite fermentado kefir

Nas diferentes formulações de leite fermentado kefir e no leite utilizado como matéria-prima foram realizadas as análises de proteína bruta através do método de Kjeldahl, umidade através da dessecação em estufa a vácuo a 85°C , a determinação de minerais ou cinzas através da incineração das amostras em forno mufla a 550°C . Para a fração lipídica foi utilizado o método de Gerber para as amostras de leite pasteurizado e

a extração etérea por Soxhlet para o leite em pó e para as formulações 1 e 2, sendo ainda determinado o pH do leite fermentado através do pHmetro MP220 (Mettler Toledo). As análises foram realizadas de acordo com os protocolos apresentados na Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006). O valor de carboidratos totais foi determinado por diferença, onde o valor de carboidratos totais é igual a 100 – (% umidade + % proteínas + % lipídeos + % cinzas). A determinação de cálcio, sódio, magnésio, potássio e zinco por espectrometria de absorção atômica com chama, onde as amostras de produtos lácteos foram previamente decompostas em bloco digestor aberto sob aquecimento (130°C) utilizando 10 mL de ácido nítrico concentrado (Junior et al., 2009).

A contagem de bactérias lácticas totais no leite fermentado (kefir 1 e 2) foi realizada ao longo de 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 e 18 dias de armazenamento a 5°C ± 2°C (Câmara Incubadora, tipo B.O.D.), sendo monitorado concomitantemente o pH. Foram realizadas diluições decimais do leite fermentado conforme a técnica descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Instrução Normativa Nº 62 de agosto de 2003 (Brasil, 2003), sendo posteriormente plaqueadas em profundidade no meio de cultura ágar *Man Rogosa Sharpe* (MRS) e incubadas a 36°C por 72 horas em meio anaeróbio.

As cepas bacterianas empregadas para avaliação da atividade antagonista *in loco* compreenderam dois microrganismos patogênicos padrões de interesse em alimentos, o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229). Os inoculos bacterianos foram reativados em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), à 37°C por 24 horas em condições aeróbias. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas (a partir do inoculo inicial), até a diluição 10⁻⁸. Para verificação da concentração inicial do inoculo em estudo, das diluições 10⁻⁶ e 10⁻⁷ foram transferidos 0,1 mL para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo Agar Baird-Parker para o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Agar Chromocult para a *Escherichia coli* (ATCC 11229) e a contagem realizada em 24 ou 48 horas de incubação aeróbia à 37°C.

Na sequência, cinco diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) referidas no trabalho como densidades populacionais A, B, C, D e E (onde A = maior densidade populacional testada e E = menor densidade

populacional testada) foram incorporadas as formulações 1 e 2 do leite fermentado kefir, na proporção de 20:180 (figura 4).

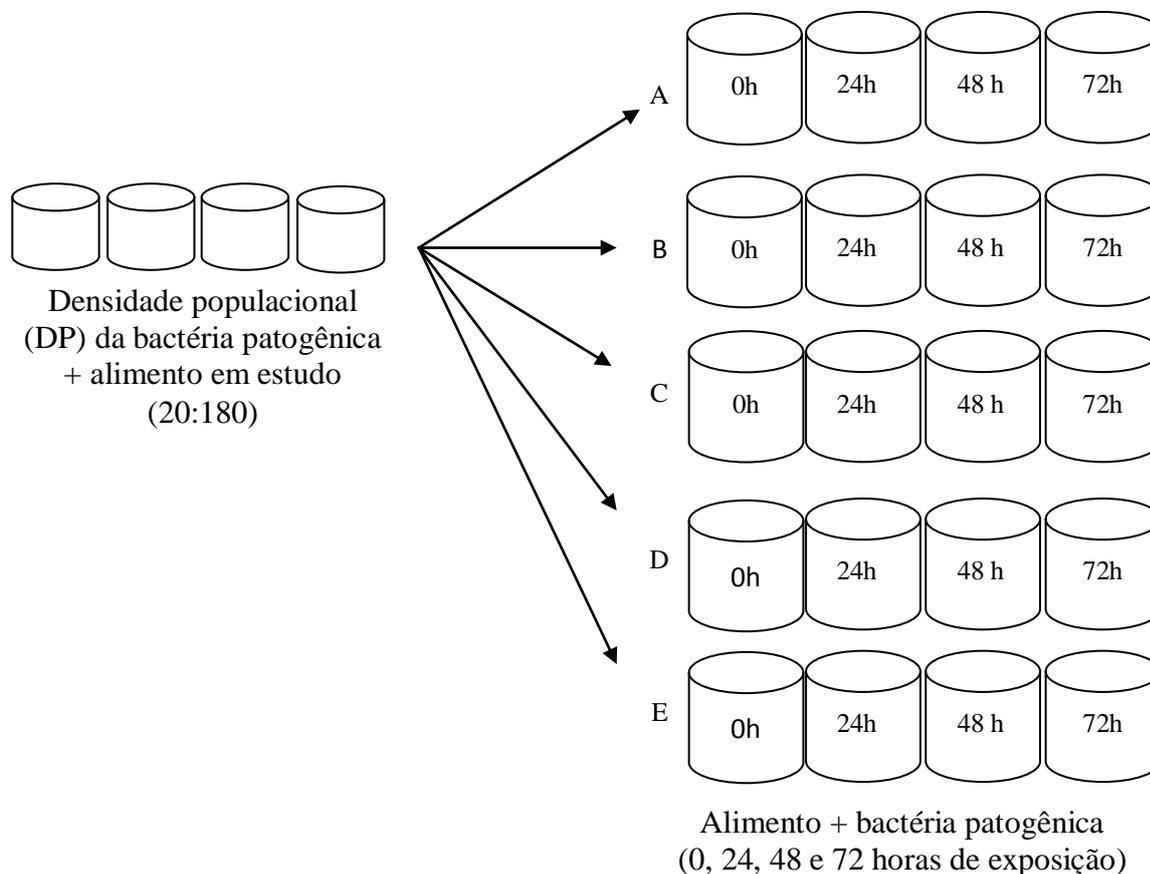


Figura 4. Esquema representativo da etapa de inoculação de diferentes densidades populacionais de microrganismos patogênicos padrões de interesse em alimentos ao kefir.

As formulações contaminadas foram mantidas em câmara incubadora, tipo B.O.D. a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e as análises feitas nos tempos 0 (equivalente a densidade populacional inicial), 24, 48 e 72 horas de armazenamento, conforme a técnica adaptada do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Instrução Normativa Nº 62 de agosto de 2003 (Brasil, 2003). O mesmo procedimento foi realizado com cinco diferentes densidades populacionais da *Escherichia coli* (ATCC 11229).

A avaliação da atividade antagonista *in loco* frente ao *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* foi baseada na contagem de colônias típicas de ambos inóculos padrões nos meios seletivos. Paralelamente, amostras “em branco” das diferentes formulações

do leite fermentado kefir foram submetidas à análise microbiológica para confirmar sua inocuidade inicial em relação às bactérias patogênicas testadas.

Todas as análises microbiológicas e físico-químicas foram feitas em triplicata repetindo-se, em momentos distintos, três vezes o experimento. Os resultados da análise físico-química foram utilizados para determinação do valor calórico e da ingestão diária recomendada de acordo com as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC's) número 359/2003 (Anvisa, 2003a), 360/2003 (Anvisa, 2003b), 269/2005 (Anvisa, 2005) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Para avaliação da declaração de propriedade nutricional das formulações de leite fermentado kefir elaboradas foi utilizada a RDC 54/2012 (Anvisa, 2012). Os resultados da análise físico-química e da contagem de bactérias lácticas totais foram ainda confrontados com parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos para leites fermentados (Brasil, 2007).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software SAS 9.0. Os resultados encontrados foram utilizados para caracterização e comparação das formulações do leite fermentado kefir e também para verificar sua atividade antagonista *in loco* frente aos patógenos de interesse em alimentos, considerando as diferentes densidades populacionais testadas e os diferentes tempos de exposição das bactérias frente às formulações 1 e 2 do leite fermentado kefir.

2.2 PRODUÇÃO DE QUEIJO E SORO DE KEFIR

Duas formulações de queijo (Q1 e Q2) foram elaboradas a partir da coagulação ácida do leite, empregando grãos de kefir oriundos do Laboratório de Higiene de Alimentos (UFRGS). Q1 e Q2 foram produzidos com leite pasteurizado e grãos de kefir (proporção 10:1, respectivamente) e a formulação Q2 foi acrescida ainda 12% de leite em pó desnatado (figura 5).

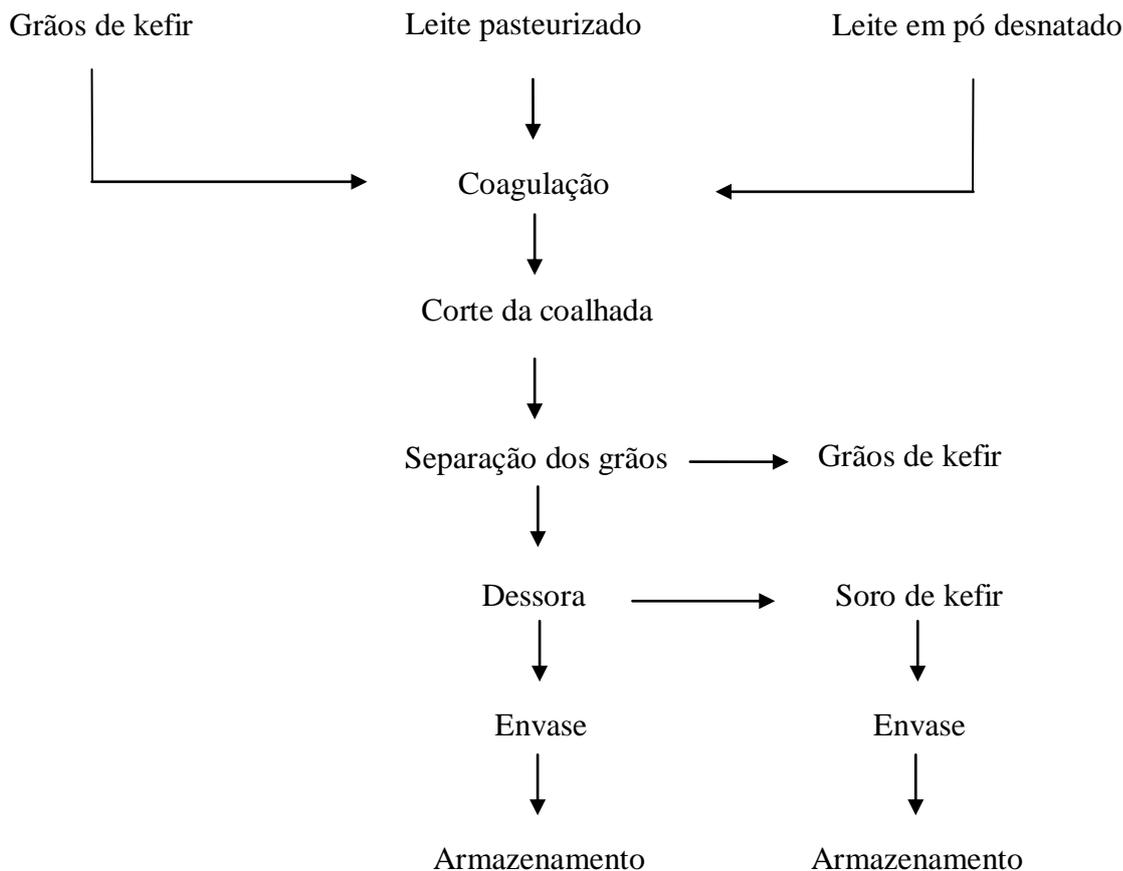


Figura 5. Fluxograma representativo da produção do queijo e do soro de kefir.

O queijo (Q1 e Q2) e o soro (S1 e S2) obtidos foram armazenados em embalagem de vidro, identificados e mantidos em Câmara Incubadora, tipo B.O.D. (modelo SP-500, SPLABOR) a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ seguindo para análise.

2.2.1 Análises no queijo e soro de kefir

A composição centesimal foi determinada no leite empregado como matéria-prima, no queijo e no soro de kefir. A avaliação da fração lipídica deu-se através da extração etérea em aparelho Soxhlet, proteína bruta pelo método de Kjeldahl, umidade por meio de dessecação em estufa a vácuo (85 °C), resíduo mineral fixo ou cinzas por meio de incineração em forno mufla a 550 °C e o valor de carboidratos totais, determinado por diferença. O pH dos derivados lácteos também foi avaliado (Brasil, 2006).

O queijo e o soro de kefir obtidos foram analisados quanto à presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para comprovar a qualidade inicial do

produto. Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229) foram empregadas para avaliação da atividade antibacteriana *in loco* do queijo e do soro de kefir. A reativação das bactérias foi realizada em BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), à 37 °C, durante 24 horas em meio aeróbio.

Diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) denominadas no trabalho como A, B, C, D e E (sendo $A > B > C > D > E$) foram incorporadas as formulações de queijo e soro de kefir, na proporção de 20:180. Os derivados lácteos foram mantidos em câmara incubadora, tipo B.O.D. a $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ao longo do experimento e analisados após 0, 24, 48 e 72 horas de confronto. A avaliação da atividade antibacteriana *in loco* baseou-se na contagem de colônias típicas em meio de cultura seletivo Agar Baird-Parker, as provas bioquímicas confirmatórias não foram realizadas, pois os microrganismos patogênicos testados eram conhecidos (Brasil, 2003). As etapas acima descritas também foram realizadas com a *Escherichia coli* (ATCC 11229), diferindo apenas em relação ao meio de cultura seletivo empregado (Agar Chromocult).

Os resultados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SAS 9.0. Os dados foram utilizados para diferenciação das formulações de queijo e soro de kefir e para verificar a atividade antibacteriana *in loco* frente aos patógenos de interesse em alimentos testados.

2.3 AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM NUTRICIONAL E DAS CARACTERÍSTICAS DO LEITE

Considerando a importância das características da matéria-prima quando do preparo de leites fermentados, e a dificuldade de encontrar um produto de qualidade para a elaboração do kefir, do queijo e do soro de kefir foi desenvolvido o estudo com diferentes marcas de leite disponíveis no mercado. Os leites foram adquiridos ao longo de doze meses em estabelecimentos comerciais localizados no município de Porto Alegre, RS. No momento da aquisição das amostras foi observado o estado de conservação da embalagem e a data de validade do produto. Como critério de inclusão, foram analisadas todas as marcas que apresentavam o produto na forma integral, optando-se também por fabricantes devidamente registrados junto ao SIF (Sistema de

Inspeção Federal) ou ao CISPOA (Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal).

Assim, dez diferentes marcas de leite foram selecionadas, sendo duas de leite pasteurizado integral (nomeadas como M1 e M2) e oito de leite UHT integral (nomeadas como M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 e M10) analisando-se ainda cinco diferentes lotes de cada marca, totalizando 50 amostras.

As informações dos rótulos das diferentes marcas de leite avaliadas foram confrontadas com o que é preconizado na RDC nº 40/2002 (Anvisa, 2002b), RDC nº 222/2002 (Anvisa, 2002c), RDC nº 259/2002 (Anvisa, 2002d), RDC nº 359/2003 (Anvisa, 2003a) e na RDC nº 360/2003 (Anvisa, 2003b) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, verificando-se assim se as amostras atendiam o preconizado pela legislação de rotulagem vigente.

As análises físico-químicas realizadas englobaram a determinação da acidez total, através de titulometria expressa em °Dornic, a avaliação da estabilidade ao alizarol a 68% (no leite UHT) e a 72% (no leite pasteurizado), a densidade a 15°C, o teor de gordura através do método butirométrico de Gerber, o índice crioscópico (IC) através do uso do crioscópio eletrônico digital, o extrato seco total (EST) e o extrato seco desengordurado (ESD) através do cálculo utilizando a fórmula de Fleishmann e por fim, a verificação da peroxidase e da fosfatase alcalina, seguindo os protocolos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (Brasil, 2006). Todas as análises foram realizadas em triplicata, calculando-se a média dos valores encontrados.

As amostras de leite foram submetidas também à análise microbiológica, com a realização da contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis. Antes da realização das análises, as embalagens das marcas de leite UHT foram incubadas fechadas a 35-37°C por sete dias, conforme recomendação da legislação (Brasil, 1996). Para a contagem foram preparadas diluições decimais usando água peptonada a 0,1%, que foram depositadas no fundo de placas de petri utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*) em meio Ágar Padrão para Contagem (PCA). Após a homogeneização e solidificação, as mesmas foram incubadas a 36°C por 48 horas para posterior contagem conforme a técnica descrita pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003 (Brasil, 2003).

Os resultados da avaliação físico-química e microbiológica do leite foram confrontados com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2011) para as amostras M1 e M2 e com os parâmetros da Portaria nº 146 de 7 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (Brasil, 1996) para as amostras M3 a M10, avaliando assim quais estavam e quais não estavam em conformidade com a legislação.

CAPÍTULO III

KEFIR: COMPOSIÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTAGONISTA *IN*

***LOCO* FRENTE A BACTÉRIAS DE INTERESSE ALIMENTAR**

**Kefir: composição e avaliação da atividade antagonista *in loco* frente a bactérias
de interesse alimentar**

Simone Weschenfelder⁽¹⁾; Carin Gerhardt⁽²⁾; Heloisa Helena Chaves Carvalho⁽³⁾;

Marcelo Pinto Paim⁽⁴⁾; Patric de Lima Monteiro⁽⁵⁾ e José Maria Wiest⁽⁶⁾

^{1, 2, 3, 4, 5, 6} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus
do Vale – CEP 91505-970 – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁽¹⁾ simoneweschenfelder@hotmail.com; ⁽²⁾ carin.gerhardt@gmail.com;

⁽³⁾ hhcarvalho@terra.com.br; ⁽⁴⁾ marcelloppaim@yahoo.com.br; ⁽⁵⁾ patric.lima@ufrgs.br

e ⁽⁶⁾ 00002497@ufrgs.br

Artigo submetido e formatado de acordo com a revista

“Pesquisa Agropecuária Brasileira”

Resumo – O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antagonista do kefir frente à *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli*; verificar o atendimento a legislação quanto aos padrões de identidade e qualidade; e identificar a possibilidade de atribuição de declaração de propriedade nutricional. Foram elaboradas duas formulações de kefir, a primeira com grãos de kefir e leite (kefir 1) e a segunda acrescida de leite em pó (kefir 2). Foram determinadas a composição centesimal, minerais, pH, contagem de bactérias lácticas totais e a atividade antagonista frente aos dois microrganismos padrão. Os resultados da avaliação físico-química apontaram diferença estatística entre as formulações, exceto para o percentual de lipídeos, Ca, K, Mg e Na. As formulações atenderam aos parâmetros de identidade e qualidade dos leites fermentados avaliados. As alegações nutricionais possíveis para o kefir 1 são “fonte de proteínas”, “reduzido em calorias” e “baixo teor de sódio” e do kefir 2, “alto conteúdo de proteínas”, “baixo teor de sódio” e “alto conteúdo de zinco”. Os leites fermentados apresentaram atividade antagonista significativa frente aos patógenos testados (> 24 h), não sendo observada atividade após esse período. Mais estudos envolvendo o kefir são sugeridos, contribuindo para melhor avaliação das características e propriedades do leite fermentado.

Termos para indexação: produto lácteo fermentado; características físico-químicas; atividade antibacteriana; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*.

**Kefir: composition and evaluation of the *in loco* antagonistic activity against
bacteria of interest in food**

Abstract - This study aims to evaluate the antagonistic activity of kefir against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*; check the compliance with the standards for identity and quality; and verify possible nutritional property statements. Two different formulations containing milk and kefir grains (kefir 1) and added powder milk (kefir 2) were prepared. Chemical composition, minerals, pH, total acid lactic bacteria count and the antagonistic activity against two standard microorganisms were determined. The physicochemical results showed statistical differences for all parameters except for lipids, Ca, K, Mg and Na. Both formulations met the identity and quality parameters for fermented milks. Possible nutrition claims for kefir 1 are "source of protein", "low calories" and "low sodium", and kefir 2 "high protein content", "low sodium" and "high zinc content". The fermented milks showed significant antagonistic activity against the tested pathogens (> 24 h), but not thereafter. More studies involving kefir are suggested, which would contribute to a better evaluation of its characteristics and properties.

Index terms: fermented dairy product; physicochemical characteristics; antibacterial activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*.

Introdução

Existem vários tipos de leites fermentados, como o iogurte, leite fermentado ou cultivado, leite acidófilo, kumys, coalhada e kefir e a principal característica que os diferencia é o tipo de microrganismo utilizado na fermentação. Para produção, deve ser empregada matéria-prima de qualidade, respeitando-se fatores intrínsecos e extrínsecos

relativos ao bom desenvolvimento da cultura microbiana, destacando-se a composição do meio, temperatura e a presença de oxigênio (Brasil, 2007; Saad et al., 2011).

O kefir é um leite fermentado resultante de um sistema biológico complexo e intrigante. Produzido a partir dos grãos de kefir que apresentam associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-lácticas e bactérias acéticas, envoltas por uma matriz gelatinosa referida como “kefiran”. A produção de kefir em escala industrial acontece em países como a Irlanda, Turquia e Espanha e o principal entrave para ampliação da produção é a dificuldade de padronização do produto, em função da constituição variável dos grãos de kefir. Contudo, o consumo deste tipo de leite fermentado é amplamente difundido pelo mundo, devido às elaborações caseiras e tradicionais associadas às propriedades funcionais conferidas ao alimento (Irigoyen et al., 2005; Weschenfelder et al., 2010; Magalhães et al., 2011; Machado, 2012; Nambou et al., 2014).

Estas propriedades têm sido amplamente estudadas e os efeitos na promoção da saúde podem estar relacionados com a atividade biológica dos microrganismos presentes nos grãos e com os metabólitos gerados durante o processo fermentativo, como o peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil e as bacteriocinas (Garrote et al., 2000; Oelschlaeger, 2010; Magalhães et al., 2011). Alimentos como o kefir também são excelente fonte de nutrientes, apresentam proteínas de alto valor biológico, vitaminas e minerais, onde o cálcio é um dos mais importantes (Antunez et al., 2007; Weschenfelder et al., 2009; Magalhães et al., 2011; Leite et al., 2013).

O kefir apresenta atividade antimicrobiana frente a bactérias patogênicas de interesse em alimentos. Grande parte dos estudos avaliando o seu comportamento frente aos patógenos utiliza o isolamento de microrganismos presentes nos grãos de kefir e no leite fermentado ou esterilizam o mesmo para realização dos testes (Weschenfelder et

al., 2009; Santos et al., 2013; Leite, et al., 2013; Wendling & Weschenfelder, 2013; Ribeiro, 2015). Desta maneira o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade antagonista de formulações de leite fermentado kefir frente a patógenos de interesse em alimentos; analisar se o kefir elaborado atende aos principais parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos para leites fermentados; e verificar se pode ser atribuída “declaração de propriedade nutricional”, tomando por base a legislação vigente.

Material e Métodos

Foram preparadas duas formulações de leite fermentado kefir (kefir 1 e kefir 2), a primeira com leite pasteurizado e grãos de kefir e a segunda com leite pasteurizado, leite em pó desnatado (12%) e grãos de kefir oriundos do Laboratório de Higiene de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os grãos de kefir foram pesados e acrescentados ao leite em recipiente de vidro esterilizado, na proporção de 1:10 sendo incubados em meio aeróbio em Câmara Incubadora, tipo B.O.D. (modelo SP-500, SPLABOR) por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (1ª fermentação) e posteriormente mantidos a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por mais 24 horas (2ª fermentação) (Simova et al., 2002; Weschenfelder et al., 2011).

Após a fermentação foi realizada a quebra do gel e a separação do leite fermentado dos grãos, com o auxílio de uma peneira de aço inoxidável esterilizada, obtendo-se as formulações de kefir. Os grãos de kefir retidos na peneira foram novamente inoculados a outra alíquota de substrato, repetindo-se as etapas anteriormente descritas ao longo do experimento. O kefir foi armazenado em embalagem de vidro, contendo 180g em cada, identificado e mantido sob-refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) sendo imediatamente realizados os testes microbiológicos e físico-químicos.

Foram realizadas as análises de proteína bruta através do método de Kjeldahl, umidade através da dessecação em estufa a vácuo a 85°C, a determinação de minerais ou cinzas através da incineração das amostras em forno mufla a 550°C. Para a fração lipídica foi utilizado o método de Gerber para as amostras de leite pasteurizado e a extração etérea por Soxhlet para o leite em pó e para o kefir, sendo ainda determinado o pH do leite fermentado através do pHmetro MP220 (Mettler Toledo). As análises foram realizadas de acordo com os protocolos apresentados na Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 (Brasil, 2006). O valor de carboidratos totais foi determinado por diferença, onde o valor de carboidratos totais é igual a $100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteínas} + \% \text{ lipídeos} + \% \text{ cinzas})$. A determinação de cálcio, sódio, magnésio, potássio e zinco por espectrometria de absorção atômica com chama, onde as amostras de produtos lácteos foram previamente decompostas em bloco digestor aberto sob aquecimento (130°C) utilizando 10 mL de ácido nítrico concentrado (Junior et al., 2009).

A contagem de bactérias lácticas totais no leite fermentado (kefir 1 e 2) foi realizada ao longo de 0, 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16 e 18 dias de armazenamento a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Câmara Incubadora, tipo B.O.D.), sendo monitorado concomitantemente o pH. Foram realizadas diluições decimais do leite fermentado (Brasil, 2003), sendo posteriormente plaqueadas em profundidade no meio de cultura ágar *Man Rogosa Sharpe* (MRS) e incubadas a 36°C por 72 horas em meio anaeróbio.

As cepas bacterianas empregadas para avaliação da atividade antagonista *in loco* compreenderam dois microrganismos patogênicos padrões de interesse em alimentos, o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229). Os inóculos bacterianos foram reativados em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), à 37°C por 24 horas em meio aeróbio, sendo realizadas diluições seriadas (até 10^{-8}). Para

verificação da concentração inicial do inóculo em estudo, das diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram transferidos 0,1 mL para placas de Petri contendo meio de cultura seletivo Agar Baird-Parker para o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e Agar Chromocult para a *Escherichia coli* (ATCC 11229) e a contagem realizada em 24 ou 48 horas de incubação aeróbia à 37°C.

Na sequência, cinco diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) referidas no trabalho como densidades populacionais A, B, C, D e E (onde A = maior densidade populacional testada e E = menor densidade populacional testada) foram incorporadas as formulações 1 e 2 do leite fermentado kefir, na proporção de 20:180. As formulações contaminadas foram mantidas em câmara incubadora, tipo B.O.D. a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e as análises feitas nos tempos 0 (equivalente a densidade populacional inicial), 24, 48 e 72 horas de armazenamento, conforme a técnica adaptada do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Instrução Normativa Nº 62 de agosto de 2003 (Brasil, 2003). O mesmo procedimento foi realizado com cinco diferentes densidades populacionais da *Escherichia coli* (ATCC 11229).

A avaliação da atividade antagonista *in loco* frente ao *Staphylococcus aureus* e a *Escherichia coli* foi baseada na contagem de colônias típicas de ambos inóculos padrões nos meios seletivos. Paralelamente, amostras “em branco” das diferentes formulações do leite fermentado kefir foram submetidas à análise microbiológica para confirmar sua inocuidade inicial em relação às bactérias patogênicas testadas.

Todas as análises foram feitas em triplicata repetindo-se, três vezes o experimento. Os resultados da análise físico-química foram utilizados para determinação do valor calórico e da ingestão diária recomendada de acordo com as Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC's) número 359/2003 (Anvisa, 2003a),

360/2003 (Anvisa, 2003b), 269/2005 (Anvisa, 2005) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Para avaliação da declaração de propriedade nutricional das formulações de leite fermentado kefir elaboradas foi utilizada a RDC 54/2012 (Anvisa, 2012). Os resultados da análise físico-química e da contagem de bactérias lácticas totais foram ainda confrontados com parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos para leites fermentados (Brasil, 2007).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software SAS 9.0. Os resultados encontrados foram utilizados para caracterização e comparação das formulações do leite fermentado kefir e também para verificar a atividade antagonista *in loco* frente aos patógenos de interesse em alimentos, considerando as diferentes densidades populacionais testadas e os diferentes tempos de exposição das bactérias frente às formulações 1 e 2 do leite fermentado kefir.

Resultados e Discussão

As características e a qualidade da matéria-prima são fundamentais para a produção de derivados lácteos, principalmente os fermentados. Os resultados da análise do leite pasteurizado e do leite em pó utilizados para a produção do kefir estão apresentados na tabela 1. As formulações de kefir obtidas, não diferiram em relação ao % de lipídeos, pois o leite em pó empregado na formulação 2 era desnatado, mas apresentaram diferença estatística significativa em relação aos demais constituintes da composição centesimal (tabela 2). As duas formulações de kefir apresentaram mais de 2,9% de proteínas, atendendo aos parâmetros estabelecidos pela legislação brasileira e podem ser classificadas como kefir “parcialmente desnatado”, que é a classificação dada quando o leite fermentado apresenta de 0,6 a 2,9% de lipídeos (Brasil, 2007).

Por se tratar de alimento de origem animal, é importante destacar que a ingestão de uma porção dos leites fermentados elaborados (200g) corresponde a 8 e a 18% da IDR (ingestão diária recomendada) para proteínas nas formulações 1 e 2, respectivamente (Anvisa, 2003a; Anvisa, 2003b). A formulação 1 pode assim receber o atributo de “fonte de proteínas” e a formulação 2 “alto conteúdo de proteínas” (Anvisa, 2003b; Anvisa 2012). O kefir elaborado por Magalhães et al., (2011) a partir de grãos de origem familiar e com 24 horas de fermentação também pôde receber o atributo de “fonte de proteínas”, destacando a importância, do ponto de vista nutricional, do leite fermentado kefir na dieta da população.

O consumo de uma porção do kefir 1, corresponde a 115,2 Kcal ou a 6% da IDR e do kefir 2 a 179,44Kcal ou a 9% do valor diário recomendado, tendo como base uma dieta de 2000Kcal (Anvisa, 2003b), podendo ser utilizado o atributo “reduzido em calorias” ou “light” para a formulação 1 quando comparada a formulação 2 (Anvisa, 2012). Essa diferença pode ser justificada pela utilização do leite em pó na formulação 2. Assim, derivados lácteos produzidos com elevado teor de sólidos, conferem valor energético maior e contribuem com aspectos relacionados à textura, a sinérese e a sensorialidade do produto final (Lima et al., 2006).

A determinação da composição de minerais presentes em leites fermentados é fundamental para avaliação do impacto nutricional do alimento (Turker et al., 2013). Considerando os resultados encontrados, as duas formulações de kefir podem receber o atributo de “baixo teor de sódio”, pois apresentaram menos de 80mg de sódio, considerando a porção de 200g (Anvisa, 2003a; Anvisa, 2012). Já em relação aos teores de cálcio, nenhuma das formulações pode receber o atributo de “fonte de cálcio”, pois não atingiram o mínimo de 15% da IDR do mineral na porção, que para adultos é de 1000mg segundo a RDC nº 269/2005 (Anvisa, 2005). A mesma avaliação se aplica para

o magnésio, onde a formulação 2 (que apresentou maior quantidade do mineral), atingiu 8,46% da IDR na porção. Já em relação ao zinco, a formulação 2 pode receber o atributo de “alto conteúdo de zinco” uma vez que apresentou 60% da IDR deste mineral para adultos (Anvisa, 2005; Anvisa, 2012). É necessário destacar que a ingestão diária recomendada de cada mineral vai depender de fatores como idade, sexo e estado nutricional, bem como da biodisponibilidade do mineral, sendo o profissional da nutrição o mais indicado para avaliação das necessidades de cada indivíduo.

Turker et al., (2013) ao avaliarem a composição mineral de kefir produzido com leite bovino e leite caprino encontraram valores maiores de minerais, quando comparados ao presente estudo, sendo o kefir produzido com leite caprino o que apresentou maior quantidade de cálcio, fósforo, potássio, sódio e magnésio e o kefir produzido com leite bovino o que apresentou maiores quantidades de cobre, ferro e zinco. Cabe destacar que a alimentação do gado, o número de lactações, a época do ano e o processamento industrial irão influenciar na composição mineral da matéria-prima utilizada para elaboração dos leites fermentados.

A adição de leite em pó a formulação 2 não influenciou na estabilidade do pH das formulações de kefir ao longo do armazenamento, pois na formulação 1 (onde não foi acrescido o leite em pó), também houve estabilidade ao longo do armazenamento (tabela 3). A incorporação de mais substrato a matéria-prima a ser fermentada, pode influenciar no aumento da capacidade tamponante do alimento, retardando a queda de pH e impedindo alterações significativas ao longo do armazenamento dos leites fermentados. Essa alteração no fator intrínseco do alimento influencia de forma positiva na sobrevivência de culturas microbianas, inclusive as probióticas, ao longo do armazenamento (Oliveira & Damin, 2003; Ranadheera et al., 2009).

A contagem de bactérias lácticas totais das duas formulações de kefir (tabela 4), embora apresentando diferença estatística significativa ao longo do armazenamento, manteve o mínimo preconizado para leites fermentados do tipo kefir, que é de 10^7 UFC/g (Brasil, 2007). Os valores mais elevados na formulação 2 podem ser justificados pela composição química do substrato utilizado na fermentação e pelo pH menos ácido da formulação 2 nas primeiras horas de armazenamento (tabela 3). Grãos de kefir apresentam uma diversidade muito grande de microrganismos, o que influencia na composição microbiológica do leite fermentado (Magalhães et al., 2011; Nambou et al., 2014). Mesmo sendo produzido a partir de grãos de kefir de diferentes origens, as contagens de bactérias lácticas totais no kefir costumam ser maiores do que 10^7 UFC/g (Anselmo et al., 2010; Ribeiro, 2015).

Tanto o kefir 1 quanto o kefir 2 não apresentaram crescimento *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* nas amostras “em branco”, indicando boa qualidade da matéria-prima e do processo de fabricação do leite fermentado.

Considerando a atividade antagonista, foi observado que as formulações 1 e 2 do kefir apresentaram comportamento semelhante do ponto de vista estatístico, quando confrontadas com diferentes densidade populacionais do *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), (exceto kefir 2 – densidade populacional E - 72 horas) e *Escherichia coli* (ATCC 11229), como pode ser observado nas tabelas 5 e 6. Levando em consideração que a densidade populacional “E” de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foi de 10^4 UFC/g (tempo 0), é possível afirmar que a *Escherichia coli* foi mais sensível que o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), uma vez que a concentração após 24 horas foi de $3,23 \times 10^2$ UFC/g e $1,47 \times 10^3$ UFC/g respectivamente (kefir 1). Esse comportamento também foi observado na formulação 2, nas densidades populacionais “D” e “E”.

Santos et al., (2013) testaram a capacidade de inibição do kefir produzido a partir de três manipulações artesanais de grãos de kefir e encontraram pelo menos 30% de redução frente *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella typhi* (ATCC 6539), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313) e *Bacillus cereus* (RIBO 1222-173-S4), sendo a maior inibição apresentada frente ao *Bacillus cereus*. Nas condições do experimento, o pH de 6,05 não foi o responsável pela inibição, sendo sugerido pelos autores que outras substâncias presentes no leite fermentado como o peróxido de hidrogênio e as bacteriocinas estejam associadas a capacidade de inibição constatada. A microbiota diversificada presente nos grãos de kefir também pode ter influenciado na capacidade de inibição do leite fermentado frente aos agentes patogênicos.

No estudo de Anselmo et al., (2010) cepas de *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* foram inoculadas (10^6 UFC/g) em kefir de origem italiana e peruana sendo mantidos a 4°C por 30 dias. Nas condições do experimento foram necessários pelo menos 12 dias para redução total da carga microbiana confrontada, sendo o *Clostridium perfringens* o mais sensível. O pH dos leites fermentados manteve-se entre 3,6 e 4,1, apontando que as bactérias patogênicas podem sobreviver a um pH baixo e em temperatura de refrigeração por um tempo significativo.

No presente estudo a atividade antagonista foi significativa no kefir do tempo 0 para 24 horas de exposição, não sendo constatada redução total da carga microbiana inoculada. De 24 até 72 horas não houve redução significativa, sendo observada uma estabilização no número de UFC/g das bactérias patogênicas nas duas formulações de kefir, independente da densidade populacional confrontada.

Considerando a tabela 5 a atividade antagonista da formulação 1 e 2 do kefir pode ser considerada como “fator de proteção” quando confrontada com as densidades

populacionais “C” ($3,90 \times 10^6$ UFC/g) e “D” ($3,90 \times 10^5$ UFC/g) de *Staphylococcus aureus* do tempo 0 para 24 horas, pois nessas concentrações do patógeno, o leite fermentado foi capaz de reduzir a concentração para valores menores do que 10^5 UFC/g (quantidade necessária para produção de toxina).

Dias et al., (2012) contaminaram amostras de leite com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, realizando posteriormente a produção de kefir com a matéria-prima contaminada. As análises foram realizadas após 0, 6, 12, 24, 48 e 72 horas de fermentação. *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis sobreviveram por 24 horas de fermentação e as demais bactérias confrontadas continuavam presentes após 72 horas de fermentação. Mesmo sendo menor a concentração de *Staphylococcus aureus* confrontada pelos autores acima citados (10^3 UFC/g), a sobrevivência do microrganismo após 72 horas de fermentação no leite fermentado, reforça a importância da qualidade da matéria-prima e da higiene quando da preparação de leites fermentados, inclusive naqueles alimentos onde fatores antimicrobianos já foram encontrados, pois a carga microbiana inicial do patógeno tem relação direta com a carga microbiana final após confronto com o leite fermentado. Assim, caso os microrganismos testados venham a contaminar o kefir em uma indústria, por exemplo, poderão sobreviver em número e tempo suficientes para causar dano à saúde, sendo a carga microbiana inicial um fator determinante.

Conclusões

As formulações de kefir elaboradas atenderam aos parâmetros de identidade e qualidade, avaliados no trabalho. Em relação à declaração de propriedade nutricional e considerando a porção de 200g, o kefir 1 é “fonte de proteínas”, “reduzido em calorias”

ou “light” e “apresenta baixo teor de sódio”, já o kefir 2 apresenta “alto conteúdo de proteínas”, “baixo teor de sódio” e “alto conteúdo de zinco”. As formulações de kefir apresentaram atividade antagonista significativa frente a diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11229) após de 24 horas de exposição, não sendo observada atividade antagonista entre 24 e 72 horas de confronto. Sugere-se a realização de mais estudos avaliando a composição do kefir e a atividade antagonista *in loco* frente a microrganismos de interesse em alimentos, contribuindo para uma melhor compreensão das propriedades do leite fermentado consumido pela população.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 26 dez. 2003a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República do Brasil**, 26 dez. 2003b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República do Brasil**, 22 set. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico Mercosul sobre Informação Nutricional Complementar (declarações de propriedades nutricionais). **Diário Oficial da República do Brasil**, 13 nov. 2012.

ANSELMO, R. J.; VIORA, S. S.; OJEDA, P. A.; LAUSADA, L. I. **Efecto antagónico del kefir sobre endosporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens***. Información Tecnológica, v. 21, p. 131-138, 2010.

ANTUNES, A. E. C.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. **Desenvolvimento de buttermilk probiótico**. Ciência Tecnologia de Alimentos, v. 27, p. 83-90, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, 26 ago. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 24 out. 2007.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; LEAL, M. C. G. M.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; DIAS, C. T. **Survival of pathogenic microorganisms in kefir**. Revista do Instituto Adolfo Lutz, v. 71, p 182-186, 2012.

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

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

JUNIOR, J. B. P.; FERNANDES, K. G.; MÜLLER, R. C. S. **Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)**. Química Nova, v. 32, p. 2333-2335, 2009.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C. A.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S.; MIGUEL, M. A. L.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. **Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes**. Journal of Dairy Science, v. 96, p.4149-4159, 2013.

LIMA, S. C. G.; ALMEIDA, T. C. A.; GIGANTE, M. L. **Efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de sólidos nas características sensoriais de iogurte tipo firme.** Revista brasileira de produtos agroindustriais, v. 08, p. 75-84, 2006.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; PIRES, E. A.; SANTOS, F. L. **Mapeamento tecnológico de patentes de kefir.** Cadernos de Prospecção, v. 5, p. 86-97, 2012.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. **Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 42, p. 693-702, 2011.

NAMBOU, K.; GAO, C.; ZHOU, F.; GUO, B.; AI, L.; WU, ZJ. **A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production.** International Dairy Journal, v. 34, p. 237-246, 2014.

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

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

RANADHEERA, R. D. S. C.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. **Importance of food in probiotic efficacy.** Food Research International, v. 43, p. 1-7, 2009.

RIBEIRO, A. S. **Caracterização de micro-organismos com potencial probiótico isolados a partir de kefir produzidos na região noroeste do estado do Rio Grande do Sul.** 2015. 78p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SAAD, S. M. I; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas.** 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011. 669 p.

SANTOS, J. P. V.; ARAÚJO, T. F.; FERREIRA, C. L. L. F. II; GOULART, S. M. **Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins.** Brazilian archives of biology and technology, v. 56, p. 823-827, 2013.

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

TURKER, G.; KIZILKAYA, B.; CEVIK, N. **The mineral composition of kefir produced from goat and cow milk.** Journal of Food, Agriculture & Environment, v. 11, p. 62-65, 2013.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. **Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão.** Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 68, p. 49-57, 2013.

WESCHENFELDER, S.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, L. M. **Saberes e fazeres sobre o kefir como alimento lácteo probiótico**. 1 ed. Porto Alegre: Evangraf, 2010. 112 p.

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

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. **Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais**. Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 64, p. 48-55, 2009.

Tabelas

Tabela 1. Composição centesimal e de minerais (mg%) do leite pasteurizado e do leite em pó utilizados para elaboração do leite fermentado kefir

	Umi- dade	Prote- ínas	Lipí- deos	Carbo- idratos	Mine- rais	Ca	K	Mg	Na	Zn
Leite	87,81 ± 0,03	3,70 ± 0,01	3,00 ± 0,10	4,65 ± 0,18	0,85 ± 0,29	72,42 ± 25,47	114,76 ± 27,38	23,92 ± 19,20	26,73 ± 5,54	0,52 ± 0,17
Leite em pó	1,81 ± 0,27	33,57 ± 0,49	0,68 ± 0,08	55,63 ± 0,94	8,31 ± 0,58	992,0 ± 58,19	1357,3 ± 29,74	73,67 ± 5,69	243,00 ± 21,28	4,73 ± 0,32

Tabela 2. Composição centesimal e de minerais (mg%) de diferentes formulações de leite fermentado kefir.

	Umidade	Proteínas	Lípidos	Carboidratos	Minerais	Ca	K	Mg	Na	Zn
Kefir 1	88,01 ± 0,06 ^a	2,93 ± 0,12 ^a	2,64 ± 0,24 ^a	5,53 ± 0,11 ^a	0,89 ± 0,11 ^a	49,73 ± 1,20 ^a	112,00 ± 0,15 ^a	8,57 ± 0,33 ^a	22,60 ± 0,10 ^a	0,48 ± 0,02 ^a
Kefir 2	79,01 ± 0,07 ^b	6,94 ± 0,95 ^b	2,48 ± 0,22 ^a	9,96 ± 1,19 ^b	1,61 ± 0,20 ^b	66,00 ± 2,00 ^a	155,00 ± 3,23 ^a	11,00 ± 1,00 ^a	27,00 ± 1,00 ^a	2,10 ± 0,10 ^b

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Tabela 3. Valores médios de pH das diferentes formulações de leite fermentado kefir avaliados ao longo de 18 dias de armazenamento a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Tempo (dias)	0	2	4	7	9	11	14	16	18
Kefir 1	3,97 ± 0,24 ^a	3,98 ± 0,24 ^a	4,00 ± 0,14 ^a	4,13 ± 0,18 ^a	4,07 ± 0,10 ^a	4,26 ± 0,01 ^a	4,31 ± 0,01 ^a	4,29 ± 0,01 ^a	4,27 ± 0,04 ^a
Kefir 2	4,58 ± 0,08 ^a	4,50 ± 0,21 ^a	4,42 ± 0,05 ^a	4,42 ± 0,05 ^a	4,35 ± 0,01 ^a	4,37 ± 0,05 ^a	4,30 ± 0,21 ^a	4,32 ± 0,47 ^a	4,28 ± 0,18 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Tabela 4. Contagem de bactérias lácticas totais das diferentes formulações de leite fermentado kefir avaliados ao longo de 18 dias de armazenamento a $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, expressas em UFC/g.

Tempo (dias)	0	2	4	7	9	11	14	16	18
Kefir 1	$2,3 \times 10^{8a}$	$4,4 \times 10^{7b}$	$6,4 \times 10^{7ab}$	$4,7 \times 10^{7b}$	$3,1 \times 10^{7b}$	$7,5 \times 10^{7ab}$	$9,1 \times 10^{7ab}$	$4,1 \times 10^{7b}$	$5,1 \times 10^{7b}$
Kefir 2	$5,2 \times 10^{8a}$	$4,8 \times 10^{8a}$	$4,2 \times 10^{8ab}$	$3,2 \times 10^{8b}$	$5,9 \times 10^{7c}$	$7,8 \times 10^{7c}$	$9,2 \times 10^{7c}$	$5,6 \times 10^{7c}$	$5,6 \times 10^{7c}$

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Tabela 5. Contagem de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) após confronto com diferentes formulações de leite fermentado kefir, expressos em UFC/g.

	Tempo (horas)	Diferentes densidades populacionais de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)				
		A	B	C	D	E
(A > B > C > D > E)						
Kefir	0	$3,90 \times 10^{8a}$	$3,90 \times 10^{7a}$	$3,90 \times 10^{6a}$	$3,90 \times 10^{5a}$	$3,90 \times 10^{4a}$
1	24	$1,83 \times 10^{6b}$	$1,73 \times 10^{5b}$	$2,20 \times 10^{4b}$	$2,97 \times 10^{3b}$	$1,47 \times 10^{3b}$
	48	$1,37 \times 10^{6b}$	$3,40 \times 10^{5b}$	$5,10 \times 10^{4b}$	$5,00 \times 10^{3b}$	$5,67 \times 10^{2b}$
	72	$3,57 \times 10^{6b}$	$3,33 \times 10^{5b}$	$2,60 \times 10^{4b}$	$5,43 \times 10^{3b}$	$4,40 \times 10^{2b}$
Kefir	0	$3,90 \times 10^{8a}$	$3,90 \times 10^{7a}$	$3,90 \times 10^{6a}$	$3,90 \times 10^{5a}$	$3,90 \times 10^{4a}$
2	24	$2,57 \times 10^{6b}$	$2,20 \times 10^{5b}$	$4,50 \times 10^{4b}$	$2,80 \times 10^{4b}$	$5,23 \times 10^{3b}$
	48	$4,57 \times 10^{6b}$	$1,57 \times 10^{5b}$	$5,53 \times 10^{4b}$	$1,27 \times 10^{4b}$	$1,47 \times 10^{3bc}$
	72	$1,10 \times 10^{6b}$	$5,63 \times 10^{5b}$	$5,37 \times 10^{4b}$	$2,43 \times 10^{4b}$	$4,20 \times 10^{2c}$

Letras minúsculas iguais na mesma coluna (considerando cada formulação de kefir em separado) indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Tabela 6. Contagem de *Escherichia coli* (ATCC 11229) após confronto com diferentes formulações de leite fermentado kefir, expressos em UFC/g.

Tempo		Diferentes densidades populacionais de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)				
(horas)		(A > B > C > D > E)				
		A	B	C	D	E
Kefir 1	0	4,47 x 10 ^{8a}	4,47 x 10 ^{7a}	4,47 x 10 ^{6a}	4,47 x 10 ^{5a}	4,47 x 10 ^{4a}
	24	2,13 x 10 ^{6b}	2,63 x 10 ^{5b}	5,67 x 10 ^{4b}	3,83 x 10 ^{3b}	3,23 x 10 ^{2b}
	48	1,77 x 10 ^{6b}	1,50 x 10 ^{5b}	3,47 x 10 ^{4b}	3,83 x 10 ^{3b}	2,00 x 10 ^{2b}
	72	1,70 x 10 ^{6b}	2,17 x 10 ^{5b}	1,27 x 10 ^{4b}	4,33 x 10 ^{3b}	1,93 x 10 ^{2b}
Kefir 2	0	4,47 x 10 ^{8a}	4,47 x 10 ^{7a}	4,47 x 10 ^{6a}	4,47 x 10 ^{5a}	4,47 x 10 ^{4a}
	24	2,60 x 10 ^{6b}	2,80 x 10 ^{5b}	3,67 x 10 ^{4b}	4,37 x 10 ^{3b}	4,40 x 10 ^{2b}
	48	1,53 x 10 ^{6b}	2,40 x 10 ^{5b}	2,80 x 10 ^{4b}	3,53 x 10 ^{3b}	3,37 x 10 ^{2b}
	72	1,40 x 10 ^{6b}	1,20 x 10 ^{5b}	2,60 x 10 ^{4b}	1,40 x 10 ^{3b}	1,83 x 10 ^{2b}

Letras minúsculas iguais na mesma coluna (considerando cada formulação de kefir em separado) indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

CAPÍTULO IV

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE QUEIJO E SORO DE KEFIR

Atividade antibacteriana e composição centesimal de queijo e soro de kefir**Antibacterial activity and chemical composition of kefir cheese and whey**

Simone Weschenfelder ^(1*); Marcelo Pinto Paim ⁽²⁾; Carin Gerhardt ⁽³⁾; Heloisa Helena Chaves Carvalho ⁽⁴⁾ e José Maria Wiest ⁽⁵⁾

^{1, 2, 3, 4, 5} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500 – Campus do Vale – CEP 91505-970 – Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁽¹⁾ simoneweschenfelder@hotmail.com; ⁽²⁾ marcelloppaim@yahoo.com.br;

⁽³⁾ carin.gerhardt@gmail.com; ⁽⁴⁾ hhcarvalho@terra.com.br e ⁽⁵⁾ 00002497@ufrgs.br

Artigo submetido e formatado de acordo com a revista “Ciência Agrônômica”

RESUMO – O desenvolvimento de produtos diferenciados e que confirmam benefícios à saúde da população são um desafio para quem trabalha com alimentos. O objetivo do trabalho foi verificar a atividade antibacteriana *in loco* de queijo e soro obtidos através da coagulação microbiana com grãos de kefir frente a microrganismos de interesse alimentar; determinar a composição centesimal dos derivados lácteos produzidos. Foram elaboradas duas formulações de queijo (Q1 e Q2) e de soro (S1, S2) que foram confrontadas com cinco diferentes densidades populacionais (A > B > C > D > E) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11229) ao longo de 0; 24; 48 e 72 horas de exposição; e determinada a composição centesimal. Os resultados encontrados apontaram atividade antibacteriana do queijo e do soro de kefir, principalmente após 24 horas de confronto. A *Escherichia coli* (ATCC 11229) foi a bactéria mais sensível, alcançando atividade antibacteriana máxima no queijo nas densidades populacionais “D” e “E” e no soro nas densidades “B”, “C”, “D” e “E” após 48 e 72 horas. A composição centesimal dos queijos não diferiu estatisticamente para carboidratos e do soro para lipídeos. Os resultados do estudo podem ser utilizados para o desenvolvimento de derivados lácteos diferenciados e com propriedades funcionais.

Palavras-chave: Derivados lácteos. Potencial antibacteriano. Grãos de kefir.

ABSTRACT - The development of value added products, which confer benefits to the public health are a challenge for the food producers. This study aims to investigate the *in loco* antibacterial activity of cheese and whey obtained by coagulation of milk with kefir grains against foodborne microorganisms; and to determine the chemical composition of these dairy products. Two cheese formulations (Q1 and Q2) were prepared, resulting in two different kefir wheys (S1, S2). All products were confronted with five different densities (A > B > C > D > E) of *Staphylococcus aureus* (ATCC

25923) and *Escherichia coli* (ATCC 11229) over 0, 24, 48 and 72 hours of exposure; and were determined its chemical composition. Both kefir cheese and whey showed antibacterial activity, especially after 24 hours of exposure. *Escherichia coli* (ATCC 11229) was the most sensitive bacteria, with highest antibacterial activity in the cheese at densities "D" and "E" and whey in density "B", "C", "D" and "E" after 48 and 72 hours exposure. The chemical composition of the cheese was not significantly different for carbohydrates and whey lipids. This study could be used for the development of value added dairy products with functional properties.

Key words: Dairy products. Antimicrobial activity. Kefir grains.

INTRODUÇÃO

Diversos alimentos têm demonstrado avanços mercadológicos consideráveis, sendo que na área de laticínios, o queijo apresenta-se como um dos produtos mais versáteis. Produzido em todo o mundo, apresenta diversidade de sabores, texturas e formas, é agradável ao paladar de muitos e adequado para qualquer faixa etária. O soro, subproduto da fabricação de queijos também vem ganhando destaque, tendo em vista o volume produzido e a composição nutricional, é amplamente empregado para fabricação de produtos como a bebida láctea e a ricota (MAGALHÃES *et al.*, 2011; PAGNO *et al.*, 2009; PERRY, 2004).

O processo de fabricação do queijo requer a coagulação do leite que pode ser realizada pela ação física do coalho, de enzimas específicas, de bactérias específicas e de ácido orgânico (isolado ou combinado), todos de qualidade apta para uso alimentar. A coagulação de origem microbiana vem substituindo o coalho em muitos processos e confere características físico-químicas e sensoriais peculiares aos queijos elaborados (BRASIL, 1996; PERRY, 2004; SAAD; CRUZ; FARIA, 2011).

Os grãos de kefir são constituídos por uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias acéticas envoltas por uma matriz gelatinosa, referida como “kefiran”, que serve de sustentação para os diferentes constituintes dos grãos. Estes grãos se multiplicam e dobram de peso quando transferidos com frequência para o leite, e mesmo quando manipulados em condições artesanais, mantém suas características estruturais e de aparência (MAGALHÃES *et al.*, 2010; RIMADA; ABRAHAM, 2006; WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

Inúmeros microrganismos já foram identificados nos grãos de kefir, dentre eles microrganismos probióticos. Estes microrganismos conferem efeitos benéficos à saúde, como a melhora do equilíbrio da flora intestinal e defesa da mucosa, alívio dos sintomas relacionados à intolerância a lactose, estímulo do sistema imunológico, alívio da constipação, potencial antioxidante e atividade antibacteriana (MAGALHÃES *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2008; PLESSAS *et al.*, 2007; SHAH, 2007; WESCHENFELDER; CARVALHO; WIEST, 2009).

O desenvolvimento de produtos diferenciados, elaborados com grãos de kefir é de grande importância, visto que a relação entre alimentos e saúde é cada vez mais discutida, em um contexto onde os consumidores buscam alimentos mais saudáveis e que não causem riscos à saúde, apresentando-se como desafio para a indústria de alimentos. Queijos frescos e de alta umidade, com elevada atividade de água, faixa de pH próxima a neutralidade, baixa concentração de sal, ausência de conservantes e considerada concentração de lipídeos, produzidos com grãos de kefir, podem ser um excelente ambiente para o crescimento e a multiplicação de microrganismos com potencial probiótico (BURITI; CARDARELLI; SAAD, 2007; DIAS; LOBATO; VERRUMA-BERNARDI, 2009; LONDERO *et al.*, 2012; SAAD; CRUZ; FARIA, 2011; SANTOS *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2011; WESCHENFELDER *et al.*, 2011).

Assim o objetivo do trabalho foi elaborar duas formulações de queijo, a partir da coagulação microbiana com grãos de kefir; avaliar a atividade antibacteriana *in loco* do queijo e do soro resultante frente a patógenos (padrão) de interesse em alimentos; e verificar a composição centesimal.

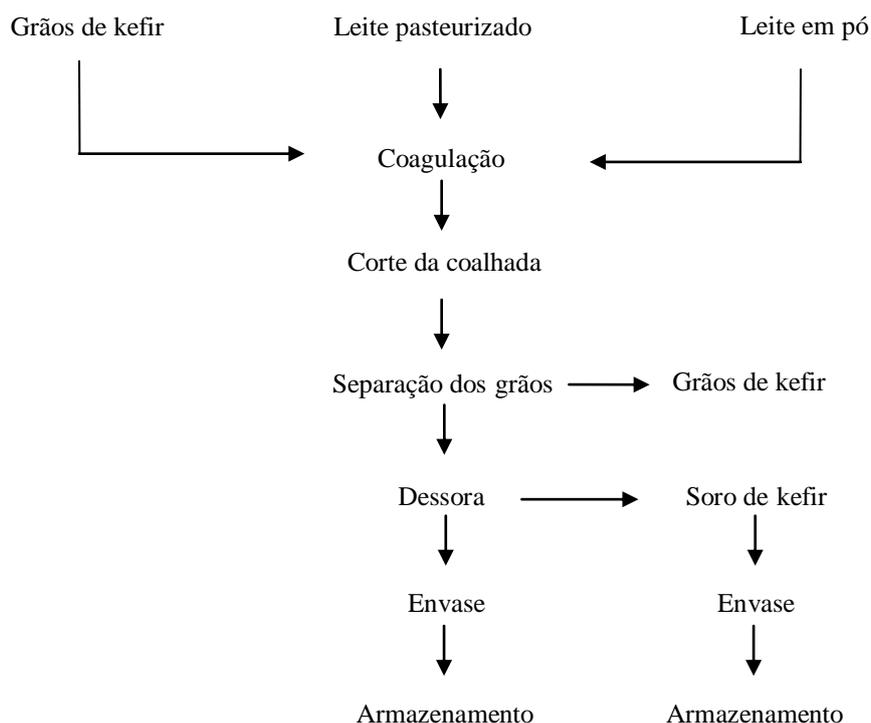
MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios de bromatologia e higiene de alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Produção de queijo e soro de kefir:

Duas formulações de queijo (Q1 e Q2) foram elaboradas a partir da coagulação microbiana do leite, empregando grãos de kefir oriundos do Laboratório de Higiene de Alimentos da UFRGS. Q1 e Q2 foram produzidos com leite pasteurizado e grãos de kefir (proporção 10:1, respectivamente) e a formulação Q2 foi acrescida mais 12% de leite em pó desnatado (figura 1).

Figura 1. Fluxograma da produção do queijo e do soro de kefir.



O queijo (Q1 e Q2) e o soro (S1 e S2) obtidos foram armazenados em embalagem de vidro, identificados e mantidos em Câmara Incubadora, tipo B.O.D. (modelo SP-500, SPLABOR) a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguindo para análise.

Avaliação físico-química do queijo e soro de kefir:

A composição centesimal foi determinada no leite empregado como matéria-prima, no queijo e no soro de kefir. A avaliação da fração lipídica deu-se através da extração etérea em aparelho Soxhlet, proteína bruta pelo método de Kjeldahl, umidade por meio de dessecação em estufa a vácuo ($85\text{ }^{\circ}\text{C}$), resíduo mineral fixo ou cinzas por meio de incineração em forno mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o valor de carboidratos totais, determinado por diferença. O pH dos derivados lácteos também foi avaliado (BRASIL, 2006).

Avaliação da atividade antibacteriana *in loco* do queijo e soro de kefir:

O queijo e o soro de kefir obtidos foram analisados quanto à presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* para comprovar a qualidade inicial do produto. Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229) foram empregadas para avaliação da atividade antibacteriana *in loco* do queijo e do soro de kefir. A reativação das bactérias foi realizada em BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas em meio aeróbio.

Diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) denominadas no trabalho como A, B, C, D e E (sendo $A > B > C > D > E$) foram incorporadas as formulações de queijo e soro de kefir, na proporção de 20:180. Os derivados lácteos foram mantidos em câmara incubadora, tipo B.O.D. a $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ao longo do experimento e analisados após 0; 24; 48 e 72 horas de confronto. A avaliação da atividade antibacteriana *in loco* baseou-se na contagem de colônias típicas em meio de cultura seletivo Agar Baird-Parker (BRASIL, 2003). As etapas acima descritas

também foram realizadas com a *Escherichia coli* (ATCC 11229), diferindo apenas em relação ao meio de cultura seletivo empregado (Agar Chromocult).

Os resultados foram submetidos à análise de Variância (ANOVA) e Teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software SAS 9.0. Os dados foram utilizados para diferenciação das formulações de queijo e soro de kefir e para verificar a atividade antibacteriana *in loco* frente aos patógenos de interesse em alimentos testados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal da matéria-prima empregada para fabricação do queijo e do soro (tabela 1) evidencia valores que se encontram em conformidade com referência da literatura (ORDÓNEZ, 2005).

Tabela 1. Composição centesimal do leite pasteurizado e do leite em pó utilizados para fabricação do queijo e do soro de kefir.

	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos	Minerais
Leite	87,10 ± 0,05	3,75 ± 0,08	3,00 ± 0,15	5,20 ± 0,11	0,95 ± 0,31
Leite em pó	1,95 ± 0,31	32,95 ± 0,49	0,71 ± 0,10	55,77 ± 0,82	8,62 ± 0,49

A adição de leite em pó desnatado a formulação Q2 proporcionou aumento no teor proteico, de carboidratos e cinzas (tabela 2). O pH de Q1 e Q2 foi de 4,8 e 5,0 respectivamente. Estudo desenvolvido por Weschenfelder *et al.* (2011) encontrou valores semelhantes no queijo leban produzido a base de kefir, sendo que a principal diferença constatada é que o queijo leban não apresentava carboidratos em sua composição e era mais ácido. Essas diferenças podem ser justificadas pelo tempo de contato dos grãos de kefir com o leite, que foi maior (168 horas) no referido estudo.

Q1 e Q2 podem ser classificados ainda como “queijo fresco”, pois estão prontos para consumo logo após a fabricação, não sendo necessária a maturação. Q1 é um queijo semigordo e Q2 um queijo magro, com 40% e 21,46% de lipídeos no extrato seco, respectivamente. Quanto à umidade Q1 e Q2 recebem a classificação de queijos

de “muito alta umidade”, pois os valores encontrados foram maiores do que 55% (BRASIL, 1996).

Tabela 2. Composição centesimal de queijo de kefir.

Queijo	Umidade	Proteínas	Lípídeos	Carboidratos	Cinzas
Q1	74,13 ± 0,13 ^b	9,10 ± 0,08 ^b	10,35 ± 0,59 ^a	5,58 ± 0,77 ^a	0,59 ± 0,04 ^b
Q2	77,73 ± 0,64 ^a	9,69 ± 0,32 ^a	4,78 ± 0,06 ^b	6,48 ± 0,99 ^a	1,32 ± 0,05 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

A composição centesimal do soro (tabela 3) demonstrou que o soro obtido do queijo de kefir apresenta constituição semelhante ao soro oriundo da fabricação de outros tipos de queijos, sendo composto basicamente por água (mais de 85%), 20% das proteínas do leite, lactose e elementos minerais (SOARES *et al.*, 2011). O pH de 4,0 e 4,2 para S1 e S2 respectivamente, classifica o soro obtido como “soro de leite ácido” (BRASIL, 1996). O estudo desenvolvido por Magalhães *et al.*, (2011) apontou que o soro do queijo pode ser usado como matéria-prima para fabricação de derivados de kefir, uma que vez que comparando o kefir de leite com o kefir de soro de leite constataram semelhanças. Assim o soro de kefir obtido no presente estudo poderia ser fermentado por grãos de kefir, resultando em um novo produto a ser explorado.

Tabela 3. Composição centesimal de soro de kefir.

Soro	Umidade	Proteína	Lípídeos	Carboidratos	Cinzas
S1	93,7 ± 0,04 ^a	0,62 ± 0,02 ^b	0,3 ± 0,01 ^a	4,88 ± 0,04 ^b	0,5 ± 0,07 ^b
S2	87,35 ± 0,18 ^b	1,15 ± 0,04 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	9,87 ± 0,05 ^a	1,31 ± 0,1 ^a

Letras minúsculas iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Tanto o queijo quanto o soro de kefir elaborados não apresentaram contaminação com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, comprovando a qualidade inicial do produto. A atividade antibacteriana avaliada no queijo de kefir frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229) está apresentada nas tabelas 4 e 5. Os resultados permitem afirmar que o queijo de kefir, independente da

formulação (Q1 e Q2) apresenta em sua composição substâncias com potencial antibacteriano, uma que vez que as concentrações dos patógenos vão reduzindo, independente da concentração testada. Considerando o tempo, maior atividade antibacteriana foi constatada após 24 horas de confronto. Rodrigues, Carvalho e Schneedorf (2005) em estudo sobre a ação anti-inflamatória observaram amplo efeito do kefir produzido com leite frente ao *Staphylococcus aureus*.

Tabela 4. Atividade antibacteriana do queijo de kefir frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), expressa em log (concentração UFC/g).

Queijo de kefir	Tempo (horas)	Densidades populacionais de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) (A > B > C > D > E)				
		A	B	C	D	E
Q1	0	8,59 ^a	7,59 ^a	6,59 ^a	5,59 ^a	4,59 ^a
	24	7,18 ^b	5,66 ^b	4,71 ^b	4,29 ^b	3,25 ^c
	48	6,51 ^c	5,70 ^b	4,66 ^b	3,62 ^c	3,65 ^b
	72	6,35 ^c	5,17 ^c	4,30 ^c	3,33 ^c	3,12 ^c
Q2	0	8,59 ^a	7,59 ^a	6,59 ^a	5,59 ^a	4,59 ^a
	24	6,24 ^b	5,66 ^b	4,38 ^b	3,61 ^b	2,58 ^b
	48	6,39 ^b	5,65 ^b	4,54 ^b	3,73 ^b	2,75 ^b
	72	6,06 ^b	5,42 ^b	4,49 ^b	3,67 ^b	2,06 ^c

Letras minúsculas iguais na mesma coluna (considerando cada queijo de kefir separadamente) indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

É possível constatar que a *Escherichia coli* (ATCC 11229) foi mais sensível que o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) uma vez que se obteve atividade antibacteriana máxima ou destruição total do patógeno nas densidades populacionais “D” e “E” após 48 e 72 horas de confronto (tabela 5). O *Staphylococcus aureus* pode ser facilmente isolado de derivados lácteos em função da mastite bovina, enquanto que a *Escherichia coli* está atrelada a aspectos higiênico-sanitários, o que pode justificar a maior resistência do primeiro no queijo (ACHA; SZYFRES, 2003; FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Tabela 5. Atividade antibacteriana do queijo de kefir frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229), expressa em log (concentração UFC/g).

Queijo de kefir	Tempo (horas)	Densidades populacionais de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) (A > B > C > D > E)				
		A	B	C	D	E
Q1	0	8,62 ^a	7,62 ^a	6,62 ^a	5,62 ^a	4,62 ^a
	24	5,30 ^b	4,23 ^b	4,21 ^b	3,40 ^b	2,30 ^b
	48	5,40 ^b	4,31 ^b	3,81 ^{bc}	2,50 ^c	*
	72	5,20 ^b	4,24 ^b	3,59 ^c	*	*
Q2	0	8,62 ^a	7,62 ^a	6,62 ^a	5,62 ^a	4,62 ^a
	24	6,45 ^b	5,31 ^b	4,27 ^b	3,54 ^b	2,55 ^b
	48	5,63 ^c	5,40 ^b	3,64 ^c	2,46 ^c	2,03 ^c
	72	5,62 ^c	4,58 ^c	3,20 ^c	2,34 ^c	*

* Atividade antibacteriana máxima/não houve crescimento bacteriano.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna (considerando cada queijo de kefir separadamente) indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Os microrganismos testados no estudo apresentaram resistência as baixas temperaturas empregadas no armazenamento ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ao pH ácido do soro, sinalizando a capacidade de adaptação ao meio. Os resultados da atividade antibacteriana do soro estão apresentados nas tabelas 6 e 7. O pH mais ácido da formulação S1 pode ter influenciado na maior atividade antibacteriana observada quando comparado a S2 (tabela 7), contudo, ele não foi o responsável pela inibição. Weschenfelder, Carvalho e Wiest (2009) observaram atividade antibacteriana máxima do soro de kefir (pH 5,8) frente a *Escherichia coli* em estudo *in vitro*, assim como Santos *et al.*, (2013) constaram atividade antibacteriana do kefir com pH de 6,05 frente a diferentes patógenos, apontando que substâncias com potencial antibacteriano oriundas dos grãos de kefir e resultantes do processo fermentativo estavam presentes nos alimentos avaliados.

Tabela 6. Atividade antibacteriana de soro de kefir frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), expressa em log (concentração UFC/mL).

Soro de kefir	Tempo (horas)	Densidades populacionais de <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) (A > B > C > D > E)				
		A	B	C	D	E
S1	0	8,59 ^a	7,59 ^a	6,59 ^a	5,59 ^a	4,59 ^a
	24	6,82 ^b	5,58 ^b	4,74 ^b	3,61 ^b	3,26 ^b
	48	5,65 ^c	4,84 ^c	3,83 ^c	3,04 ^c	2,03 ^c
	72	5,49 ^c	4,64 ^c	2,33 ^d	2,65 ^c	2,05 ^c
S2	0	8,59 ^a	7,59 ^a	6,59 ^a	5,59 ^a	4,59 ^a
	24	6,28 ^b	5,62 ^b	4,66 ^b	3,47 ^b	2,42 ^b
	48	5,69 ^c	4,73 ^c	4,35 ^c	3,42 ^b	2,54 ^b
	72	5,68 ^c	4,70 ^c	3,24 ^d	3,18 ^b	2,04 ^c

Letras minúsculas iguais na mesma coluna (considerando cada soro de kefir separadamente) indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

Tabela 7. Atividade antibacteriana de soro de kefir frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229), expressa em log (concentração UFC/mL).

Soro de kefir	Tempo (horas)	Diferentes densidades populacionais de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) (A > B > C > D > E)				
		A	B	C	D	E
S1	0	8,62 ^a	7,62 ^a	6,62 ^a	5,62 ^a	4,62 ^a
	24	4,35 ^b	3,44 ^b	2,45 ^b	2,13 ^b	2,20 ^b
	48	3,30 ^c	2,34 ^c	*	*	*
	72	2,18 ^d	*	*	*	*
S2	0	8,62 ^a	7,62 ^a	6,62 ^a	5,62 ^a	4,62 ^a
	24	6,60 ^b	5,43 ^b	4,50 ^b	3,29 ^b	2,09 ^b
	48	5,12 ^c	4,70 ^c	3,11 ^c	2,18 ^c	*
	72	4,57 ^c	4,03 ^d	2,09 ^d	2,03 ^c	*

* Atividade antibacteriana máxima/não houve crescimento bacteriano.

Letras minúsculas iguais na mesma coluna (considerando cada soro de kefir separadamente) indicam que não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) segundo teste de Tukey.

A composição centesimal das formulações Q2 e S2 pode ter influenciado na atividade antibacteriana observada, uma vez que há maior quantidade de nutrientes nestas formulações (quando comparadas a Q1 e S1, respectivamente). A composição do alimento pode ter tido “ação protetora” para os patógenos em estudo.

Assim como no queijo, a atividade antibacteriana do soro foi maior para a *Escherichia coli*, observando-se atividade antibacteriana máxima em diferentes densidades populacionais testadas (B, C, D, E), principalmente na formulação S1. Contudo, é válido ressaltar que somente após 48 horas de confronto esses resultados foram atingidos, o que não garante necessariamente a segurança do alimento, principalmente nos casos onde o patógeno é capaz de produzir toxinas. Dias *et al.* (2012) em estudo *in loco* com kefir produzido com leite contaminado também observaram que microrganismos como a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*, sobrevivem no leite fermentado, por até 72 horas de confronto.

Os resultados encontrados apontam que os derivados lácteos produzidos com grãos de kefir apresentam atividade antibacteriana e comparando com outros estudos entende-se que a intensidade dessa atividade vai depender de vários elementos, como os componentes da matéria-prima, a composição microbiana dos grãos, os processos físico-químicos envolvidos na fermentação, as condições de embalagem e armazenamento dos alimentos, bem como das características do patógeno avaliado.

CONCLUSÕES

1. O queijo e o soro de kefir apresentaram atividade antibacteriana frente aos patógenos alimentares testados, principalmente após 24 horas de confronto.
2. A atividade antibacteriana foi maior frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229), sendo observada atividade antibacteriana máxima após 48 e 72 horas de confronto de Q1, Q2, S1 e S2 com diferentes densidades populacionais do microrganismo testadas.
3. Q1 e Q2 diferiram estatisticamente quanto ao teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade e S1 e S2 quanto ao teor de proteínas, carboidratos, cinzas e umidade.
4. Os resultados obtidos servem de base para a realização de mais estudos com vistas ao desenvolvimento de derivados lácteos distintos.

REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis and communicable diseases common to men and animals: bacteriosis and mycosis**. 3 ed. Washington: World Health Organization. Cientifical and Technical Publication, 2003, 398p.

BURITI, F. C. A.; CARDARELLI, H. R.; SAAD, S. M. I. Biopreservation by *Lactobacillus paracasei* in coculture with *Streptococcus thermophilus* in potentially probiotic and symbiotic fresh cream cheeses. **Journal of Food Protection**, v. 70, p. 228-235, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite UAT (UHT)**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água**. Diário Oficial da União, 26 ago. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa os Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 14 dez. 2006.

DIAS, P. A. *et al.* Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, p 182-186, 2012.

DIAS, S. S; LOBATO, V; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, p. 327-333, 2009.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p

LONDERO, A. *et al.* Kefir grains as a starter for whey fermentation at different temperatures: chemical and microbiological characterization. **Journal of Dairy Research**, v. 79, p. 262-271, 2012.

MAGALHÃES, K. T. *et al.* Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8843-8850, 2010.

MAGALHÃES, K. T. *et al.* Comparative study of the biochemical changes and volatile compounds during the production of novel whey-based kefir beverages and traditional milk kefir. **Food Chemistry**, v. 126, p. 249-253, 2011.

MOREIRA, M. E. C. *et al.* Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, v. 31, p. 1738-1742, 2008.

ORDÓNEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**, v. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005, 280p.

PAGNO, C. H. *et al.* Obtenção de concentrados protéicos de soro de leite e caracterização de suas propriedades funcionais tecnológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, p. 231-239, 2009.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

- PLESSAS, S. *et al.* Immobilization of *kefir* and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. **Food Chemistry**, v. 105, p. 187-194, 2007.
- RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim milk gels. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 33-39, 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, 2005.
- SAAD, S. M. I; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011. 669 p.
- SANTOS, J. P. V. *et al.* Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 56, p. 823-827, 2013.
- SANTOS, T. S. S. *et al.* “Petit suisse” cheese from *kefir*: an alternative dessert with microorganisms of probiotic activity. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, p. 485-491, 2012.
- SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.
- SOARES, D. S. *et al.* Aproveitamento de soro de queijo para produção de iogurte probiótico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p. 996-1002, 2011.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 48-55, 2009.

WESCHENFELDER, S. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, p.473-480, 2011.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA ROTULAGEM NUTRICIONAL E DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DE DIFERENTES MARCAS DE LEITE PASTEURIZADO E LEITE UHT

Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT

Simone Weschenfelder ^{1*}, Marcelo Pinto Paim², Carin Gerhardt ³, José Maria Wiest⁴

^{1,2,3,4} Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Bento Gonçalves, 9500 - Campus do Vale - CEP 91505-970 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

*Autor para correspondência. Email: simone.weschenfelder@yahoo.com.br

Artigo submetido e formatado de acordo com a revista "Boletim de Indústria Animal"

RESUMO

O objetivo do estudo foi verificar se diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT integral atendem aos parâmetros de rotulagem e ao regulamento técnico de identidade e qualidade estabelecido pela legislação brasileira. Foram avaliadas dez marcas de leite integral, sendo duas de leite pasteurizado e oito de leite UHT. Quanto à rotulagem, todas as marcas apresentaram conformidade em relação aos parâmetros exigidos pela legislação. Uma marca de leite pasteurizado e três de leite UHT não estavam em conformidade em pelo menos dois, dos cinco lotes avaliados para parâmetros como percentual de gordura, extrato seco desengordurado, peroxidase e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis. Os resultados encontrados apontam que em quatro das dez marcas avaliadas, existe a necessidade de um maior monitoramento das etapas de beneficiamento do leite, uma vez que os alimentos industrializados oferecidos à população devem atender aos parâmetros estabelecidos pela legislação, sendo sinônimos de qualidade e segurança para quem os consome.

Palavras-chave: legislação, leite, qualidade.

Evaluation of physicochemical and microbiological characteristics and nutritional labeling of pasteurized and UHT milk brands

ABSTRACT

This study aims to identify the adequacy of different milk brands to the labeling regulations and the food identity and quality parameters established by the Brazilian food law. Ten different milk brands submitted to pasteurization (2 brands) and UHT (8 brands) were tested. All brands met the technical requirements for labeling. However, one pasteurized and three UHT brands failed to meet in at least two of five batches tested for fat content, dry defatted extract, peroxidase and total viable count of strict and facultative aerobic mesophiles. The results indicate that 40% of milk brands need more monitoring during food processing, as they should have met the parameters established by the regulations and should be a synonym of quality and safety to its consumers.

Keywords: food law, milk, quality.

INTRODUÇÃO

O leite é composto por água (87%) proteínas (3,5%), gordura (3,5%), carboidratos (4,9%), minerais (0,7%) e vitaminas e pode apresentar variações em sua constituição de acordo com a alimentação e a raça animal, o número de lactações, a época do ano, dentre outros fatores (Sgarbieri, 2005; Noro et al., 2006). Por ser altamente nutritivo, o leite pode se tornar um excelente meio de cultura para microrganismos deteriorantes e patogênicos, devendo ser obtido em condições de higiene, sendo imediatamente refrigerado e posteriormente processado termicamente (BRASIL, 2011; BRASIL, 1996).

Visando a garantia e a segurança dos alimentos ofertados a população, são estabelecidos, pela legislação brasileira vigente, parâmetros de identidade e requisitos mínimos de qualidade para os alimentos industrializados, como o leite pasteurizado e o leite UHT (*Ultra High Temperature*). Assim, todas as indústrias que processam alimentos, precisam monitorar as etapas de produção a fim de que cheguem ao consumidor alimentos aptos para o consumo, tanto do ponto de vista físico-químico, quanto microbiológico e sensorial (BRASIL, 2011; BRASIL, 1996).

Ainda em relação à segurança e a qualidade dos alimentos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece diferentes Resoluções de Diretoria Colegiada (RDCs) com informações que devem ser apresentadas nos rótulos dos produtos, informando ao consumidor as características dos alimentos que estão sendo adquiridos e promovendo escolhas alimentares mais saudáveis (Bastos et al., 2008).

Embora apresentando critérios mínimos de qualidade estabelecidos pela legislação, observaram-se no Brasil nos últimos anos vários casos de adulteração de alimentos, principalmente relacionados à cadeia produtiva do leite, envolvendo produtores, transportadores e indústrias de grande porte, revelando fragilidades no sistema de produção do leite em larga escala e questionando se o sistema de inspeção e as ferramentas de controle de qualidade são capazes de garantir a segurança dos alimentos produzidos (Cruz e Schneider, 2010).

Considerando este contexto o presente trabalho teve o objetivo de avaliar se diferentes marcas comerciais de leite pasteurizado e leite UHT, atendem a legislação de rotulagem e aos padrões de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira vigente.

MATERIAL E MÉTODOS

Os leites foram adquiridos ao longo de doze meses em estabelecimentos comerciais localizados no município de Porto Alegre, RS. No momento da aquisição das amostras foi observado o estado de conservação da embalagem e a data de validade do produto. Como critério de inclusão, foram analisadas todas as marcas que apresentavam o produto na forma integral, optando-se também por fabricantes devidamente registrados junto ao SIF (Sistema de Inspeção Federal) ou ao CISPOA (Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal).

Assim, dez diferentes marcas de leite foram selecionadas, sendo duas de leite pasteurizado integral (nomeadas como M1 e M2) e oito de leite UHT integral (nomeadas como M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9 e M10) analisando-se ainda cinco diferentes lotes de cada marca, totalizando 50 amostras.

As informações dos rótulos das diferentes marcas de leite avaliadas foram confrontadas com o que é preconizado na RDC nº 40/2002 (ANVISA, 2002a), RDC nº 222/2002 (ANVISA, 2002b), RDC nº 259/2002 (ANVISA, 2002c), RDC nº 359/2003 (ANVISA, 2003a) e na RDC nº 360/2003 (ANVISA, 2003b) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, verificando-se assim se as amostras atendiam o preconizado pela legislação de rotulagem vigente.

As análises físico-químicas realizadas englobaram a determinação da acidez total, através de titulometria expressa em °Dornic, a avaliação da estabilidade ao alizarol a 68% (no leite UHT) e a 72% (no leite pasteurizado), a densidade a 15°C, o teor de gordura através do método butirométrico de Gerber, o índice crioscópico (IC) através do uso do crioscópio eletrônico digital, o extrato seco total (EST) e o extrato seco desengordurado (ESD) através do cálculo utilizando a fórmula de Fleishmann e por fim, a verificação da peroxidase e da fosfatase alcalina, seguindo os protocolos estabelecidos pela Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006). Todas as análises foram realizadas em triplicata, calculando-se a média dos valores encontrados.

As amostras de leite foram submetidas também à análise microbiológica, com a realização da contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis. Antes da realização das análises, as embalagens das marcas de leite UHT foram incubadas fechadas a 35-37°C por sete dias, conforme recomendação da legislação (BRASIL, 1996). Para a contagem foram preparadas diluições decimais

usando água peptonada a 0,1%, que foram depositadas no fundo de placas de petri utilizando a técnica de plaqueamento em profundidade (*Pour Plate*) em meio Ágar Padrão para Contagem (PCA). Após a homogeneização e solidificação, as mesmas foram incubadas a 36°C por 48 horas para posterior contagem conforme a técnica descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.

Os resultados da avaliação físico-química e microbiológica foram confrontados com os parâmetros estabelecidos pela Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011) para as amostras M1 e M2 e com os parâmetros da Portaria nº 146 de 7 de março de 1996 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária (BRASIL, 1996) para as amostras M3 a M10, avaliando assim quais estavam e quais não estavam em conformidade com a legislação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da rotulagem nutricional

Das dez marcas de leite analisadas, oito eram de fabricantes registrados junto ao SIF e duas (M9 e M10) junto a CISPOA. Quanto à rotulagem nutricional todas as marcas atenderam ao que é exigido pela RDC nº 259/2002, apresentando a denominação de venda do produto, a lista de ingredientes, o prazo de validade, o número do lote e a identificação do fabricante. Essas informações estavam apresentadas de forma clara e legível no rótulo. Não foram encontradas informações que poderiam induzir o consumidor ao erro, engano ou confusão, sendo esse tipo de conformidade imprescindível, porém nem sempre atendida pelos fabricantes (Oliveira et al., 2014).

Os rótulos das diferentes marcas também atenderam ao que é preconizado na RDC nº 40/2002 e na RDC nº 222/2002. A primeira referente à apresentação em destaque da presença do glúten no alimento, fundamental para indivíduos portadores da doença celíaca. Já a segunda fundamental no sentido de orientar que o leite materno não deve ser substituído pelo leite pasteurizado ou leite UHT.

No que se refere à RDC nº 359/2003, todas as marcas estavam em conformidade, apresentando porção de 200 mL e medida caseira de um copo, sendo estas medidas fundamentais para compreensão da informação nutricional e do valor energético dos

alimentos apresentadas no rótulo (RDC nº 360/2003). Em relação às informações nutricionais todas as marcas apresentavam os itens exigidos pela RDC nº 360/2003 sendo apresentadas na forma de tabela no rótulo. Conformidades em relação à rotulagem nutricional do leite UHT também foram observadas por Camara e Weschenfelder (2014), diferente dos resultados obtidos por Silva e Ferreira (2010) que encontraram diversas inconformidades ao avaliarem o rótulo de diferentes tipos de queijo.

Avaliação dos parâmetros de identidade e qualidade

Os resultados da avaliação físico-química e microbiológica das cinquenta amostras estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1 e 2

Todas as amostras de leite pasteurizado e leite UHT avaliadas apresentaram estabilidade frente ao teste de alizarol, indicando estabilidade térmica do produto e conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2011; BRASIL, 1996). Os valores encontrados na determinação da acidez também atenderam a legislação (tabela 1 e 2). Resultados semelhantes foram encontrados por Camara e Weschenfelder (2014) ao avaliarem cinco marcas de leite UHT integral e Robim et al. (2012) ao avaliarem cinquenta e oito amostras, diferindo dos resultados encontrados por Bersot et al. (2010) que obtiveram 7,4% dos resultados da acidez titulável em desacordo com a legislação, nas amostras de leite UHT analisadas. Variações nos valores de acidez são facilmente detectados, uma vez que podem oscilar de acordo com a composição química do leite, a raça do animal, o período de lactação, o processo de esterilização e a degradação do produto.

Nas análises de densidade, índice crioscópico, percentual de gordura, EST (extrato seco total) e ESD (extrato seco desengordurado) no leite pasteurizado integral, foi possível constatar inconformidades em relação à legislação em dois lotes da marca "M2" em relação ao percentual de gordura e ao extrato seco desengordurado (BRASIL, 2011). Estas inconformidades podem resultar em um menor rendimento dos produtos que utilizam o leite pasteurizado como matéria-prima e também na diminuição do valor nutricional do alimento, divergindo também dos dados apresentados na tabela de informação nutricional do produto. Inconformidades semelhantes foram encontradas em três lotes das marcas M7 e M9 de leite UHT integral e em um lote da

marca M10. Tamanini et al. (2011) encontraram seis amostras (das trinta e três analisadas), em desacordo com o percentual de gordura, porém em conformidade em relação ao sólidos não gordurosos. Já Bersot et al. (2010) encontram inconformidades em relação ao teor de gordura em quarenta e três amostras e em relação ao extrato seco desengordurado em setenta e cinco amostras (das cento e cinquenta analisadas), reforçando a necessidade de um maior monitoramento dos alimentos que chegam ao consumidor. As determinações da densidade e do índice crioscópico, corroboram com valores de gordura e de EST encontrados, apontando possíveis diluições da matéria-prima e/ou deficiência de nutrientes na alimentação dos ruminantes.

As análises da atividade enzimática da peroxidase e da fosfatase alcalina são amplamente empregadas pelas indústrias de laticínios para verificar se o processo de pasteurização foi conduzido adequadamente, respeitando o tempo e a temperatura pré-estabelecidos. Os resultados encontrados no leite pasteurizado da marca M2 indicam tratamento térmico excessivo do leite no 2º e no 3º lote analisado (tabela 3), resultado este reforçado pela contagem padrão de microrganismos aeróbios mesófilos, descaracterizando estes lotes como sendo de leite pasteurizado.

Já os resultados encontrados por Santos et al. (2011) estavam de acordo com a legislação, uma vez que todas as vinte amostras de leite pasteurizado apresentaram peroxidase positiva e fosfatase alcalina negativa. O emprego de temperaturas excessivas no processo de pasteurização pode acontecer pela falha do controle de qualidade, responsável pelo monitoramento do processo ou mesmo para mascarar a utilização de matéria-prima de procedência duvidosa e/ou qualidade inferior (altamente contaminada).

Tabela 3

Ataíde et al. (2008) encontraram valores médios de microrganismos mesófilos de $1,4 \times 10^4$ UFC/mL e inconformidades em relação a peroxidase em quatro amostras de leite pasteurizado analisadas, apontando a necessidade da realização de análises microbiológicas no leite na saída do pasteurizador. Um maior monitoramento do processo também se faz necessário uma vez que a pasteurização é um processo obrigatório a todo leite destinado à produção de derivados lácteos no Brasil, sendo uma das principais barreiras no sentido de impedir a proliferação de microrganismos indesejáveis.

Nas amostras de leite UHT integral todas as marcas apresentaram resultado

satisfatório quanto à análise da peroxidase e da fosfatase alcalina (tabela 4). Contudo os resultados da análise microbiológica indicaram falhas no processamento ou contaminação pós-tratamento térmico, uma vez que as marcas M7, M9 e M10 apresentaram contagens microbianas acima do estabelecido pela legislação ($< 1,0 \times 10^2$ UFC/mL) para microrganismos aeróbios mesófilos nos lotes 3 e 5; 1 e 2; e 4 (respectivamente).

Tabela 4

Tamanini et al. (2011), ao analisarem trinta e três amostras de leite UHT, encontraram sete fora do padrão para aeróbios mesófilos, sendo que todas apresentaram resultado negativo para o teste da fosfatase. Vidal-Martins et al. (2005) encontraram vinte e cinco das cento e dez amostras de leite UHT fora do padrão para aeróbios mesófilos, sendo que apenas duas marcas (das onze analisadas), apresentaram conformidade em todos os lotes analisados. Bersot et al. (2010) encontraram contagens superiores em trinta e seis das cento e cinquenta amostras de leite UHT analisadas.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 (BRASIL, 2001) não estabelece parâmetros microbiológicos específicos para o leite UHT e afirma apenas que deve haver ausência de microrganismos patogênicos e deteriorantes no leite. Considerando a respectiva RDC e levando em consideração a Portaria nº 146/1996 (BRASIL, 1996), é possível afirmar que do ponto de vista microbiológico existe uma fragilidade na legislação que pode comprometer o monitoramento da qualidade do leite UHT ofertado ao consumidor.

CONCLUSÕES

Todas as marcas avaliadas atenderam ao preconizado na legislação brasileira de rotulagem. Uma marca de leite pasteurizado integral (M2) e três marcas de leite UHT integral (M7, M9, M10) não atenderam aos parâmetros mínimos de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira vigente em pelo menos dois dos cinco lotes avaliados, apontando falhas no processo de beneficiamento. O monitoramento do controle de qualidade das indústrias responsáveis pelos produtos, bem como a ação dos órgãos fiscalizadores precisam ser reforçados a fim de impedir que lotes dos produtos que não contemplam os parâmetros mínimos de identidade e qualidade, cheguem à mesa do consumidor.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 10 jan. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 40, de 8 de fevereiro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico para ROTULAGEM DE ALIMENTOS E BEBIDAS EMBALADOS QUE CONTENHAM GLÚTÊN, constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 13 fev. 2002a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 222, de 5 de agosto de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico para Promoção Comercial de Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância, constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 ago. 2002b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 set. 2002c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 dez. 2003a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 26 dez. 2003b.

ATAIDE, W. S.; MACIEL, J. F.; LIMA, P. L. A.; LIMA, A. R. C.; SILVA, F. V. G.; SILVA, J. A. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impressa)**, v. 67, n.1, p. 73-77, 2008.

BASTOS, A. A. BELINELLO, M. H.; SARAIVA, T. C. C.; SOUTO, A. C. Avaliação da qualidade sanitária dos rótulos de alimentos embalados de origem animal. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 32, n. 2, p. 218-231, 2008.

BERSOT, L. S.; GALVÃO, J. A.; RAYMUNDO, N. K. L.; BARCELLOS, V. C.; PINTO, J. P. A.N; MAZIERO, M. T. Avaliação microbiológica e físico-química de leites UHT produzidos no Estado do Paraná-Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 645-652, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UAT (UHT). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996. Seção 1, p. 3977.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006. Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite pasteurizado. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília 30 de dez. 2011. Seção 1, p. 6.

CAMARA, F. A.; WESCHENFELDER, S. Leite UHT integral: avaliação da rotulagem nutricional e dos padrões de identidade e qualidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 4, p.268-279, 2014.

CRUZ, F. T.; SCHNEIDER, S. Qualidade dos alimentos, escalas de produção e valorização de produtos tradicionais. **Revista Brasileira de Agroecologia** v. 5, n. 2, p. 22-38, 2010.

NORO, G.; GONZÁLES, F. H. D., CAMPOS, R.; DÜRR, J. W. Fatores ambientais que afetam a produção e a composição do leite em rebanhos assistidos por cooperativas no Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.1129-1135, 2006.

OLIVEIRA, L. E.; SILVA, C. O.; PASCOAL, G. B. Comparação entre a composição nutricional dos rótulos e as análises laboratoriais de queijos minas frescal (tradicional e light). **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 4, p. 280-288, 2014.

ROBIM, M. S.; CORTEZ, M. A. S.; SILVA, A. C. O.; FILHO, R. A. T.; GEMAL, N. H.; NIGUEIRA, E. B. Pesquisa de fraude no leite UAT integral comercializado no estado do Rio de Janeiro e comparação entre os métodos de análises físico-químicas oficiais e o método de ultrassom. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 389, p. 43-50, 2012.

SANTOS, N. A.F.; LACERDA, L. M.; RIBEIRO, A. C.; LIMA, M. F. V.; GALVÃO, N. R.; VIEIRA, M. M.; SILVA, M. I. S.; TENÓRIO, T. G. S. Avaliação da composição e qualidade físico-química do leite pasteurizado pradonizado comercializado na cidade de São Luís, MA. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.78, n.1, p.109-113, 2011.

SGARBIERI, V. C. Revisão: propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SILVA, L. F. M.; FERREIRA, K. S. Avaliação da rotulagem nutricional, composição química e valor energético de queijo minas frescal, queijo minas frescal “light” e ricota. **Alimentos e Nutrição**, v 21, n. 3, p. 437-441, 2010.

TAMANINI, R.; BELOTI, V.; JÚNIOR, J. C. R.; SILVA, L. C. C.; YAMADA, A. K.; SILVA, F. A. Contribuição ao estudo da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 66, n. 382, p.27-33, 2011.

VIDAL-MARTINS, A.M.C.; ROSSI Jr. O. D.; REZENDE-LAGO, N.C. Microrganismos heterotróficos mesófilos e bactérias do grupo de *Bacillus cereus* em leite integral submetido a ultra alta temperatura. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n. 3, p. 396-400, 2005.

Tabela 1. Valores médios obtidos na análise físico-química de duas marcas comerciais de leite pasteurizado integral.

Marca	Lote	Acidez (°D)	Alizarol 72% (v/v)	Densidade (g/mL)	Gordura (%)	Índice Crioscópico (°H)	EST (%)	ESD (%)
M1	1°	15,4	Estável	1,032	3,2	-0,544	12,1	8,9
	2°	15,0	Estável	1,030	3,0	-0,538	11,4	8,4
	3°	15,2	Estável	1,032	3,2	-0,544	12,1	8,9
	4°	15,2	Estável	1,030	3,2	-0,542	11,6	8,4
	5°	16,1	Estável	1,032	3,3	-0,544	12,2	8,9
M2	1°	14,6	Estável	1,030	3,1	-0,540	11,5	8,4
	2°	14,0	Estável	1,028	2,9	-0,530	10,7	7,8
	3°	14,8	Estável	1,031	3,1	-0,540	11,7	8,6
	4°	15,0	Estável	1,030	3,2	-0,540	11,6	8,4
	5°	14,8	Estável	1,030	2,9	-0,534	11,2	8,3
Instrução Normativa nº62/2011*	14-18	Estável	NCL	NCL	Mínimo 3%	-0,530 a -0,550°H	NCL	Mínimo 8,4%

EST: extrato seco total; ESD: extrato seco desengordurado.

* Parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite pasteurizado integral pela Instrução Normativa nº62/2011 (BRASIL, 2011).

NCL: parâmetro não contemplado pela legislação.

Tabela 2. Valores médios obtidos na análise físico-química de oito marcas comerciais de leite UHT integral.

Marca	Lote	Acidez (°D)	Alizarol 68% (v/v)	Densidade (g/mL)	Gordura (%)	Índice Crioscópico (°H)	EST (%)	ESD (%)
M3	1°	16,0	Estável	1,029	3,2	-0,540	11,4	8,2
	2°	16,4	Estável	1,030	3,1	-0,540	11,5	8,4
	3°	16,6	Estável	1,030	3,1	-0,540	11,5	8,4
	4°	16,0	Estável	1,029	3,3	-0,539	11,5	8,2
	5°	16,8	Estável	1,032	3,3	-0,544	12,2	8,9
M4	1°	15,8	Estável	1,032	3,4	-0,546	12,3	8,9
	2°	16,0	Estável	1,029	3,2	-0,536	11,4	8,2
	3°	15,8	Estável	1,031	3,3	-0,544	12,0	8,7
	4°	16,4	Estável	1,032	3,3	-0,544	12,2	8,9
	5°	16,6	Estável	1,034	3,4	-0,548	12,8	9,4
M5	1°	17,2	Estável	1,031	3,1	-0,536	11,7	8,6
	2°	16,8	Estável	1,031	3,0	-0,534	11,6	8,6
	3°	16,8	Estável	1,031	3,1	-0,536	12,1	8,7
	4°	16,9	Estável	1,030	3,0	-0,536	11,4	8,4
	5°	17,2	Estável	1,032	3,2	-0,542	12,1	8,9
M6	1°	14,5	Estável	1,031	3,4	-0,538	12,1	8,7
	2°	14,3	Estável	1,030	3,0	-0,535	11,4	8,4
	3°	14,5	Estável	1,032	3,3	-0,542	12,2	8,9
	4°	14,6	Estável	1,031	3,4	-0,538	12,1	8,7
	5°	14,8	Estável	1,030	3,0	-0,536	11,4	8,4
M7	1°	14,2	Estável	1,028	3,0	-0,530	10,9	7,9
	2°	14,1	Estável	1,029	3,0	-0,532	11,1	8,1
	3°	14,3	Estável	1,030	3,1	-0,534	11,5	8,4
	4°	14,9	Estável	1,030	3,0	-0,534	11,4	8,4
	5°	14,8	Estável	1,029	3,1	-0,536	11,2	8,1
M8	1°	15,4	Estável	1,030	3,2	-0,540	11,6	8,4

Tabela 2. Valores médios obtidos na análise físico-química de oito marcas comerciais de leite UHT integral (continuação).

Marca	Lote	Acidez (°D)	Alizarol 68% (v/v)	Densidade (g/mL)	Gordura (%)	Índice Crioscópico (°H)	EST (%)	ESD (%)
	2°	15,8	Estável	1,029	3,3	-0,538	11,5	8,2
	3°	16,2	Estável	1,029	3,3	-0,537	11,5	8,2
	4°	16,1	Estável	1,031	3,1	-0,540	11,7	8,6
	5°	15,8	Estável	1,032	3,3	-0,544	12,2	8,9
M9	1°	14,0	Estável	1,028	2,9	-0,528	10,7	7,8
	2°	14,4	Estável	1,029	3,0	-0,532	11,1	8,1
	3°	14,4	Estável	1,030	3,0	-0,534	11,4	8,4
	4°	14,5	Estável	1,028	2,9	-0,530	10,7	7,8
	5°	14,6	Estável	1,030	3,1	-0,534	11,5	8,4
M10	1°	16,9	Estável	1,030	3,2	-0,542	11,6	8,4
	2°	16,9	Estável	1,031	3,3	-0,542	12,0	8,7
	3°	17,0	Estável	1,031	3,3	-0,542	12,0	8,7
	4°	17,1	Estável	1,030	3,1	-0,540	11,5	8,4
	5°	17,2	Estável	1,028	2,8	-0,530	10,6	7,8
Portaria nº 146/1996*	14-18		Estável 68%	NCL	Mínim o 3%	NCL	NCL	Mínimo 8,2%

EST: extrato seco total; ESD: extrato seco desengordurado.

*Parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite UHT integral pela Portaria nº 146/1996 (BRASIL, 1996).

NCL: parâmetro não contemplado pela legislação.

Tabela 3. Resultados da peroxidase e fosfatase alcalina e da contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis de duas marcas comerciais de leite pasteurizado integral.

Marca	Lote	Peroxidase	Fosfatase alcalina	UFC/mL
M1	1º	Positiva	Negativa	$2,6 \times 10^3$
	2º	Positiva	Negativa	$4,2 \times 10^4$
	3º	Positiva	Negativa	$2,4 \times 10^3$
	4º	Positiva	Negativa	$4,5 \times 10^4$
	5º	Positiva	Negativa	$3,4 \times 10^3$
M2	1º	Positiva	Negativa	$4,4 \times 10^4$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$1,0 \times 10^2$
	4º	Positiva	Negativa	$3,3 \times 10^4$
	5º	Positiva	Negativa	$4,8 \times 10^4$
Instrução Normativa nº62/2011*		Positiva*	Negativa*	$4,0 \times 10^4$ a $8,0 \times 10^4$ UFC/mL

* Parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite pasteurizado integral pela Instrução Normativa nº62/2011 (BRASIL, 2011).

Tabela 4. Resultados da peroxidase e fosfatase alcalina e da contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis de oito marcas comerciais de leite UHT integral.

Marca	Lote	Peroxidase	Fosfatase alcalina	UFC/mL
M3	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
M4	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
M5	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
M6	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
M7	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$3,2 \times 10^3$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$2,0 \times 10^2$
M8	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$

Tabela 4. Resultados da peroxidase e fosfatase alcalina e da contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis de oito marcas comerciais de leite UHT integral (continuação).

Marca	Lote	Peroxidase	Fosfatase alcalina	UFC/mL
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
M9	1º	Negativa	Negativa	$4,0 \times 10^2$
	2º	Negativa	Negativa	$2,4 \times 10^2$
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
M10	1º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	2º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	3º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
	4º	Negativa	Negativa	$1,6 \times 10^2$
	5º	Negativa	Negativa	$<1,0 \times 10^0$
Portaria nº 146/1996*		Negativa	Negativa	$< 1,0 \times 10^2$ UFC/mL

*Parâmetros de qualidade estabelecidos para o leite UHT integral pela Portaria nº 146/1996 (BRASIL, 1996).

CAPÍTULO VI
CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fascínio da doutoranda pela área de laticínios é resultante de experiência profissional em indústria do ramo, participação em projeto de extensão envolvendo a instalação de uma queijaria, especialização *lato sensu* na área de produção, tecnologia e higiene de alimentos de origem animal e de publicações envolvendo leites e derivados (realizadas ao longo dos anos).

Iniciado no mestrado, o estudo da composição e do potencial antibacteriano de derivados lácteos elaborados com grãos de kefir se estendeu ao longo do doutorado. Estudos inicialmente realizados *in vitro* foram realizados *in loco*, simulando a contaminação real de alimentos (em diferentes densidades/concentrações) dentro de um contexto de produção agroindustrial. A necessidade desse avanço no estudo se deu pela preocupação com a segurança dos alimentos e o número cada vez maior de casos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo os patógenos estudados.

Os resultados encontrados apontaram que o leite fermentado kefir apresentou atividade antibacteriana frente ao *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229), sendo sua intensidade relacionada a vários aspectos, como composição físico-química do meio, microrganismos envolvidos e técnicas de preparo e armazenamento do alimento. A avaliação físico-química e microbiológica do kefir confirmou que a técnica de preparo do leite fermentado empregada no experimento, resultou em um produto com características previstas no regulamento técnico de identidade e qualidade dos leites fermentados, sendo os dados apresentados no trabalho “Kefir: composição e avaliação da atividade antagonista *in loco* frente a bactérias de interesse alimentar”.

Uma das principais dificuldades encontradas ao longo do estudo foi à produção do leite fermentado, tendo em vista que as características e a qualidade dos leites empregados foram questionáveis. Testes com leite UHT de diferentes marcas foram feitos, sendo que os microrganismos presentes nos grãos de kefir não se adaptaram ao meio, não ocorrendo à fermentação nas condições de tempo e temperatura propostas. O mesmo problema foi detectado com algumas marcas de leite pasteurizado e leite em pó, sendo realizado contato com os fabricantes, que de imediato substituíram os lotes adquiridos.

Não previsto inicialmente, o estudo da qualidade de alimentos fabricados com inspeção surgiu como uma necessidade, tendo em vista os problemas encontrados na elaboração do kefir, do queijo e do soro e resultaram no trabalho “Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT”.

O queijo e o soro de kefir elaborados e estudados apresentaram-se como inovação. Pesquisas envolvendo a produção de queijo de kefir e de kefir elaborado com soro de leite já foram relatadas, mas com soro de queijo de kefir são raros os estudos. Tanto o queijo quanto o soro elaborados apresentaram atividade antibacteriana *in loco* frente aos patógenos testados, sendo 24 horas o tempo de confronto com redução significativa da carga inoculada em todas as densidades populacionais testadas. A *Escherichia coli* (ATCC 11229) foi o microrganismo mais sensível, atingindo-se atividade antibacteriana máxima após 48 horas de confronto. Comparando o queijo e o soro é possível afirmar que o soro teve maior potencial antibacteriano. O pH dos produtos não mostrou-se como um fator responsável pela inibição, apontando que substâncias oriundas do processo fermentativo ou até mesmo microrganismos probióticos oriundos dos grãos estavam presentes e atuando nos derivados lácteos em estudo. Os resultados da pesquisa com o queijo e soro de kefir foram compilados no trabalho “Atividade antibacteriana e composição centesimal de queijo e soro de kefir”.

Finalizando, ressalta-se a necessidade de mais estudos, principalmente com o queijo e o soro de kefir, explorando questões sensoriais, físico-químicas e microbiológicas não abordadas no presente trabalho. Da mesma forma são imprescindíveis pesquisas envolvendo o kefir e os derivados lácteos dele obtidos sob o olhar de profissionais de áreas distintas, como a área tecnológica e da saúde. Considerando os objetivos propostos na qualificação e apresentados na introdução da presente tese, é possível afirmar que os mesmos foram atingidos, sendo os resultados apresentados nos artigos que fazem parte da tese.

CONCLUSÕES

- As formulações de leite fermentado kefir (kefir 1 e kefir 2) apresentaram atividade antagonista significativa frente a diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e a *Escherichia coli* (ATCC 11229) após de 24 horas de exposição, não sendo observada atividade antagonista entre 24 e 72 horas de confronto.
- As formulações de kefir atenderam aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos previstos no regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados avaliados no trabalho.
- Kefir 1 pode receber a declaração de propriedade nutricional de “fonte de proteínas”, “reduzido em calorias” ou “light” e “baixo teor de sódio”. Kefir 2 de “alto conteúdo de proteínas”, “baixo teor de sódio” e “alto conteúdo de zinco”.
- As formulações de queijo (Q1 e Q2) e soro de kefir (S1 e S2) elaborados apresentaram atividade antibacteriana frente aos microrganismos alimentares testados, principalmente após 24 horas de confronto.
- A atividade antibacteriana foi maior frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229), sendo observada atividade antibacteriana máxima após 48 e 72 horas de confronto de Q1, Q2, S1 e S2 com diferentes densidades populacionais do patógeno testadas.
- Q1 e Q2 diferiram estatisticamente quanto ao teor de proteínas, lipídeos, cinzas e umidade e S1 e S2 quanto ao teor de proteínas, carboidratos, cinzas e umidade.
- Todas as marcas comerciais de leite avaliadas atenderam ao preconizado na legislação brasileira de rotulagem.
- Uma marca de leite pasteurizado integral (M2) e três marcas de leite UHT integral (M7, M9, M10) não atenderam aos parâmetros mínimos de identidade e qualidade estabelecidos pela legislação brasileira vigente em pelo menos dois dos cinco lotes avaliados, apontando falhas no processo de beneficiamento.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, M. R.; CAMPÊLO, C. S.; SILVA, J. B. A. Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 73, p. 244-251, 2014.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis and communicable diseases common to men and animals: bacteriosis and mycosis**. 3 ed. Washington: World Health Organization. Cientifical and Technical Publication, 2003, 398p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 09 jan. 2002a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 40, de 8 de fevereiro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico para ROTULAGEM DE ALIMENTOS E BEBIDAS EMBALADOS QUE CONTENHAM GLÚTÊN, constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 13 fev. 2002b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 222, de 5 de agosto de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico para Promoção Comercial de Alimentos para Lactentes e Crianças de Primeira Infância, constante do anexo desta Resolução. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 06 ago. 2002c.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 259, de 20 de setembro de 2002. Aprovar o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 23 set. 2002d.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 dez. 2003a.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 26 dez. 2003b.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 22 set. 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento Técnico Mercosul sobre Informação Nutricional Complementar (declarações de propriedades nutricionais). **Diário Oficial da República do Brasil**, Brasília, 13 nov. 2012.

ANSELMO, R. J.; VIORA, S. S.; OJEDA, P. A.; LAUSADA, L. I. Efecto antagónico del kefir sobre endosporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. **Información Tecnológica**, v. 21, p. 131-138, 2010.

ANTUNES, A. E. C.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 83-90, 2007.

BALLUS, C.A.; KLAJN, V. M.; CUNHA, M. F.; OLIVEIRA, M. L.; FIORENTINI, A. M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.28, p.85-96, 2010.

BLASCO, M. **Kefir: um yougur para rejuvenecer**. Barcelona: oceano grupo editorial, 2000, 87p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó, Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de leite UAT (UHT). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 11 mar. 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 ago. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 14 dez. 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 24 out. 2007.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 31 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasil. Portaria Nº 53 - Projeto de Instrução Normativa que estabelece os padrões de identidade e qualidade de soro de leite. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 abr. 2013.

CAMARA, F. A.; WESCHENFELDER, S. Leite UHT integral: avaliação da rotulagem nutricional e dos padrões de identidade e qualidade. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p.268-279, 2014.

CORTEZ, M. A. S.; DIAS, V. G.; MAIA, R. G.; COSTA, C. C. A. Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 65, p.18-25, 2010.

CRUZ, F. T.; SCHNEIDER, S. Qualidade dos alimentos, escalas de produção e valorização de produtos tradicionais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 22-38, 2010.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TEJADA, T. S.; LEAL, M. C. G. M.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; DIAS, C. T. Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, p 182-186, 2012.

EGITO, A.S; ROSINHA, G.M.S; LAGUNA, L.E; MICLO, L; GIRARDET, J.M; GAILLARD, J.L. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p. 932-939, 2006.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e práticas**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 602p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª Ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2013. 607p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005. 182p.

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

HÄFLIGER, M.; SPILLMAN, H.; PUHAN, Z. Kefir: ein faszinierendes Sauermilchprodukt. **Deutsche Molkerei-Zeitung Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft**, v. 13, p. 370-375, 1991.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 153, n. 5, p. 582-587, 2003.

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

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JUNIOR, J. B. P.; FERNANDES, K. G.; MÜLLER, R. C. S. Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 32, p. 2333-2335, 2009.

KHAN, H.; FLINT, S.; YU, P. Enterocins in food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, p.1-10, 2010.

LAJOLO, F. M.; MENEZES, E. W. Composição de alimentos: uma análise Retrospectiva e contextualização da questão. **Boletim SBCTA**, v. 31, p. 90-92, 1997.

LEITE, A. M. O.; LEITE, D. C. A.; DEL AGUILA, E.M.; ALVARES, T. S.; PEIXOTO, R. S.; MIGUEL, M. A. L.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p.4149-4159, 2013.

LIMA, S. C. G.; ALMEIDA, T. C. A.; GIGANTE, M. L. Efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de sólidos nas características sensoriais de iogurte tipo firme. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 08, p. 75-84, 2006.

LIU, J. A. P.; MOON, N. J. Kefir, a “new” fermented Milk product. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 83, p. 11-12, 1983.

MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O.; PIRES, E. A.; SANTOS, F. L. Mapeamento tecnológico de patentes de kefir. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, p. 86-97, 2012.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 693-702, 2011.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, M. A.; NICOLAU, A.; DRAGONE, G.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A.; SCHWAN, R. F. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8843-8850, 2010.

MAGALHÃES, M. V. F.; SANTOS, L. G. C.; PEREIRA, R. M.; KOBAYASHI, P. F. Análise físico-química e microbiológica do leite pasteurizado integral tipo C comercializado em Aracaju-SE. **Scientia Plena**, v. 11, p. 1-5, 2015.

MAREZE, J.; MARIOTO, L. R. M.; GONZAGA, N.; DANIEL, G. C.; TAMANINI, R.; BELOTI, V. Detecção de adulterações do leite pasteurizado por meio de provas oficiais. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, p. 283-290, 2015.

MIGUEL, M. G. C. P.; CARDOSO, P. G.; LAGO, L. A.; SCHWAN, R. F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 43, p. 1523-1528, 2010.

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

MOURA, J. F. P. de; GOMES, H. B. F.; JUNIOR, W. D. L.; OLIVEIRA, C. J. B. de. Qualidade do leite pasteurizado padronizado e UAT comercializados na região de Campina Grande, PB. **Agropecuária Técnica**, v. 31, p. 63-71, 2010.

NAMBOU, K.; GAO, C.; ZHOU, F.; GUO, B.; AI, L.; WU, ZJ. A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, v. 34, p. 237-246, 2014.

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

OLIVEIRA, D. F. BRAVO, C. E. C., TONIAL, I. B. Sazonalidade como fator interferente na composição físico-química e avaliação microbiológica de queijos coloniais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, p.521-523, 2012.

ORDÓNEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos de origem animal**, v. 2, Porto Alegre: Artmed, 2005, 280p.

OTA, A. Protection against infectious disease by enterohaemorrhagic *E. coli* O-157. **Medical Hypotheses**, v. 53, p. 87-88, 1998.

PERRY, K.S.P. Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos. **Química Nova**, v. 27, p. 293-300, 2004.

PINTADO, M. E.; SILVA, J. A. L.; 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.

RIBEIRO, R. O. R.; CUNHA, F. L.; CARNEIRO, C. S.; MÁRSICO, E. T. Avaliação da adequação da rotulagem de geleias reais. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 19, p. 94-97, 2012.

RIMADA, P. S.; ABRAHAM, A. G. Kefiran improves rheological properties of glucono- δ -lactone induced skim ilk gels. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 33-39, 2006.

ROBIM, M. S.; CORTEZ, M. A. S.; SILVA, A. C. O; FILHO, R. A. T.; GEMAL, N. H.; NOGUEIRA, E. B. Pesquisa de fraude no leite UAT integral comercializado no estado do rio de janeiro e comparação entre os métodos de análises físico-químicas oficiais e o método de ultrassom. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, p. 43-50, 2012.

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, 2005.

SAAD, S. M. I; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011. 669 p.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, p. 1-16, 2006.

SANTOS, J. P. V.; ARAÚJO, T. F.; FERREIRA, C. L. L. F. II; GOULART, S. M. Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 56, p. 823-827, 2013.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal**, v. 110, p. 283-295, 2008.

SCHAUFF, M.; WERNER, G. Milchwirtschaftliche Rechtspraxis, Urteil: Anforderungen an Kefir. **Deutsche Milchwirtschaft**, Hildesheim. Vol 47. p. 67-76, 1985.

SILVA, A. M.; DUTRA, M. B. L. Avaliação de informações contidas em rótulos de café torrado e moído. **Alimentos e Nutrição**, v. 22, p. 449-454, 2011.

SILVA, E. B.; NASCIMENTO, K. O. Avaliação da adequação da rotulagem de iogurtes. **Ceres: Nutrição e Saúde**, v. 2, p. 9-14, 2007.

SILVA JÚNIOR, E. A. da. **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 2008. 625p.

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

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

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Efeito do teor de soro, açúcar e de frutooligossacarídeos sobre a população de bactérias lácticas probióticas em bebidas fermentadas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 393-400, 2005.

TONDO, E. C.; BARTZ, S.. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2011. 263 p.

TRONCO, V. M. **Manual para inspeção da qualidade do leite**. 4. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010. 210p.

ULUSOY, B. H.; ÇOLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ERKAN, M. E. An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. **Türk Mikrobiyol Cem Derg**, v. 37, p. 103-107, 2007.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 49-57, 2013.

WESCHENFELDER, S.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, L. M. **Saberes e fazeres sobre o kefir como alimento lácteo probiótico**. 1 ed. Porto Alegre: Evangraf, 2010. 112 p.

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

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Revista Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 64, p. 48-55, 2009.

WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T., CILLIERS, A., 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, 2004.