



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Centro de Excelência em Turismo
Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de especialização em Tecnologia de Alimentos

TEOR DE LACTOSE EM LEITES FERMENTADOS POR GRÃOS DE KEFIR

Flávio Marques Terra

Orientador: Prof^o MSc. Luiz Antônio Borgo

Brasília – 2007



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Centro de Excelência em Turismo
Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de especialização em Tecnologia de Alimentos

TEOR DE LACTOSE EM LEITES FERMENTADOS POR GRÃOS DE KEFIR

Flávio Marques Terra

Orientador: Prof^o MSc. Luiz Antônio Borgo

Monografia apresentada ao Centro de Excelência em Turismo – CET, da Universidade de Brasília – UnB, como requisito parcial à obtenção do grau de especialista em Tecnologia de Alimentos

Brasília – 2007

Terra, Flávio Marques

Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir
/ Flávio marques Terra, Brasília 2007.
ix, 48, il.

Monografia (Tecnologia de alimentos) – Universidade de
Brasília, Centro de Excelência em Turismo, 2007.
Orientador: Profº MSc. Luiz Antônio Borgo

1. Leite fermentado. 2. Intolerância à lactose. 3. Kefir.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Centro de Excelência em Turismo
Pós-graduação *Lato Sensu*
Curso de especialização em Tecnologia de Alimentos

Flávio Marques Terra

Aprovado por:

Prof^o Orientador MSc.Luiz Antônio Borgo

Prof^a. Dra. Ângela Patrícia Santanna:

Prof^a.MSc Karla Lisboa Ramos.

Brasília, 2007.

DEDICATÓRIA

Aos meus filhos Marcelo (*in memoriam*),
João Pedro e Maria Paula.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Profº Luiz Antônio Borgo por ter me aceito como orientando o que tornou possível a realização deste trabalho. À Profª Rita Akutsu pela revisão do projeto inicial e pelas dicas de formatação. Ao Márcio Mendonça e ao Fernando Portilho do Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da UnB, pela ajuda e orientação na manipulação dos equipamentos do laboratório e pela “força” no butirômetro sem o que não teria sido possível a realização deste trabalho. Agradeço à professora Eliandra Bianchini pela disposição em ajudar na análise estatística dos dados. E por fim, mas não menos importante, agradeço à minha esposa Flávia por ter me incentivado a realizar o curso de especialização em Tecnologia de Alimentos.

EPÍGRAFE

Todo vuelve al silencio coronado de plumas
Em donde um rey remoto devora enredaderas.
(Pablo Neruda – in Canto general, 1950)

RESUMO

A intolerância à lactose é fato comum que afeta uma grande parte da população mundial, sendo o consumo de leites fermentados com baixo teor de lactose normalmente recomendado para pessoas com essa intolerância; entre estes leites encontra-se o kefir. O kefir é um leite fermentado produzido pela ação de bactérias ácido-lácticas, bactérias ácido-acéticas e leveduras contidas nos seus grãos, onde vivem em simbiose envolvidas por uma matriz de polissacarídeo (kefiran); de origem caucasiana, o kefir tem propriedades promotoras de saúde. Nesta pesquisa procurou-se verificar as características físico-químicas, com ênfase no teor de lactose, de filtrados de kefir por períodos de fermentação variados usando-se dois tipos de leite – integral e semidesnatado. Constatou-se que os filtrados de kefir de leite integral e leite semidesnatado apresentaram um comportamento semelhante: queda do teor de lactose, aumento da concentração de ácido láctico e diminuição do pH, pequena redução do teor de gordura (4%) e sem alterações no teor de proteínas. O teor de lactose do kefir fermentado por 36 horas atinge valores abaixo do valor limite que pode ser consumido por indivíduos intolerantes à lactose sem causar desconforto característico.

Palavras-chave: kefir; lactose; intolerância à lactose; leite fermentado; característica físico-química.

ABSTRACT

The lactose intolerance is a common fact that affects a great part of the world population. The consumption of fermented milk with low lactose concentration normally is recommended for people with lactose intolerance, and between these milk meets kefir. Kefir is a fermented milk produced by the action of lactic acid bacteria, yeasts and acetic acid bacteria, trapped in a complex matrix of polysaccharides; Caucasian kefir as original and has promotional properties of health. This research studied the physical and chemical characteristics, with emphasis in the lactose concentration, of filtered of kefir for varied periods of fermentation using two types of milk - integral and semi skimmed. It was evidenced that the filtered of kefir of integral milk and semi skimmed milk had presented a similar behavior: with fall of the concentration of lactose, increase of the concentration of lactic acid and reduction of pH, with a small reduction of the fat concentration (4%) and without alterations in the protein concentration. The filtered of kefir after 36 h fermentation presents lactose concentration that can be ingested by individuals lactose intolerance without symptoms characteristic.

Keywords: kefir; lactose; lactose intolerance; fermented milk; physical-chemical characteristics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Grãos de kefir.....	2
Figura 2: Vidro utilizado para a fermentação.....	14
Figura 3: Vidros com grãos de kefir antes da adição do leite.....	15
Figura 4: Leites em processo de fermentação com termômetro de máxima e mínima ao fundo	15
Figura 5: Variação do teor de lactose no filtrado de kefir integral durante o período de fermentação.....	18
Figura 6: Variação do teor de lactose no filtrado de kefir semidesnatado durante o período de fermentação.....	19
Figura 7: Variação do teor de ácido láctico no filtrado de kefir integral durante o período de fermentação.....	20
Figura 8: Variação do teor de ácido láctico no filtrado de kefir semidesnatado durante o período de fermentação.....	20
Figura 9: Variação do pH no filtrado de kefir integral durante o período de fermentação.....	21
Figura 10: Variação do pH no filtrado de kefir semidesnatado durante o período de fermentação.....	21
Figura 11: Variação do teor de proteína no kefir integral durante o período de fermentação..	22
Figura 12: Variação do teor de proteína no kefir semidesnatado durante o período de fermentação.....	22
Figura 13: Variação do teor de gordura do kefir integral durante o período de fermentação...	23
Figura 14: Variação do teor de gordura do kefir semidesnatado durante o período de fermentação.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios da composição físico química do kefir integral, leite integral, iogurte natural e leite com baixo teor de lactose.....	17
Tabela 2: Valores médios da composição físico química do kefir semidesnatado, leite semidesnatado e leite com baixo teor de lactose.....	18
Tabela 3: Valores médios de lactose, ácido lácteo e pH e diferença média para kefir integral e kefir semidesnatado.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
SAS	Statistical Analysis System
UHT	Ultra High Temperature
UnB	Universidade de Brasília
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

<u>RESUMO</u>	<u>iv</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>v</u>
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	<u>vi</u>
<u>LISTA DE TABELAS</u>	<u>vii</u>
<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	<u>viii</u>
<u>1 INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>1.1 IDENTIFICAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PROBLEMA</u>	<u>2</u>
<u>1.2 OBJETIVOS</u>	<u>3</u>
<u>1.2.1 OBJETIVO GERAL</u>	<u>3</u>
<u>1.2.2 Objetivos Específicos</u>	<u>3</u>
<u>2 REVISÃO DE LITERATURA</u>	<u>5</u>
<u>2.1 INTOLERÂNCIA À LACTOSE</u>	<u>5</u>
<u>2.1.1 Lactose</u>	<u>5</u>
<u>2.1.2 Diagnóstico da Intolerância à Lactose</u>	<u>5</u>
<u>2.1.3 Prevalência da Intolerância à Lactose em Adultos</u>	<u>6</u>
<u>2.1.4 Sintomas e Cuidados Nutricionais</u>	<u>7</u>
<u>2.2 KEFIR</u>	<u>8</u>
<u>2.2.1 Origens do Kefir</u>	<u>8</u>
<u>2.2.2 Produção de Kefir</u>	<u>9</u>
<u>2.2.3 Grãos de Kefir</u>	<u>9</u>
<u>2.2.4 Composição Microbiológica dos Grãos de Kefir</u>	<u>10</u>
<u>2.2.5 Composição Química do Kefir</u>	<u>11</u>
<u>2.2.6 Propriedades Mediciniais</u>	<u>11</u>
<u>3 METODOLOGIA</u>	<u>13</u>
<u>3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA</u>	<u>13</u>
<u>3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA</u>	<u>13</u>
<u>3.3 COLETA DE DADOS</u>	<u>16</u>
<u>3.4 ANÁLISE DOS DADOS</u>	<u>17</u>
<u>3.5 RESULTADOS</u>	<u>17</u>
<u>4 CONCLUSÃO</u>	<u>25</u>
<u>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>27</u>
<u>6 ANEXO A: Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz utilizados neste trabalho</u>	<u>31</u>

1 INTRODUÇÃO

O leite humano é o alimento ideal para os lactentes, pois fornece todos os nutrientes necessários para o seu crescimento e desenvolvimento. No entanto, a continuação do uso de leite de outros mamíferos na alimentação de crianças mais velhas e adultos pode causar perturbações digestivas, cuja intensidade pode variar de simples mal-estar até o impedimento de atividades normais (SEVÁ-PEREIRA, 1996).

Mamíferos adultos, e a maioria dos grupos humanos após o desmame, mantêm apenas uma fração da atividade intestinal da lactase (enzima responsável pela digestão da lactose) encontrada nos recém-nascidos (SHILS *et al.*, 2003). A consequência desse fato é a intolerância à lactose, um fato comum que afeta pessoas de todos os grupos etários (MAHAN; STUMP, 2002), atingindo 75 % da população mundial (HERTZLER *et al.*, 2003).

No Brasil, há poucos estudos sobre a prevalência da intolerância à lactose, sendo a maioria deles realizados por autores de São Paulo (SILVEIRA; PRETTO, 2002).

A ingestão de lactose por indivíduos intolerantes produz desconfortos gástricos tais como: dores abdominais, cólicas, náuseas, flatulência e diarreias. Esses sintomas são aliviados com a redução da ingestão de alimentos derivados do leite (MAHAN; STUMP, 2002).

A maioria dos indivíduos intolerantes pode consumir um pouco de lactose, até 6 g, sem manifestar sintomas característicos (HERTZLER *et al.*, 1996). Para esse grupo o consumo de derivados lácteos com baixo teor de lactose, como queijos duros, leites industrializados com baixo teor de lactose e leites fermentados (iogurte) é bem tolerado (MAHAN; STUMP, 2002).

Outro tipo de leite fermentado bastante recomendado para pessoas com intolerância à lactose é o kefir (HERTZLER *et al.*, 2003). O kefir originou-se há séculos nas montanhas do Cáucaso, na Rússia (WIEST *et al.*, 1999), e a ele são atribuídas diversas propriedades promotoras da saúde e de bem estar (HERTZLER *et al.*, 2003).

Tradicionalmente, o kefir é preparado usando-se leite de cabra, ovelha ou vaca. O método tradicional consiste em inocular o leite pasteurizado com grãos de kefir (fig. 1) em temperatura ambiente e deixar a mistura incubando por 24 h. Após esse tempo, cõa-se a mistura retirando-se os grãos para nova fermentação (HERTZLER *et al.*, 2003). Os grãos de kefir formam uma estrutura complexa, gelatinosa composta por bactérias e leveduras em uma associação simbiótica envolvidos por uma matriz de polissacarídeo (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005).



Figura 1: Grãos de kefir

1.1 IDENTIFICAÇÃO E JUSTIFICATIVA DO PROBLEMA

De Vrese *et al.* (1992) associam a boa aceitação do kefir por indivíduos intolerantes à lactose à presença de β -galactosidase microbiana no filtrado de kefir, que facilitaria a digestão da lactose no trato intestinal. Sites de divulgação do kefir na Internet (ANFITEATRO, 2006; KEFIR BRASIL, 2006) afirmam que, para pessoas com intolerância à lactose, o kefir deve ser deixado fermentando por 48 horas para que haja uma diminuição do teor de lactose.

Durante a pesquisa aos bancos de dados eletrônicos, via portal de periódicos da CAPES, foram encontrados dois textos contendo tabelas com o teor de lactose do kefir (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2003) sem referência à metodologia usada para obtenção dos dados, e um artigo (KUO; LIN, 1999) com o teor de lactose medido quando a amostra de leite fermentado atingia o valor de pH de 4,7.

Não há um consenso se é a presença de β -galactosidase bacteriana no kefir ou a diminuição do teor de lactose após um período de tempo de fermentação que confere ao kefir a propriedade de não causar sintomas relacionados à intolerância à lactose.

Portanto, são necessários mais estudos que possam dirimir se é devido à presença de β -galactosidase ou ao baixo teor de lactose do kefir ou ainda a combinação dos dois fatores que conferem ao kefir sua boa aceitação por indivíduos intolerantes à lactose.

O presente trabalho pretende analisar o teor de lactose do kefir fermentado por diferentes períodos de tempo e comparar os valores obtidos com os teores de lactose de iogurtes naturais integrais e desnatados industrializados e leites industriais de baixo teor de lactose. O objetivo principal e os objetivos secundários estão listados a seguir.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é avaliar o teor de lactose em leites fermentados com grãos de kefir por períodos de tempos variados.

1.2.2 Objetivos Específicos

Fazer uma breve revisão de literatura sobre intolerância à lactose e sobre o kefir.

Comparar os teores de lactose do kefir fermentado por períodos de tempo variados.

Determinar o teor de glicídios redutores em lactose de iogurtes industrializados natural integral e desnatado e de leites industrializados de baixo teor de lactose.

Comparar os teores de lactose do kefir fermentado por períodos de tempo variados com o teor de iogurtes naturais integrais e desnatados e de leite com baixo teor de lactose.

Determinar a acidez em ácido láctico, o pH, o teor de gordura e o teor de proteínas do kefir fermentado por períodos de tempos variados.

Comparar os valores de acidez em ácido láctico, de pH, do teor de gordura e do teor de proteínas do kefir fermentado por períodos variados de tempo.

Determinar a acidez em ácido láctico, o pH, o teor de gordura e o teor de proteínas de iogurtes naturais integrais e desnatados industrializados e de leites industrializados de baixo teor de lactose.

Comparar os valores de acidez em ácido láctico, de pH, do teor de gordura e do teor de proteínas do kefir fermentado por períodos variados de tempo com os valores obtidos nas análises de iogurtes naturais industriais integrais e desnatados e de leites industriais com baixo teor de lactose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTOLERÂNCIA À LACTOSE

2.1.1 Lactose

A lactose é um dissacarídeo redutor composto por glicose e galactose (BOBBIO; BOBBIO, 2003), sintetizado exclusivamente por glândulas mamárias da maioria dos animais mamíferos; leite de morsas, focas, leões marinhos não contêm lactose (MAHAN; STUMP, 2002). Sua concentração no leite varia conforme a espécie: cerca 7,5% no leite humano e 5% no leite de vaca (MAHAN; STUMP, 2002; SEVÁ-PEREIRA, 1981). A fervura e a pasteurização não alteram o conteúdo de lactose do leite (SEVÁ-PEREIRA, 1981).

A lactose é hidrolisada pela lactase na célula intestinal (MAHAN; STUMP, 2002) para que os seus componentes possam ser absorvidos por transporte ativo para dentro dessas células (DEVLIN *et al.*, 2000).

2.1.2 Diagnóstico da Intolerância à Lactose

Os indivíduos que, após ingerirem lactose, apresentam perturbações gastrointestinais têm, por definição, intolerância à lactose (SEVÁ-PEREIRA, 1981).

A hipolactasia, diminuição da lactase, do adulto é o tipo mais comum de deficiência de lactase. A intolerância à lactose também pode ser secundária a infecções do intestino delgado ou pela destruição de células da mucosa por outras causas. Nas crianças ela é normalmente secundária (MAHAN; STUMP, 2002).

A intolerância à lactose é tipicamente diagnosticada pelo histórico de sintomas gastrointestinais que ocorrem após a ingestão de leite e derivados, por testes do hidrogênio no ar expirado e de tolerância à lactose (MAHAN;

STUMP, 2002; SHILS *et al.*, 2003). O teste do hidrogênio no ar expirado é a técnica mais freqüentemente utilizada em clínica e pesquisa, por ser método não invasivo e preciso para a avaliação da absorção de carboidratos e caracterização de sobrecrescimento bacteriano no intestino delgado (REIS *et al.*, 1999).

Outros métodos utilizados para o diagnóstico da intolerância à lactose são: dosagens enzimáticas na mucosa intestinal, pesquisa de substâncias redutoras nas fezes, glicose e pH fecal, curvas glicêmica e galactosêmica (SEVÁ-PEREIRA, 1981).

2.1.3 Prevalência da Intolerância à Lactose em Adultos.

A intolerância à lactose foi descrita pela primeira vez em 1963 e considerada como uma ocorrência rara surgindo, ocasionalmente, na população branca. Estudos posteriores, em pessoas com ampla variedade étnica, demonstraram que o desaparecimento da enzima lactase após o desmame era condição predominante na maioria da população mundial, o que levou à proposição de que a intolerância à lactose é o estado normal e a tolerância à lactose é anormal (MAHAN; STUMP, 2002).

A população mundial está dividida em três grupos, quanto à prevalência de intolerância à lactose do adulto: grupo de alta prevalência (60% a 100%), que corresponde aos mal absorvedores; grupo de baixa prevalência (0% a 30%), que corresponde aos absorvedores; e grupo de prevalência intermediária (30% a 60%) (SEVÁ-PEREIRA, 1981).

Os povos com alta prevalência de intolerância à lactose do adulto são os que têm tradições agrícola e caçadora e que nunca beberam leite, ou que passaram a ingeri-lo há poucos milhares de anos. São os esquimós, índios das Américas, a maioria dos africanos, povos do Oriente Médio e da Ásia e seus descendentes em outros lugares. Nesse grupo também estão incluídos os judeus e os árabes que ingerem leite desde a Antigüidade, mas em forma de produtos lácteos fermentados, e, portanto, pobres em lactose. Os que têm baixa prevalência da afecção são os que têm tradição pastoril e têm consumido

leite e produtos ricos em lactose por longo período histórico, e que viveram esse tempo sob pressões dietéticas, e também seus descendentes. São alguns africanos de origem hamita, os europeus do Norte e Centro e alguns indianos e árabes. Os grupos com prevalência intermediária são grupos mestiços dos anteriores: africanos mestiços de bantos e hamitas, mestiços de europeus com orientais e com índios (SEVÁ-PEREIRA, 1981).

Na população brasileira, alguns estudos mostram incidência de 46% a 67%, com grandes variações quando se considera a etnia (REIS *et al.*, 1999).

2.1.4 Sintomas e Cuidados Nutricionais

A lactose que não é hidrolisada em glicose e galactose permanece no intestino e atua osmoticamente atraindo água para a luz intestinal. As bactérias colônicas fermentam a lactose não digerida, gerando ácidos graxos de cadeia curta, dióxido de carbono e gás hidrogênio (MAHAN; STUMP, 2002).

A ação osmótica pode provocar diarréias e a ação bacteriana pode provocar desconforto, distensão e dores abdominais, além de náuseas e flatulência. A combinação desses sintomas pode levar ao desequilíbrio eletrolítico, desidratação, letargia, irritabilidade e acidose metabólica (SEVÁ-PEREIRA, 1981).

Os sintomas da intolerância à lactose são aliviados com um consumo reduzido de alimentos que contêm a lactose (HERTZLER *et al.*, 1996).

Como consequência da diminuição da ingestão de derivados lácteos, a alimentação passa a ser deficiente em cálcio (BUCHOWSKI *et al.*, 2002) o que pode acarretar, por sua vez, deficiências no crescimento ósseo (BANNAN *et al.* 1996) e osteoporose (HONKANEN *et al.*, 1996).

A maioria dos indivíduos intolerantes pode consumir um pouco de lactose sem manifestar sintomas característicos (MAHAN; STUMP, 2002), como queijos duros e leites fermentados, como o iogurte (LABAYEN *et al.* 2001) e o kefir (HERTZLER *et al.*, 2003). Leites com baixo teor de lactose também são bem tolerados (SEVÁ-PEREIRA, 1995).

Hertzler *et al.* (1996) sugerem que alimentos com no máximo 6 gramas de lactose por porção são bem tolerados por indivíduos intolerantes.

A boa aceitação, por indivíduos intolerantes à lactose, dos leites fermentados é creditada a três fatores: teor de lactose diminuído nos leites fermentados (ANFITEATRO, 2006), trânsito intestinal mais lento, possibilitando uma melhor digestão da lactose (LABAYEN *et al.* 2001), e a presença de β -galactosidase microbiana que conseguiria chegar intacta ao intestino facilitando a digestão da lactase (DE VRESE *et al.*, 1992; HERTZLER *et al.*, 2003).

2.2 KEFIR

2.2.1 Origens do Kefir

O kefir é um leite fermentado viscoso, ligeiramente carbonado, produzido pela ação de bactérias e leveduras contidas nos seus grãos; tem origem nas montanhas do Cáucaso, na Rússia, e faz parte da cultura alimentar dos povos que habitam aquela região e que atribuem várias propriedades promotoras de saúde ao seu consumo. É conhecido sob uma variedade dos nomes: kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi (FRANWORTH, 2005). A sua difusão internacional a partir do final do século XIX pela Europa e para o Brasil está ligada aos movimentos migratórios de povos caucasianos (WIEST *et al.*, 1999).

A presença de leveduras e bactérias ácido-lácticas nos grãos de kefir produz uma dupla fermentação simultânea e não excludente: alcoólica e ácido-láctica, que o distinguem dos demais leites fermentados (WIEST *et al.*, 1999). Essa dupla fermentação resulta na presença de gás carbônico, álcool e moléculas aromáticas que dão ao kefir suas características organolépticas únicas (HERTZLER *et al.*, 2003).

Da mesma maneira que a FAO/WHO (2003), os países do MERCOSUL (BRASIL, 2005a) definem o kefir baseado na composição microbiana de seus grãos usados como iniciadores da fermentação do leite.

2.2.2 Produção de Kefir

Tradicional, o kefir é produzido adicionando-se os grãos do kefir (2% a 10% do peso do leite), à temperatura ambiente (20 °C a 25 °C), a uma quantidade de leite previamente pasteurizado. A fermentação do leite dura aproximadamente 24 horas; após esse período, usando coadores, retiram-se os grãos de kefir que serão utilizados em nova fermentação e o filtrado obtido é usado como bebida (HERTZLER *et al.*, 2003; FARWORTH, 2005).

O processo industrial pode ocorrer de duas maneiras. A primeira, semelhante ao método tradicional, utiliza os grãos de kefir para a fermentação do leite, mas o tempo de fermentação é menor para se evitar a produção de gás carbônico, que pode causar estufamento da embalagem e recusa por parte do consumidor (WIEST *et al.*, 1999). A segunda utiliza culturas de kefir previamente selecionadas compostas de microrganismos de interesse industrial (BESHKOVA *et al.*, 2002). Misturas liofilizadas dessas culturas estão disponíveis comercialmente. O produto final obtido com grãos de kefir tem uma variedade maior de microrganismos que o kefir obtido de uma mistura de um número pequeno de culturas puras (FARNWORTH, 2005).

No Brasil, a Biologicus, em Recife - PE, produz kefir comercialmente usando grãos de kefir trazidos da Espanha, com tempo de fermentação curto e embalagens controladoras de gás (FONSECA, 2006).

2.2.3 Grãos de Kefir

O grão de kefir é uma estrutura complexa formada por bactérias ácido-láticas e leveduras em uma associação simbiótica envolvidos por uma matriz de polissacarídeo (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005). O grão de kefir tem cor branco-amarelada, com aparência gelatinosa, forma

irregular, com uma textura macia, mas firme (FARNWORTH, 2005), com forma semelhante a pequenos ramos de couve-flor ou pequenas peças de coral, medindo entre 3mm a 20 mm de diâmetro (OTLES; CAGINDI, 2003).

A matriz de polissacarídeo é produzida pelas bactérias ácido-láticas e tem função protetora, conferindo ao grão de kefir estabilidade estrutural e características organolépticas. O kefiran é o polissacarídeo encontrado em maior quantidade nos grãos de kefir, composto por quantidades iguais de D-glicose e D-galactose.

Após cerca de 24 horas de fermentação os grãos de kefir podem apresentar um ganho de massa de aproximadamente 25% (FARNWORTH, 2005).

Esse ganho de massa possibilita sua propagação entre os produtores caseiros de kefir. Essa propagação é tradicionalmente realizada pela doação dos grãos excedentes a pessoas interessadas em cultivar o kefir. Essa forma simples de distribuição é responsável pela utilização do kefir em todo o mundo (ANFITEATRO, 2006).

2.2.4 Composição Microbiológica dos Grãos de Kefir

O grão de kefir tem uma composição variável e complexa de microrganismos que inclui espécies de leveduras, bactérias ácido-láticas e aceto-bactérias. Os lactobacilos representam a maior parcela dos microrganismos presentes nos grãos de kefir (65%-80%), com os lactococos e leveduras completando a parcela restante (WITTHUHN *et al.*, 2005).

A composição da população microbiana pode diferir se os grãos de kefir tiverem origens diferentes ou mesmo se forem cultivados por diferentes métodos e substratos. O relacionamento simbiótico existente entre os microrganismos presentes nos grãos de kefir indica a existência de espécies específicas que ocorrem sempre nos grãos de kefir. Entre as bactérias ácido-láticas isoladas de kefir encontram-se: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parakefiri*,

Lactococcus lactis e *Leuconostoc mesenteroides* Entre as leveduras isoladas de grãos de kefir incluem-se: *Kluyveromyces marxianus*, *Torula kefir*, *Saccharomyces exiguus* e *Candida lambica*. Também foram isolados em grãos de kefir *Acetobacter aceti*, *A. rasens* e *Geotrichum candidum* (WITTHUHN *et al.*, 2005).

2.2.5 Composição Química do Kefir

A composição do kefir depende diretamente do tipo de leite usado na fermentação. Durante a fermentação ocorrem mudanças na composição dos nutrientes e de outros ingredientes do leite. O ácido láctico, encontrado em concentrações elevadas após a fermentação, é derivado de aproximadamente 25% da lactose original presente no leite. Os aminoácidos valina, leucina, lisina e serina, são formados durante a fermentação; a quantidade de alanina e de ácido aspártico aumenta em relação ao seu valor inicial. Em alguns casos há o aparecimento de ácido acético; também são encontradas quantidades apreciáveis de piridoxina, de vitamina B12, de ácido fólico e de biotina, sintetizados durante a fermentação do kefir. Em alguns casos os teores de tiamina e riboflavina aparecem diminuídos (FARNWORTH, 2005).

Durante a consulta às bases de dados eletrônicas, realizadas via portal de periódicos do CAPES, encontrou-se somente um artigo (OTLES; CAGINDI, 2003) com uma tabela com a composição química e nutricional do kefir. A referida tabela foi construída a partir de dados retirados de textos produzidos por outros autores, sem referência ao tipo de kefir utilizado na obtenção destes dados: se kefir industrial ou tradicional, o tempo de fermentação, o tipo de leite utilizado e a metodologia usada para obtenção dos dados.

2.2.6 Propriedades Medicinais.

Experiências com o kefir têm demonstrado que o seu consumo é benéfico à saúde humana, atuando na estimulação do sistema imune (VINDEROLA *et al.*, 2005), inibindo o crescimento de tumores (FARNWORTH,

2005), influenciando a atividade microbiana intestinal (MARQUINA *et al.*, 2002), exercendo atividade antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2005) e diminuindo problemas gastrintestinais (ZUBILLAGA *et al.*, 2001).

Durante o processo fermentativo os grãos de kefir produzem uma variedade de ingredientes que lhe dão o sabor e a textura originais, além de outros ingredientes com ações bioativas (FARNWORTH, 2005; WITTHUHN *et al.*, 2005).

A composição microbiológica do kefir indica que ele é um alimento pró-biótico complexo com um grande número de bactérias e leveduras vivendo em simbiose e com vários desses microrganismos identificados como probióticos (FARNWORTH, 2005).

Em função de suas propriedades probióticas o kefir é um alimento que deve ser indicado não somente para os indivíduos intolerantes à lactose, como também para todos os demais indivíduos que não possuem tal diagnóstico.

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O presente trabalho é um estudo exploratório de base experimental que tem como objetivo principal avaliar o teor de lactose em leites fermentados com grãos de kefir por períodos de tempos variados.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA

No intuito de garantir o padrão bioquímico em todas as amostras, utilizou-se grãos de kefir de uma única origem (KUO; LIN, 2006) e para se garantir o padrão físico-químico dos leites utilizados durante o processo de fermentação, utilizou-se leite UHT integral de um mesmo fabricante, de um único lote, escolhido ao acaso. O mesmo procedimento foi realizado para o leite semidesnatado.

Para simular a fermentação tradicional (OTLES; CAGINDI, 2003; FARNWORTH, 2005) as amostras foram fermentadas em temperatura ambiente, com a variação de temperatura monitorada por termômetro de máxima e mínima da marca Inconterm®, com escala de -38 °C a +50 °C com limite de erro de $\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Todas as amostras foram colocadas para fermentar simultaneamente em um delineamento inteiramente casualizado – DIC, com 5 repetições (GOMES, 2000) e foram realizadas coletas a cada 12 horas, até completar 72 horas, num total de 6 coletas: 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 60 h, e 72 h. O experimento, portanto é constituído de 12 populações distintas conforme o tempo de fermentação (12h, 24h, 36h, 48h, 60h e 72h) e o tipo de leite utilizado durante a fermentação foi o integral ou o semidesnatado.

Antes da inoculação do leite pelos grãos de kefir, foram escolhidas amostras, ao acaso dos leites, para a realização das análises físico-químicas.

Ainda no intuito de simular a fermentação caseira tradicional, usou-se, para fermentar o leite, a mesma proporção de grãos de kefir indicada nos sites de divulgação do kefir – 4 colheres de sopa de grãos de kefir cada litro de leite (ANFITEATRO; 2006 e KEFIR BRASIL, 2006).

Como não há padronização dos utensílios de cozinha no Brasil e a quantidade de grãos selecionados em cada pegada pode variar (BOTELHO *et al.*, 2006) obteve-se a média de 5 aferições da massa de grãos de kefir correspondente a 4 colheres de sopa, obtendo-se o valor médio de 80g de grãos de kefir, o que equivale a 8% m/v.

Para o processo de fermentação, foram usados um total de 60 vidros, 30 para cada tipo de leite, com tampa de metal com anel de borracha interno e com capacidade de 600 ml (figura 2).



Foto do autor

Figura 2: Vidro utilizado para a fermentação

No fundo de cada um dos frascos foram depositados 16 gramas de grãos de kefir (figura 3) e em seguida adicionados 200 ml de leite. Após esta operação, os frascos foram tampados e colocados sobre um balcão à temperatura ambiente (figura 4). Durante o processo de fermentação a temperatura ambiente variou entre a mínima de 24°C e a máxima de 29°C.

Para evitar a ocorrência de fermentação secundária do filtrado de kefir durante o período de espera para que se procedesse todas as análises, os filtrados de kefir foram armazenados sob refrigeração a 4°C.



Foto do autor

Figura 3: Vidros com grãos de kefir antes da adição do leite.



Foto do autor

Figura 4: Leites em processo de fermentação com termômetro de máxima e mínima ao fundo

Em todas as amostras foram realizadas as seguintes análises: 1) determinação de glicídios redutores em lactose; 2) determinação de açúcares redutores totais; 3) determinação de gordura; 4) determinação de protídios; 5) determinação da acidez em ácido láctico e 6) determinação do pH.

Para comparação dos resultados obtidos das propriedades físico-químicas dos leites fermentados por grãos de kefir, mediram-se os mesmos parâmetros físico-químicos do iogurte integral natural e de uma marca de leite com teor reduzido de lactose, com 5 repetições e com amostras de um mesmo lote.

Todas as análises seguiram os procedimentos técnicos descritos em: “Método físico-químicos para análise de alimentos” do Instituto Adolfo Lutz

(BRASIL, 2005b). Os procedimentos técnicos utilizados encontram-se no anexo 1.

Para a determinação de glicídios redutores em lactose do leite integral, do leite semidesnatado e dos leites com teor reduzido de lactose foi utilizado o método 432/IV (BRASIL, 2005b), enquanto para o kefir e o iogurte natural integral e desnatado o método 499/IV (BRASIL, 2005b).

Para a determinação de gorduras do leite integral, do leite semidesnatado e do leite com teor reduzido de lactose foi utilizado o método 433/IV (BRASIL, 2005b), enquanto para o kefir e o iogurte natural integral e desnatado o método 497/IV (BRASIL, 2005b).

Para a determinação de protídios do leite integral, do leite semidesnatado e do leite com teor reduzido de lactose foi utilizado o método 435/IV (BRASIL, 2005b), enquanto para o kefir e o iogurte natural integral e desnatado o método 498/IV (BRASIL, 2005b).

Para a determinação da acidez em ácido láctico do leite integral, do leite semidesnatado e do leite com teor reduzido de lactose foi utilizado o método 426/IV (BRASIL, 2005b), enquanto para o kefir e o iogurte natural integral e desnatado o método 493/IV (BRASIL, 2005b).

O pH do kefir, do iogurte natural integral e desnatado, do leite integral, do leite semidesnatado e dos leites com baixo teor de lactose foi determinado pelo método 017/IV (BRASIL, 2005b).

3.3 COLETA DE DADOS

A coleta de dados foi obtida a partir dos resultados das análises físico-químicas realizadas no Laboratório de Análise de Alimentos da faculdade de Agronomia da UnB durante o período de 27 de novembro de 2006 a 15 de dezembro de 2006.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Por ser o método mais indicado para a comparação de diversas populações (VIEIRA, 1980) para a crítica dos dados foi aplicada análise de variância – ANOVA pela comparação da média dos tratamentos, com utilização do teste de Tukey, estabelecendo a significância estatística de 5% de probabilidade e realização do cálculo de coeficientes de correlação de Pearson, com a utilização do programa Statistical Analysis System Learning Edition 2.0 – SAS 2.0.

3.5 RESULTADOS

Os valores médios encontrados para a composição físico-química do leite integral fermentado por grãos de kefir (kefir integral), do leite integral, do iogurte natural integral, do leite com baixo teor de lactose encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Valores médios da composição físico química do kefir integral, leite integral, iogurte natural e leite com baixo teor de lactose.

Parâmetros	Tratamentos								
	LI	IN	KI 12h	KI 24h	KI 36h	KI 48h	KI 60h	KI 72h	LBTL
Lactose (%)	4,24 ^a	3,20 ^b	3,02 ^c	2,55 ^d	2,21 ^e	1,50 ^f	1,22 ^g	1,10 ^h	0,5 ⁱ
Ác. Láctico (%)	0,12 ^h	1,04 ^g	0,72 ^f	1,14 ^e	1,41 ^d	1,69 ^c	1,93 ^b	2,11 ^a	0,12 ^h
pH	6,7 ^a	4,3 ^c	4,5 ^b	3,9 ^d	3,7 ^e	3,5 ^f	3,4 ^g	3,3 ^h	6,7 ^a
Gordura (%)	3,7 ^a	3,0 ^c	3,2 ^b	3,2 ^b	3,2 ^b	3,2 ^b	3,3 ^b	3,2 ^b	1,0 ^d
Proteína (%)	3,0 ^b	4,0 ^a	2,9 ^b	3,2 ^b					

LI = leite integral; IN = iogurte natural integral; KI 12h, KI 24h, KI 36h, KI 48h, KI 60h, KI 72h = leite integral fermentado por 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas; LBTL = leite com baixo teor de lactose

Médias de tratamento seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%

A tabela 2 mostra os valores encontrados para a composição físico química do leite semidesnatado fermentado por grãos de kefir (kefir desnatado), leite semidesnatado e leite com baixo teor de lactose.

Tabela 2: Valores médios da composição físico química do kefir semidesnatado, leite semidesnatado e leite com baixo teor de lactose.

Parâmetros	Tratamentos								
	LSD	ID	KSD 12 h	KSD 24 h	KSD 36 h	KSD 48 h	KSD 60 h	KSD 72 h	LBTL
Lactose (%)	4,20 ^a	3,00 ^b	3,04 ^b	2,53 ^c	2,28 ^d	1,48 ^e	1,19 ^f	1,05 ^g	0,50 ^h
Ác. Láctico (%)	0,12 ^g	1,15 ^e	0,74 ^f	1,13 ^e	1,42 ^d	1,69 ^c	1,92 ^b	2,13 ^a	0,12 ^g
pH	6,7 ^a	4,3 ^c	4,5 ^b	3,9 ^d	3,6 ^e	3,5 ^f	3,4 ^g	3,3 ^h	6,7 ^a
Gordura (%)	2,4 ^a	0,5 ^d	2,0 ^b	2,0 ^b	2,1 ^b	2,0 ^b	2,1 ^b	2,0 ^b	1,0 ^c
Proteína (%)	2,4 ^a	4,2 ^b	2,4 ^c	3,2 ^a					

LSD = leite semidesnatado, ID = iogurte natural desnatado; KSD 12 h, KSD 24 h, KSD 36 h, KSD 48 h, KSD 60 h, KSD 72 h = Kefir semidesnatado fermentado por 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas; LBTL = leite com baixo teor de lactose.

Médias de tratamento seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%

Em relação aos teores de lactose do kefir integral e do semidesnatado, pode-se observar que há diferença estatística entre os tratamentos (horas de fermentação) com uma tendência decrescente no valor do teor de lactose com o aumento do tempo de fermentação. Essa tendência é confirmada pelo valor negativo do coeficiente de correlação de Pearson (-0,9623, <0,0001).

As figuras 5 e 6 ilustram a variação do teor de lactose dos filtrados de kefires integral e semidesnatado.

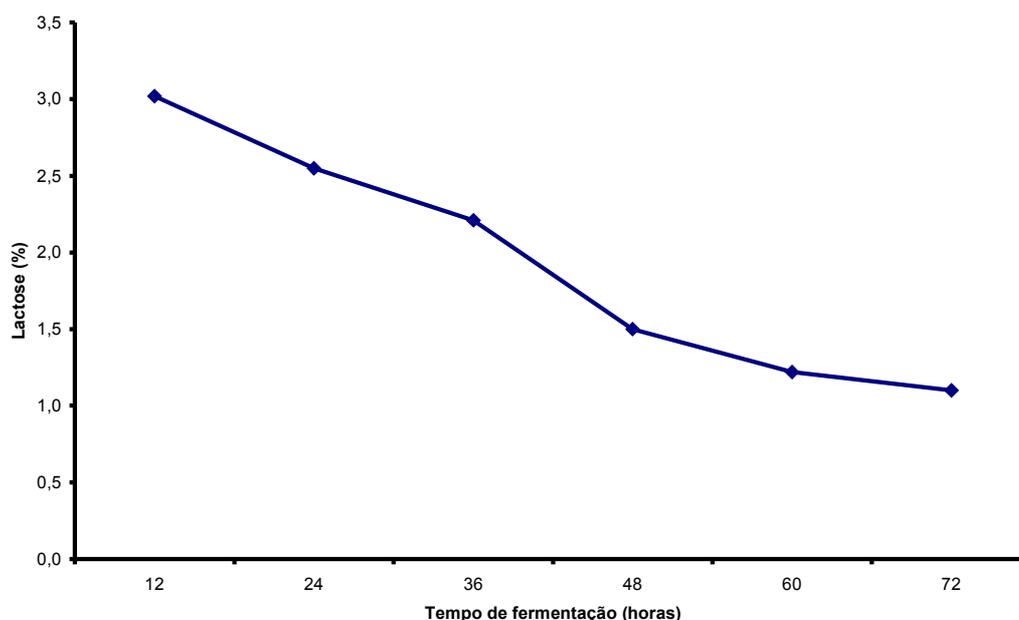


Figura 5: Variação do teor de lactose no filtrado de kefir integral durante o período de fermentação.

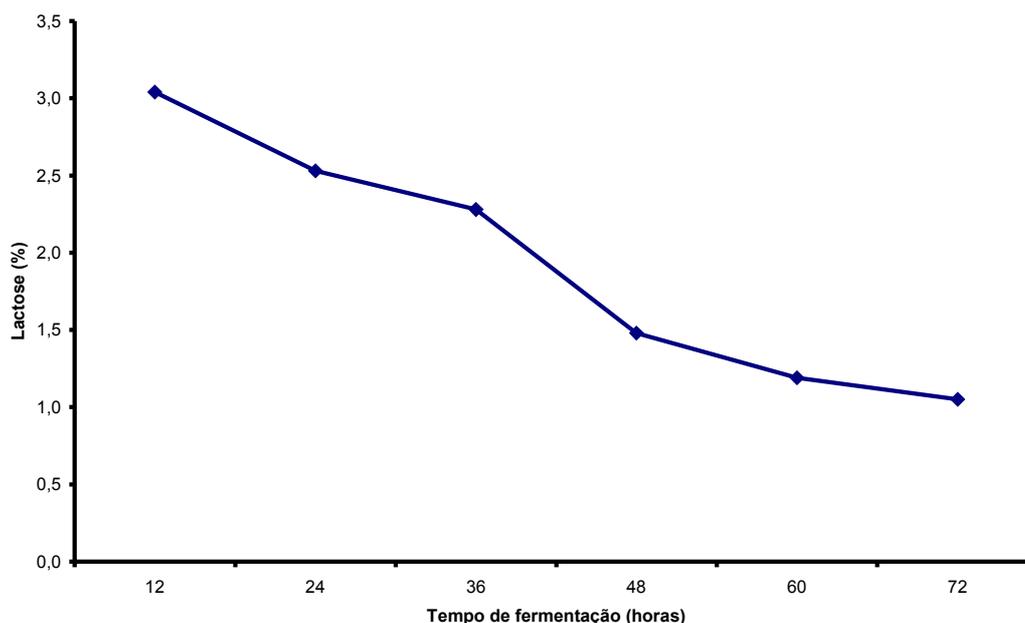


Figura 6: Variação do teor de lactose no filtrado de kefir semidesnatado durante o período de fermentação

Pode-se observar, ainda, que mesmo com 72 h de fermentação os teores de lactose dos kefires integral e semidesnatado eram superiores ao do leite de baixo teor de lactose.

Os iogurtes natural integral e natural desnatado têm teores de lactose maiores do que os dois kefires com menor tempo de fermentação (12 h).

Quanto ao ácido láctico e ao pH, também se observa diferença significativa entre todos os tratamentos para os dois tipos de kefir, com tendência crescente do valor do ácido láctico e decrescente para o valor do pH com o aumento do tempo de fermentação. Isso também foi confirmado pelos coeficientes de correlação de Pearson positivo (0,99326, <0,0001) para o ácido láctico e negativo para o pH (-0,91760, <0,0001).

O índice de correlação de Pearson também indica uma forte correlação negativa (-0,95464, <0,0001) entre o aumento da quantidade de ácido láctico e a diminuição do valor do pH.

As figuras de 7 a 10 mostram a variação do teor de ácido láctico e do pH para os filtrados de kefires integral e semidesnatado.

O iogurte natural integral possui grau de acidez e pH intermediário entre os teores dos kefires integral fermentado por 12 h e fermentado por 24 h; a

mesma situação se repete para o iogurte natural desnatado e o kefir semidesnatado. O leite com baixo teor de acidez tem um teor de ácido láctico e pH igual ao do leite integral.

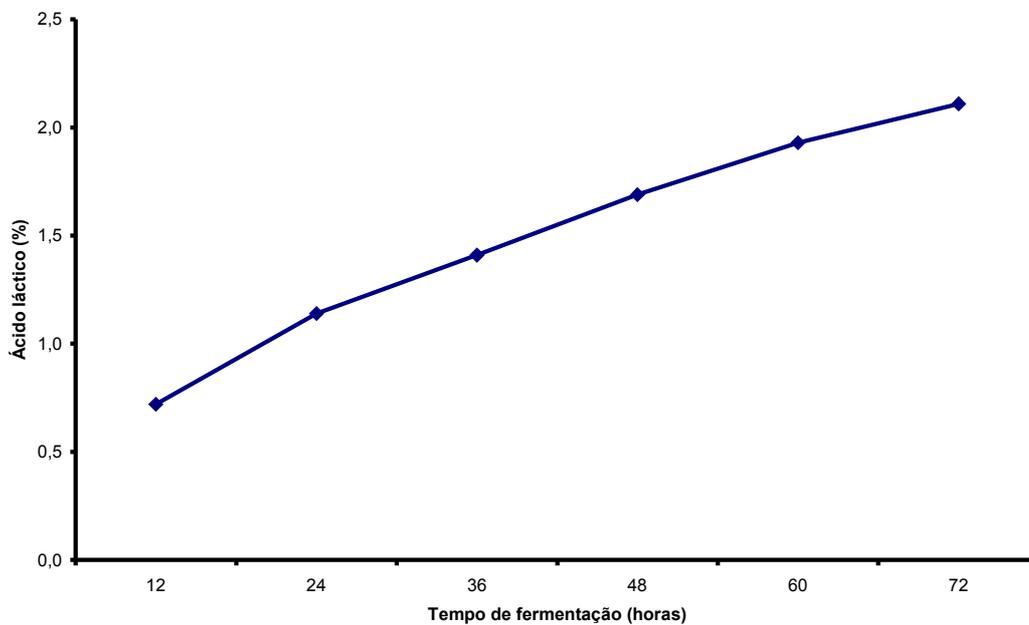


Figura 7: Variação do teor de ácido láctico no filtrado de kefir integral durante o período de fermentação

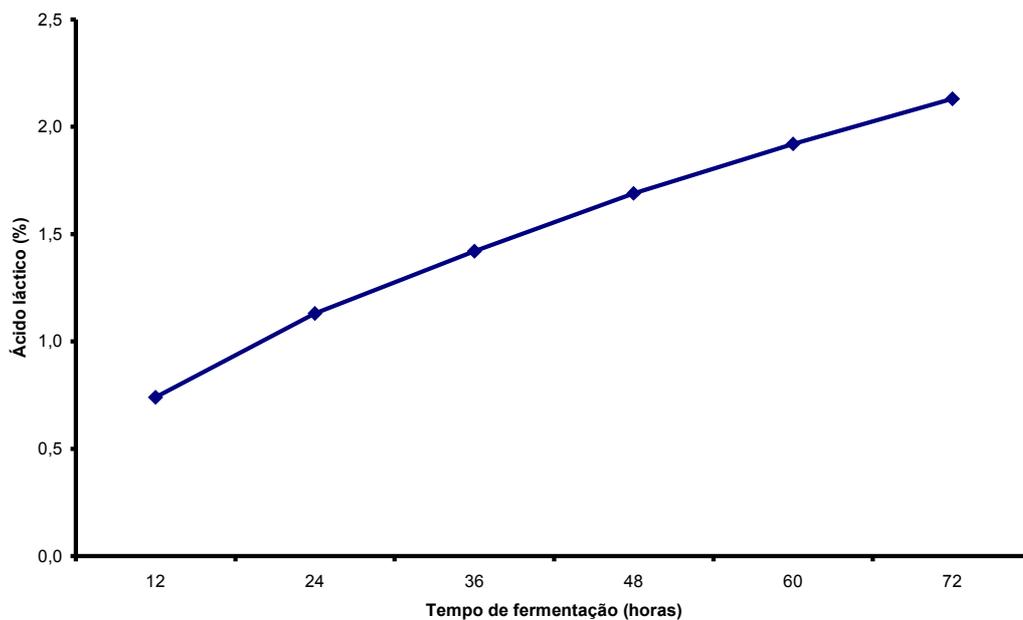


Figura 8: Variação do teor de ácido láctico no filtrado de kefir semidesnatado durante o período de fermentação

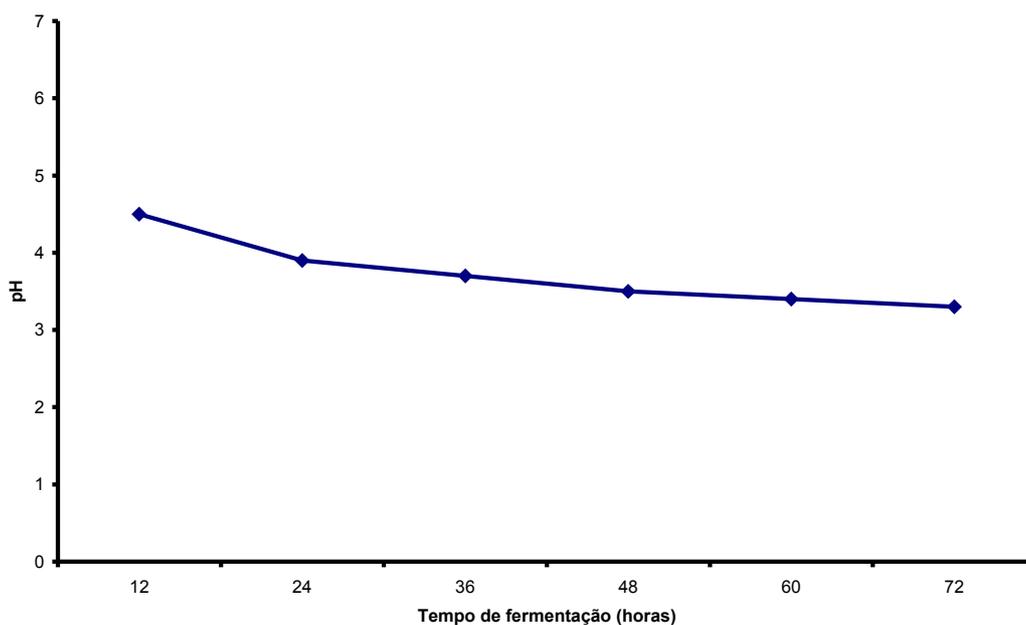


Figura 9: Variação do pH no filtrado de kefir integral durante o período de fermentação

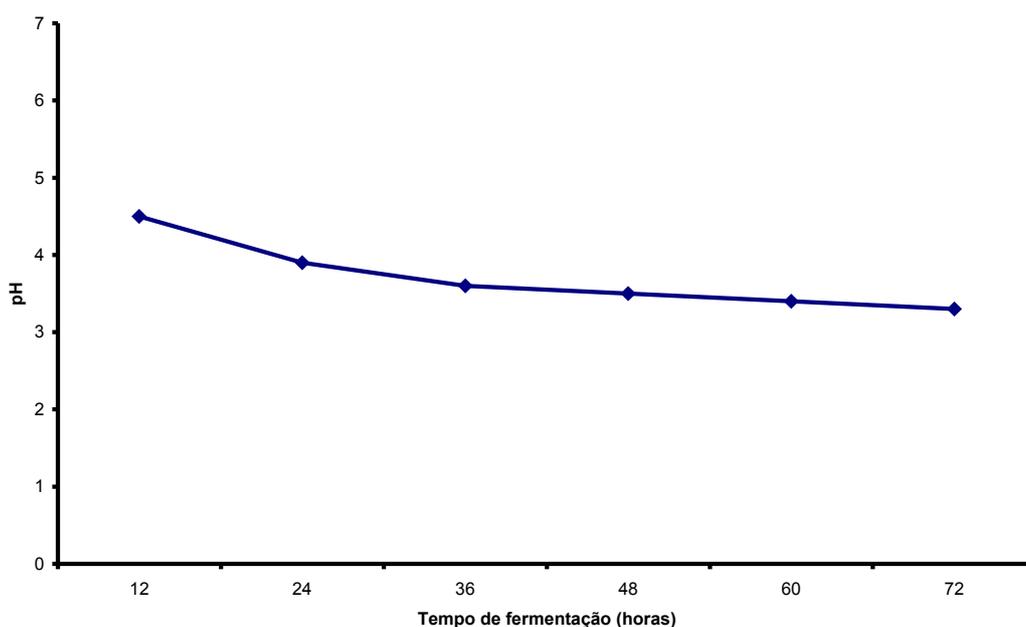


Figura 10: Variação do pH no filtrado de kefir semidesnatado durante o período de fermentação

O valor da porcentagem de proteína no kefir integral e no kefir semidesnatado permaneceu constante durante todo o período de fermentação, não apresentando mudança do seu teor em relação respectivamente aos leites integral e semidesnatado.

As figuras 11 e 12 mostram a variação do teor de proteína nos filtrados de kefires integral e semidesnatado.

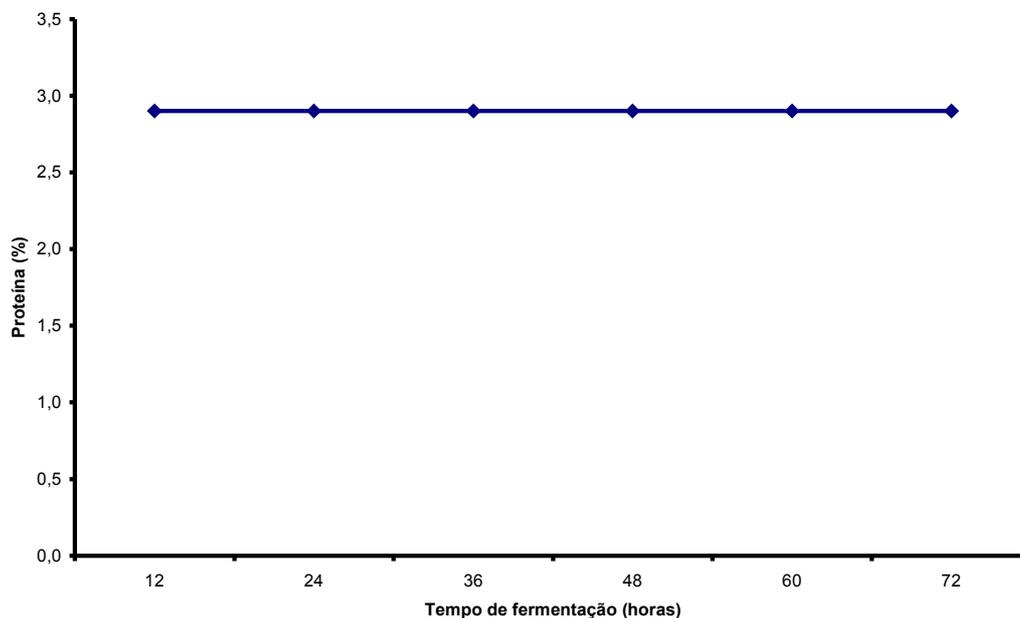


Figura 11: Variação do teor de proteína no kefir integral durante o período de fermentação.

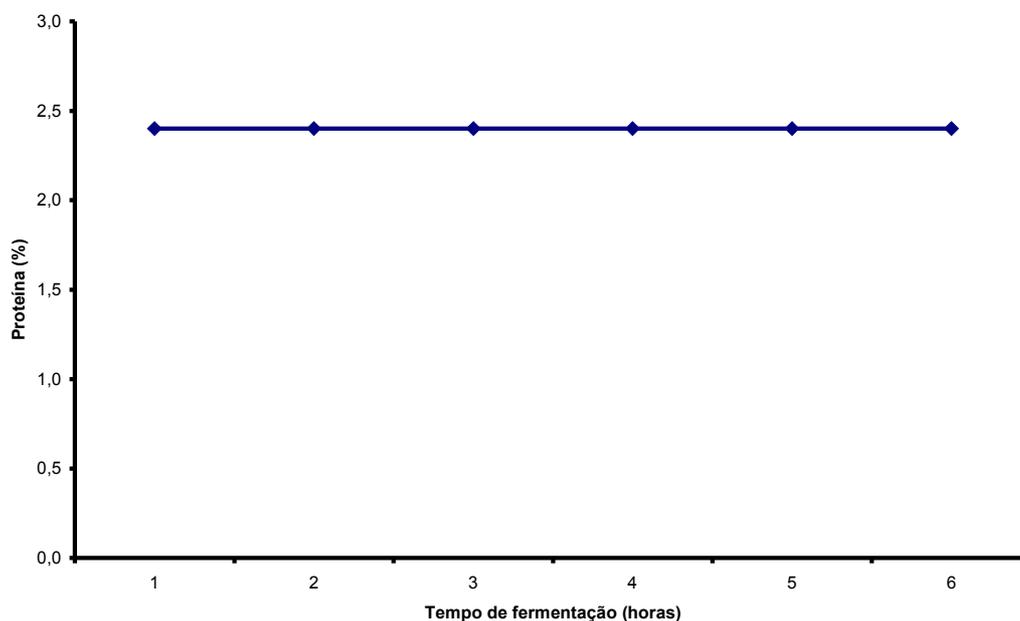


Figura 12: Variação do teor de proteína no kefir semidesnatado durante o período de fermentação

O teor de gordura para os dois kefires – integral e semidesnatado, apresentou uma diminuição no seu valor logo após o começo da fermentação e manteve-se constante durante todo o restante do processo. O valor médio da

redução de gordura para o kefir integral foi de 0,5 %; o do kefir semidesnatado foi de 0,4%.

As figuras 13 e 14 mostram a variação dos teores de gordura nos filtrados de kefires integral e semidesnatado.

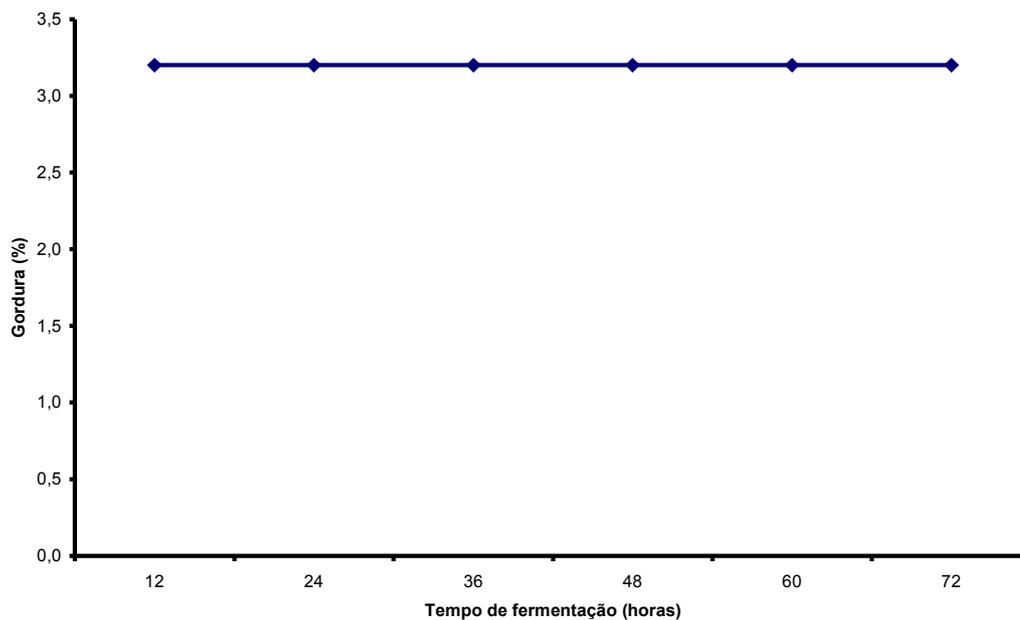


Figura 13: Variação do teor de gordura do kefir integral durante o período de fermentação.

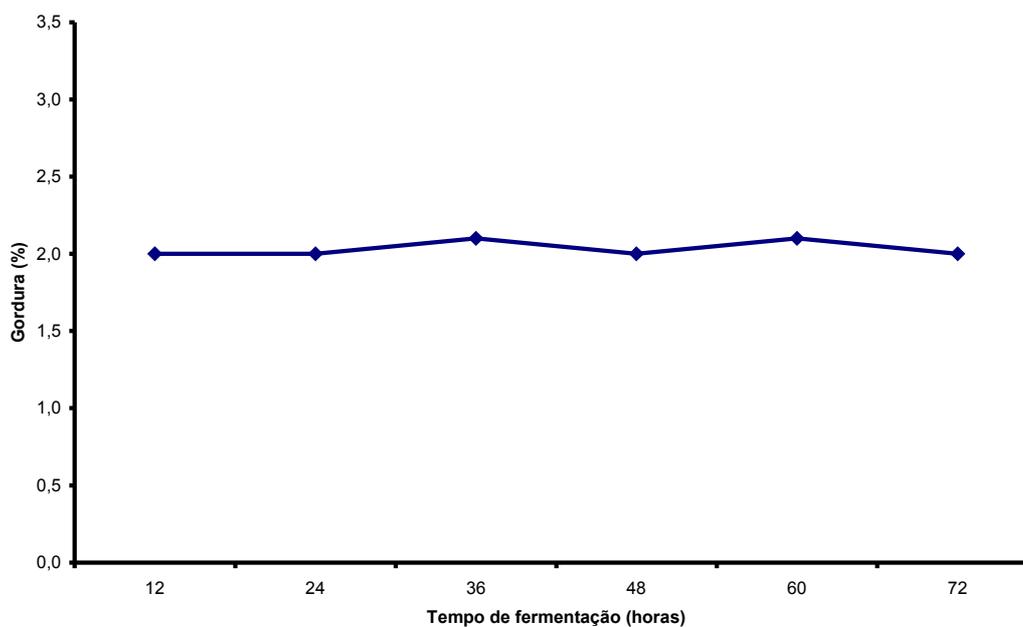


Figura 14: Variação do teor de gordura do kefir semidesnatado durante o período de fermentação.

Na tabela 3 encontram-se os valores médios do teor de lactose, ácido láctico, pH, da diferença média entre o teor de gordura do leite integral e o kefir integral, do teor de gordura do kefir integral e da diferença média do teor de lactose do leite semidesnatado e do kefir semidesnatado nos períodos de fermentação analisados.

Tabela 3: Valores médios de lactose, ácido láctico e pH e diferença média para kefir integral e kefir semidesnatado.

Parâmetros	Tempo de fermentação											
	12 h		24 h		36 h		48 h		60 h		72 h	
	KI	KSD	KI	KSD	KI	KSD	KI	KSD	KI	KSD	KI	KSD
Lactose (%)	3,02 ^a	3,04 ^a	2,55 ^b	2,53 ^b	2,21 ^c	2,28 ^c	1,50 ^d	1,48 ^d	1,22 ^e	1,19 ^e	1,10 ^f	1,05 ^f
Ác. Láctico (%)	0,72 ^a	0,74 ^a	1,14 ^b	1,13 ^b	1,41 ^c	1,42 ^c	1,69 ^d	1,69 ^d	1,93 ^e	1,92 ^e	2,11 ^f	2,13 ^f
pH	4,50 ^a	4,50 ^a	3,90 ^b	3,90 ^b	3,70 ^c	3,60 ^d	3,50 ^e	3,50 ^e	3,40 ^f	3,40 ^f	3,30 ^g	3,30 ^g
Dif. Média Gordura (%)	0,5 ^a	0,4 ^a	0,5 ^a	0,4 ^a	0,5 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a	0,4 ^a	0,4 ^a	0,3 ^a	0,5 ^a	0,4 ^a

KI= kefir integral; KSD= kefir semidesnatado.

Médias de tratamento seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%

Nota-se que, com exceção do valor do pH para o tempo de fermentação de 36 horas, não há diferença estatisticamente significativa entre todos os parâmetros físico-químicos do kefir integral e do kefir semidesnatado.

4 CONCLUSÃO

Os leites integral e semidesnatado fermentados por grãos de kefir tiveram comportamentos semelhantes e estatisticamente idênticos para todos os parâmetros observados nos diferentes períodos de fermentação.

Houve uma redução média de 0,4% no teor de gordura para os dois tipos de kefir e não houve alteração no teor de proteína.

O teor de lactose diminuiu com o tempo de fermentação atingindo, após 24 horas, valores que, se ingeridos em porção equivalente ao volume médio de uma xícara de chá – 219 ml (BOTELHO; *et al.*,2006), são bem tolerados por indivíduos intolerantes à lactose (HERTZLER, 1996).

Associado à diminuição do teor de lactose, há a presença da β -galactosidase microbiana no filtrado de kefir (De Vrese; *et al.*,1992) facilitando a digestão da lactose restante.

A orientação dos *sites* de divulgação de kefir na Internet – que os indivíduos intolerantes à lactose deixem o leite fermentando por no mínimo 48 horas – justifica-se pelo fato de que eles também orientam que para se obter os efeitos probióticos do kefir, deve-se ingerir longo do dia 1 litro de filtrado, o que implica diversas porções de filtrado de kefir e que somadas poderiam conter doses de lactose superiores às suportadas por indivíduos intolerantes.

Em comparação com os iogurtes analisados, os filtrados de kefir apresentam teor menor de lactose já nas primeiras 12 horas de fermentação, o que os torna mais indicados para intolerantes. Apesar do teor de lactose do kefir com 24 horas de fermentação ser cerca de 3 vezes maior do que o teor dos leites industrializados de baixo teor de lactose, o consumo de kefir pode substituir o consumo do leite industrializado, já que o seu consumo não causa transtornos aos indivíduos intolerantes, além de apresentar propriedades medicinais e probióticas.

O aumento do teor de ácido láctico e a diminuição do pH acarretam mudanças no sabor do filtrado de kefir que podem dificultar a sua ingestão após períodos de fermentação mais longos.

KUO *et al.*; (1999) afirmam que grãos de kefir de origens geográficas diferentes, por possuírem diferenças na composição microbiana, produzem filtrados de kefir com diferentes teores de lactose.

Sugere-se a realização de outros estudos para a verificação dos parâmetros físico-químicos de outros tipos de leite, principalmente do leite desnatado, que não foi objeto deste trabalho; verificação se grãos de kefir de diferentes origens geográficas brasileiras apresentam variações no teor de lactose; estudos que variem a concentração de grãos de kefir em relação à quantidade de leite inoculado e que contemplem a fermentação em temperaturas mais baixas e/ou controladas.

Também devem ser contemplados trabalhos que verifiquem a aceitação do kefir fermentado por períodos de tempo variados, de preparações que o utilizem como ingrediente e que acompanhem a ocorrência de sintomas ligados à intolerância em indivíduos intolerantes após o consumo de filtrados de kefir com tempos variados de fermentação.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANFITEATRO, D.N. **A probiotic gem cultured with a probiotic jewel.** Disponível em: < <http://users.chariot.net.au/~dna/kefirpage.html>> Acesso em 20 jul 2006.

BANNAN, P.M. *et al.*, **Calcium, dairy products and osteoporosis: implications of lactose intolerance.** Prim care Update Ob/Gyns, Vol 3, nº4, 1996.

BESHKOVA D.M *et al.*. **Pure cultures for making kefir.** Food Microbiology, 2002, 19 537-544

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

BOTELHO, A. R *et al.* **Utensílios no Brasil: impacto de tabelas de pesos e medidas caseiras,** 2006, no prelo.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005(a). Ementa: Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Publicado no Diário Oficial da União** de 24/08/2005 , Seção 1 , Página 7.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. **Métodos físico-químicos para a análise de alimentos.** 4ª ed. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Ministério da Saúde, 2005(b).

BUCHOWSKI, M.S *et al.*. **Dietary calcium intake in lactose maldigesting intolerant and tolerant African-American women.** J Am Coll Nutr. 2002; 21(1):47-54.

DE VRESE M. *et al.*. **Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase of kefir.** British Journal of Nutrition (1992), 67, 67-75.

DEVILIN M.T *et al.*. **Manual de bioquímica com correlações clínicas.** São Paulo: Edgard Blücher, 2000.

FAO/WHO, 2003 **CODEX STANDARD FOR FERMENTED MILKS.** Disponível em:

<http://www.codexalimentarius.net/download/standards/400/CXS_243e.pdf>

Acesso em 25 jul 2006.

FARNWORTH, E.R. **Handbook of fermented functional foods.** CRC Press, 2003

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

FONSECA, F. **Kefir.** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por: <flaviomterra@uol.com.br> em 01 de ago 2006.

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental.** Piracicaba, ESALQ, 2000

HERTZLER, S.R *et al.*. **How much lactose is low lactose?** Journal of the American Dietetic Association. 1996, 96:243-246.

HERTZLER, S.R. *et al.*. **Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion.** Journal of the American dietetic association, may 2003, vol 103 nº 5.

HONKANEN R. *et al.*. **Does lactose intolerance predispose to low bone density?** Bone. Vol 19, nº 1, july 1996: 23-28.

KEFIR BRASIL, **Kefir real**. Disponível em: <
<http://paginas.terra.com.br/saude/kefir/>> Acesso em 15 ago 2006.

KUO C.-Y.; LIN C.-W. Taiwanese kefir granis: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Australian Journal of Dairy technology*. 1999, vol. 54, nº 1, pp 19-23.

LABAYEN I. *et al.* **Relationship between lactose digestion, gastrointestinal transit time and symptoms in lactose malabsorbers after dairy consumption.** *Aliment Pharmacol Ther* 2001; 15: 543-549.

MAHAN L.K.; STUMP S.E. **Krause alimentos, nutrição e dietoterapia**. 10^a ed. São Paulo: Roca, 2002.

MARQUINA, D. *et al.* **Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel.** *Letters in Applied Microbiology* 2002, 35, 136-140.

OTLES, S. e CAGINDI, O. **Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects.** *Pakistan Journal of Nutrition* 2 (2): 54-59, 2003.

REIS, J.C. *et al.* **Teste do H₂ no ar expirado na avaliação de absorção de lactose e sobre crescimento bacteriano no intestino delgado de escolares.** *Arquivos de Gastroenterologia*, V. 36, nº 4 out/dez 1999.

RODRIGUES, K.L. *et al.* **Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract.** *International Journal of Antimicrobial Agents* 25 (2005) 404-408.

SEVÁ-PEREIRA, A. **Malabsorção de lactose do adulto em uma população brasileira.** Campinas, 1981, 102 f. Tese (Doutorado em Medicina) – faculdades de Ciências Médicas da Unicamp.

SEVÁ-PEREIRA, A *et al.*. **Utilização de leite com baixo teor de lactose na má absorção de lactose e intolerância à lactose.** GED 14 (supl): S17, 1995.

SEVÁ-PEREIRA, A. **Milhões de brasileiros adultos não toleram um copo de leite.** GED 15: 196-200,1996.

SHILS M.E. *et al.*. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença.** 9^a ed. Barueri: Manole, 2003.

SILVEIRA T.R e PRETTO F.M. **Estado nutricional e teste de hidrogênio no ar expirado com lactose e lactulose em crianças.** Jornal de Pediatria – Vol 78, nº 2, 2002.

VIEIRA, S. **Introdução à bioestatística.** 3^a ed. Rio de Janeiro: Campus, 1980

VINDEROLA, C.G. *et al.*. **Immunomodulating capacity of kefir.** Journal of Dairy Research (2005) 72 195-202.

VINDEROLA, G. *et al.*. **Effects of kefir fractions on innate immunity.** Immunobiology 211 (2006) 149-156.

WIEST, J.M. *et al.*. **Quefir tradicional: das montanhas do Cáucaso aos dias atuais.** Higiene Alimentar, vol 13, nº 63, 1999.

WITTHUHN R.C *et al.*. **Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation.** International Dairy Journal 15 (2005) 383-389.

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

6 ANEXO A: Métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz utilizados neste trabalho.

Método 017/IV Determinação do pH

Os processos que avaliam o pH são colorimétricos ou eletrométricos. Os primeiros usam certos indicadores que produzem ou alteram sua coloração em determinadas concentrações de íons de hidrogênio. São processos de aplicação limitada, pois as medidas são aproximadas e não se aplicam às soluções intensamente coloridas ou turvas, bem como às soluções coloidais que podem absorver o indicador, falseando os resultados. Nos processos eletrométricos empregam-se aparelhos que são potenciômetros especialmente adaptados e permitem uma determinação direta, simples e precisa do pH.

Material

Béqueres de 50 e 150 mL, proveta de 100 mL, pHmetro, balança analítica, espátula de metal e agitador magnético.

Reagentes

Soluções-tampão de pH 4, 7 e 10

Procedimento – Pese 10 g da amostra em um béquer e dilua com auxílio de 100 mL de água. Agite o conteúdo até que as partículas, caso hajam, fiquem uniformemente suspensas. Determine o pH, com o aparelho previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

Nota: no caso de amostras líquidas, determine o pH diretamente.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 27.

Método 036/IV Protídios – Método de Kjeldahl clássico

Material

Balança analítica, frascos de Kjeldahl de 500 a 800 mL, chapa elétrica ou manta aquecedora, balão de destilação, frasco Erlenmeyer de 500 mL, bureta de 25 mL, espátula, papel de seda, dedal e pipeta graduada de 25 mL ou pipetador automático.

Reagentes

Ácido sulfúrico

Ácido sulfúrico 0,05 M

Sulfato de cobre

Sulfato de potássio

Dióxido de titânio

Solução fenolftaleína

Vermelho de metila a 1% m/v

Zinco em pó

Hidróxido de sódio a 30%

Hidróxido de sódio 0,1 M

Azul de metileno a 1% m/v

Mistura catalítica – Dióxido de titânio anidro, sulfato de cobre anidro e sulfato de potássio anidro, na proporção 0,3:0,3:6.

Procedimento – Pese 1 g da amostra em papel de seda. Transfira para o balão de Kjeldahl (papel+amostra). Adicione 25 mL de ácido sulfúrico e cerca de 6 g da mistura catalítica. Leve ao aquecimento em chapa elétrica, na capela, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos). Aqueça por mais uma hora. Deixe esfriar. Caso o laboratório não disponha de sistema automático de destilação, transfira quantitativamente o material do balão para o frasco de destilação. Adicione 10 gotas do indicador fenolftaleína e 1 g de zinco em pó (para ajudar a clivagem das moléculas grandes de protídios). Ligue imediatamente o balão ao conjunto de destilação. Mergulhe a extremidade afilada do refrigerante em 25 mL de ácido sulfúrico

0,05 M, contido em frasco Erlenmeyer de 500 mL com 3 gotas do indicador vermelho de metila. Adicione ao frasco que contém a amostra digerida, por meio de um funil com torneira, solução de hidróxido de sódio a 30% até garantir um ligeiro excesso de base. Aqueça à ebulição e destile até obter cerca de (250-300) mL do destilado. Titule o excesso de ácido sulfúrico 0,05 M com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, usando vermelho de metila.

Cálculo

$$\frac{V \times 0,14 \times f}{P} = \text{protídios por cento m/m}$$

V = diferença entre o nº de mL de ácido sulfúrico 0,05 M e o nº de mL de hidróxido de sódio 0,1 M gastos na titulação

P = nº de g da amostra

f = fator de conversão (conforme **Tabela 6**)

Tabela 6 – Fatores de conversão de nitrogênio total em proteína

Alimento	Fator	Alimento	Fator
Farinha de centeio	5,83	Castanha do Pará	5,46
Farinha de trigo	5,83	Avelã	5,30
Macarrão	5,70	Coco	5,30
Cevada	5,83	Outras nozes	5,30
Aveia	5,83	Leite e derivados	6,38
Amendoim	5,46	Margarina	6,38
Soja	6,25	Gelatina	5,55
Arroz	5,95	Outros alimentos	6,25
Amêndoas	5,18	-	-

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 44-45. FAO/WHO. FAO Nutrition Meetings Report Series, **52**. **Energy and protein requirements**. Geneva, 1973. (Technical Report Series, n. 522). SOUTHGATE, D.A.T. **The relationship between food composition and available energy**. Rome: Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation on Energy and Protein Requirements. 1981.

Método 037/IV Protídios – Método de Kjeldahl modificado

Material

Balança analítica, frasco de Kjeldahl de 500 a 800 mL, chapa elétrica ou manta aquecedora, balão de destilação, frasco Erlenmeyer de 500 mL, buretas de 25 mL, espátula, papel de seda, pipeta graduada de 25 mL ou pipetador automático.

Reagentes

Ácido sulfúrico

Ácido sulfúrico 0,05 M

Ácido bórico 0,033 M

Sulfato de cobre

Sulfato de potássio

Dióxido de titânio

Solução de fenolftaleína

Vermelho de metila a 1% m/v

Zinco em pó

Hidróxido de sódio a 30%

Procedimento – Para a digestão da amostra, proceda conforme descrito em **036/IV**. Na destilação, proceda também como em **036/IV**, substituindo o ácido sulfúrico 0,05 M no frasco Erlenmeyer onde será recolhida a amônia formada, por ácido bórico 0,033 M, que não reage diretamente, servindo apenas como suporte para adsorção da amônia. Titule diretamente a solução de hidróxido de amônio com a solução de ácido sulfúrico 0,05 M, utilizando o mesmo indicador do método **036/IV**.

Nota: alternativamente, poderá ser utilizada uma solução de ácido clorídrico 0,1 M em substituição ao ácido sulfúrico 0,05 M.

Cálculo

$$\frac{V \times 0,14 \times f}{P} = \text{protídios por cento m/m}$$

V = volume de ácido sulfúrico 0,05 M gasto na titulação

P = nº de g da amostra

f = fator de conversão (conforme **Tabela 6**)

Referência bibliográfica

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (method 991.20). Arlington: A.O.A.C., 1995, chapter 33. p. 10-12.

Método 432/IV Leites – Determinação de glicídios redutores em lactose

Material

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

Reagentes

Solução de sulfato de zinco a 30% m/v

Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v

Soluções de Fehling tituladas

Procedimento – Transfira, com auxílio de uma pipeta volumétrica, 10 mL da amostra para um balão volumétrico de 100 mL, adicione 50 mL de água, 2 mL da solução de sulfato de zinco a 30% e 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15%, misturando bem após cada adição. Deixe sedimentar durante 5 minutos, complete o volume com água e agite. Filtre em papel de filtro, recebendo o filtrado, que deverá estar límpido, em um frasco Erlenmeyer de 300 mL. Em um balão de fundo chato de 300 mL, transfira 10 mL de cada uma das soluções de Fehling e adicione 40 mL de água, aquecendo até a ebulição em chapa aquecedora. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicione, às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, utilizando garra de madeira, até que esta solução mude de coloração azul à incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho-tijolo).

Cálculo

$$\frac{V \times 0,068 \times 100}{L \times v} = \text{glicídios redutores em lactose}$$

0,068 = n° de g de lactose que corresponde a 10 mL da solução de Fehling

v = n° de mL da solução da amostra, gasto na titulação

L = n° de mL da amostra

V = n° de mL da diluição da amostra (100 mL)

Referências bibliográficas

INSTITUTO ADOLFO LUTZ **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 206. BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa n° 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, 02/05/03, Brasília, p. 15.

Método 433/IV Leites – Determinação de gordura pelo método de Gerber

O método mais empregado para a determinação de gordura no leite é o de Gerber, que baseia-se na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico, na centrifugação e posterior determinação da gordura. Esta determinação pode, ainda, ser feita em aparelhos automáticos.

Material

Lactobutirômetro de Gerber com respectiva rolha, balança semi-analítica, pipetadores automáticos de 10 e 1 mL, termômetro, pipeta volumétrica de 11 mL, termocentrífuga de Gerber ou centrífuga de Gerber, banho-maria, papel absorvente e luvas.

Reagentes

Ácido sulfúrico (D = 1,820 - 1,825)

Álcool isoamílico (D = 0,815)

Procedimento – Pese os lactobutirômetros com suas respectivas rolhas para verificar se os mesmos estão com os pesos equivalentes. Transfira, com o auxílio de um pipetador automático, 10 mL de ácido sulfúrico para o butirômetro. Adicione lentamente, com o auxílio de pipeta volumétrica, 11 mL da amostra, evitando que se queime ao contato com o ácido. Junte, com o auxílio de um pipetador automático, 1 mL de álcool isoamílico. Estas adições devem ser feitas sem molhar internamente o gargalo do butirômetro; se isto acontecer, limpe cuidadosamente com um papel absorvente. Arrolhe o butirômetro, pese, utilizando luvas, e agite até completa dissolução. Centrifugue a (1200 ± 100) rpm durante 15 minutos, quando for usada a termocentrífuga. No caso de usar a centrífuga de Gerber, centrifugue por 5 minutos, leve para um banho-maria a $(63 \pm 2)^\circ\text{C}$, por 2 a 3 minutos, com a rolha para baixo. Retire o lactobutirômetro da termocentrífuga ou do banho na posição vertical (rolha para baixo). Manejando a rolha, coloque a camada

amarela-clara, transparente (gordura), dentro da escala graduada do lactobutirômetro. O valor obtido na escala corresponde diretamente à porcentagem de gordura, cuja leitura deve ser feita no menisco inferior.

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985, p. 207-208.

Método 435/IV Leites – Determinação de protídios

Procedimento – Transfira, com o auxílio de uma pipeta volumétrica, 5 mL da amostra para um frasco de Kjeldahl de 300 mL e proceda conforme método **036/IV** ou **037/IV**, utilizando o fator 6,38 para conversão de nitrogênio em proteína.

Método 488/IV – Doce de leite – Determinação de glicídios redutores em lactose

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, béquer de 200 mL, balão volumétrico de 100 mL, frasco Erlenmeyer de 300 mL, funil de vidro, papel de filtro, balão de fundo chato de 300 mL, pipetas graduadas de 2 mL, pipetas volumétricas de 10 mL, bureta de 25 mL, espátula, bastão de vidro e garra de madeira.

Reagentes

Solução de sulfato de zinco a 30% m/v

Solução de ferrocianeto de potássio a 15% m/v

Soluções de Fehling tituladas

Procedimento – Pese aproximadamente 2 g da amostra em béquer de 100 mL. Transfira quantitativamente com auxílio de 50 mL de água e um bastão de vidro para um balão volumétrico de 100 mL. Adicione 2 mL da solução de sulfato de zinco a 30%, misture, adicione 2 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e misture. Deixe sedimentar, durante 5 minutos, complete o volume do balão com água e agite. Filtre em papel de filtro para um frasco Erlenmeyer de 300 mL, o filtrado deverá estar límpido. Em balão de fundo chato de 300 mL, adicione 10 mL de cada uma das soluções de Fehling, 40 mL de água e aqueça até ebulição. Transfira o filtrado para uma bureta de 25 mL e adicione, às gotas, sobre a solução do balão em ebulição, agitando sempre, até que esta solução passe de azul a incolor (no fundo do balão deverá ficar um resíduo vermelho-tijolo).

Cálculo

$$\frac{A \times 0,068 \times 100}{V \times P} = \text{lactose por cento m/m}$$

A = n° de mL de P g da amostra

V = n° de mL da solução da amostra gasto na titulação

P = n° de g da amostra

Referência bibliográfica

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. p. 205-206.

Método 493/IV Leites fermentados – Determinação da acidez em ácido láctico

Material

Balança analítica, potenciômetro, agitador magnético, béquer de 50 mL, bureta de 25 mL, pipeta graduada de 10 mL, bastão de vidro e espátula.

Reagentes

Solução de hidróxido de sódio 0,1 M

Solução de fenolftaleína

Procedimento – Pipete 10 mL ou pese aproximadamente 10 g da amostra em um béquer de 50 mL. Adicione com pipeta graduada aproximadamente 10 mL de água isenta de gás carbônico e misture com bastão de vidro. Adicione 5 gotas da solução de fenolftaleína. Titule com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando bureta de 25 mL, até o aparecimento de uma coloração rósea. No caso de produtos onde a coloração interfere na visualização do ponto de viragem da fenolftaleína, faça titulação potenciométrica. Para isto, mergulhe os eletrodos de Ph e verifique se estão bem imersos. Titule, sob agitação, com solução de hidróxido de sódio 0,1 M, até pH 8,3.

Cálculo

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

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

P = nº g ou mL da amostra

0,9 = fator de conversão para o ácido láctico

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

Referência bibliográfica

BRASIL. Leis, Decretos, etc. Instrução Normativa N° 22, de 14/04/03, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial, Brasília, 02/05/03, p. 11.

Método 497/IV Leites fermentados – Determinação de gordura com butirômetro de Gerber

Material

Balança analítica, chapa aquecedora, béquer de 100 mL, espátula, bastão de vidro, balão de volumétrico de 100 mL e termômetro.

Procedimento – Pese exatamente 10 g da amostra em um béquer de 100 mL, dissolva com 30 mL de água a (40 - 50)°C com auxílio de um bastão de vidro, transfira para um balão volumétrico de 100 mL, resfrie e complete o volume. Proceda conforme o método **433/IV**.

Cálculo

$V \times 10 = \text{gordura por cento m/v}$

$V \times 10 = \text{gordura por cento m/v}$

V = valor lido na escala do butirômetro

Referência bibliográfica

SILVA, P. H. F. *et al.* **Físico-química do leite e derivados – Métodos Analíticos**. Juiz de Fora: Minas Gerais. 1997. p. 154-155.

Método 498/IV Leites fermentados – Determinação de protídios

Procedimento – Pese de 1 a 2 g da amostra e proceda conforme o método **036/IV** ou **037/IV**.

Método 499/IV Leites fermentados – Determinação de glicídios redutores em lactose

Procedimento – Pese aproximadamente 5 g da amostra e proceda conforme o método **488/IV**.