

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE NUTRIÇÃO EMÍLIA DE JESUS FERREIRO
GRADUAÇÃO DO CURSO DE NUTRIÇÃO

NATHÁLIA DE SOUSA MOULIN CABRAL

KEFIR SABOR CHOCOLATE:
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA

NITERÓI

2014

NATHÁLIA DE SOUSA MOULIN CABRAL

**KEFIR SABOR CHOCOLATE:
CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA E FÍSICO-QUÍMICA**

Trabalho de conclusão do curso de Graduação em Nutrição da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientadora:

Profª Drª Alexandra Anastacio Monteiro Silva

Niterói, RJ

2014

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus, que me ajudou em todos os momentos que eu mais precisei, me deu força e coragem para lutar. Guiou meus passos e sempre esteve ao meu lado. Graças a Ele concluo mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, Ana Lúcia e José Reinaldo, por sempre me incentivarem a perseverar nos meus ideais e lutar até a concretização dos meus sonhos.

Ao meu namorado, Ronaldo, que me ajudou me dando força e coragem para lutar até o fim.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Alexandra Anastacio Monteiro Silva, pelo voto de confiança, constante incentivo e orientação.

A Prof^a Dr^a Marcia Pinheiro, pela contribuição para a realização das análises microbiológicas.

A Prof^a Dr^a Marcia Barreto da Silva Feijó, Prof^a Maria Leonor Fernandes e Prof^o Sérgio, pela contribuição para a realização das análises físico-química, pelas sugestões e correções enriquecedoras.

As técnicas do MBO, Aline e Adriana, por me ajudarem na realização das análises físico-química e pelos momentos de descontração.

Aos estagiários do Laboratório SILO, Gustavo, Luiz e Thaysa, pela ajuda para a realização das análises microbiológicas.

A Bruna Nascimento da Silva, pela ajuda na realização das análises físico-química.

A Jessica de Souza, pela doação dos grãos de kefir.

A todos as pessoas que contribuíram para realização deste trabalho e torceram pela minha vida.

RESUMO

Os grãos de kefir são descritos como uma associação simbiótica entre leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos. O kefir apresenta benefícios como a redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, proteção contra microrganismos patogênicos, balanço da microbiota intestinal além de reconhecida atividade anticarcinogênica. A demanda por produtos com características funcionais e sensoriais desejáveis é elevada, e a indústria de alimentos investe cada vez mais no segmento de bebidas fermentadas. Do ponto de vista sensorial, a adição de chocolate às bebidas fermentadas é uma inovação tecnológica, visto que valoriza as características sensoriais, agrega valor nutricional e funcional. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da concentração de grãos de kefir (5% e 10% m/v) sobre as características microbiológicas e físico-químicas de uma probiótica sabor chocolate. Foram realizadas análises físico-químicas: pH, acidez, lactose, sacarose, umidade, resíduo mineral fixo, proteínas, lipídios, carboidratos e valor energético total; e análises microbiológicas: contagem de bactérias ácido-láticas (BAL), bolores e leveduras (BL), presença de coliformes totais e termotolerantes nas bebidas fermentadas não saborizadas e saborizadas com chocolate em pó e açúcar. As amostras de kefir 5% e 10% m/v não saborizadas e 5% m/v saborizada apresentaram conteúdo de bactérias ácido-láticas semelhantes. O kefir saborizado 5% m/v apresentou conteúdo de bactérias ácido-láticas maior que o kefir saborizado 10% m/v. Além disso, o conteúdo de BL foi 100 vezes maior no kefir não saborizado 5% m/v e 1000 vezes maior no kefir saborizado 10% m/v. É possível que o aumento da concentração de grãos de kefir aliado à adição de chocolate em pó e açúcar iniba o crescimento das BAL no kefir 10% m/v e favoreça o crescimento de microrganismos não fermentadores de lactose no kefir 10% m/v. Todas as amostras apresentaram ausência de coliformes totais e termotolerantes. Em relação às análises físico-químicas das amostras de kefir não saborizadas e saborizadas, observou-se que a maior concentração dos grãos de kefir (10% m/v) reduziram os valores de pH, acidez, lactose e lipídeo, consistente com a fermentação da lactose, redução do pH e aumento da acidez. Além disso, a ação de lipases no grão pode justificar a redução do teor de lipídios. Concluímos que o desenvolvimento de bebidas probióticas com grãos de kefir, agrega valor comercial e nutricional mediante a adição de chocolate. As bebidas estudadas apresentam-se como alternativas viáveis de alimentos para fins especiais.

Palavras-chave: Kefir, chocolate, probiótico.

ABSTRACT

Kefir grains are described as a symbiotic association between yeast and lactic acid bacteria, acetic acid bacteria surrounded by a matrix of polysaccharides. Kefir has benefits such as reducing the effects of lactose intolerance, immunomodulation, protection against pathogens, the intestinal microbiota balance and recognized anticarcinogenic activity. The demand for products with desirable functional and sensory characteristics is high, and the food industry increasingly invests in fermented beverages segment. The sensory point of view, the addition of chocolate to fermented beverages is a technological innovation since appreciates the sensory value characteristics, adds nutritional and functional. The aim of this study was to evaluate the influence of the concentration of kefir grains (5% and 10% w/v) on the microbiological and physico-chemical characteristics of a probiotic drink chocolate flavor. Physico-chemical analyzes were carried out: pH, acidity, lactose, saccharose, moisture, fixed mineral residue, proteins, lipids, carbohydrates and total energy, and microbiological: count of lactic acid bacteria, molds and yeasts, presence of total and fecal coliforms, in non flavored and chocolate flavored powder and sugar. The samples kefir 5% and 10% w/v non-flavored and 5% w/v flavored showed lactic acid bacteria similar content. The flavored kefir 5% w/v showed more lactic acid bacteria content than kefir flavored 10% w/v. Furthermore, the content of molds and yeasts was 100 times higher in non-flavored kefir 5% w/v and 1000 times greater in flavored kefir 10% w/v. It is possible that the increased concentration of kefir grains together with the addition of cocoa powder and sugar inhibits the growth of lactic acid bacteria in kefir 10% w/v and favors the growth of microorganisms non-lactose fermenting in kefir 10% w/v. All samples showed absence of total and fecal coliforms. In relation to the physical-chemical analyzes of samples non flavored and flavored kefir, it was observed that the greatest concentration of kefir grains (10% w/v) reduced the pH, acidity, lactose and lipid, consistent with lactose fermentation, pH reduction and increased acidity. Moreover, the action of lipases in the grain can justify the reduction of lipid content. We conclude that the development of probiotic drinks with kefir grains, can add commercial, nutritional and sensory value by the addition of chocolate. Drinks studied are presented as viable alternatives of food for special purposes.

Keywords: Kefir, chocolate, probiotic.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS, p. 9

LISTA DE QUADROS, p. 10

LISTA DE FIGURAS, p. 11

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, p. 12

1 INTRODUÇÃO, p. 13

2 OBJETIVOS, p. 14

2.1 OBJETIVO GERAL, p. 14

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 14

3 REVISÃO DE LITERATURA, p. 15

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS, p. 15

3.2 PROBIÓTICOS, p. 15

3.3 PREBIÓTICOS, p. 21

3.4 SIMBIÓTICOS, p. 22

3.5 KEFIR, p. 22

3.5.1 Histórico, p. 22

3.5.2 Definição, p. 23

3.5.3 Grãos de kefir, p.23

3.5.4 Composição centesimal dos grãos de kefir, p. 24

3.5.5 Microbiota dos grãos de kefir, p.24

3.5.6 Produção do kefir, p.25

3.5.7 Fermentação láctica, p. 27

3.5.8 Fermentação alcoólica, p. 30

3.5.9 Características físico-químicas da bebida, p. 30

3.5.10 Contagem de microrganismos na bebida, p. 32

3.5.11 Tratamento térmico, condições de comercialização e acondicionamento, p. 32

3.5.12 Características nutricionais, p. 33

3.5.13 Kefir: Alimento funcional, p. 33

3.5.13.1 Compostos bioativos, p. 34

3.5.13.2 Benefícios para saúde, p. 37
3.6 CACAU E CHOCOLATE, p. 42
3.6.1 <u>Histórico</u> , p. 42
3.6.2 <u>Definição</u> , p. 43
3.6.3 <u>Chocolate</u> , p. 43
3.6.4 <u>Produção e consumo do cacau e chocolate</u> , p. 44
3.6.5 <u>Propriedades nutricionais</u> , p. 48
3.6.5.1 Polifenóis presentes no cacau, p. 48
3.6.6 <u>Benefícios do cacau</u> , p. 49
3.6.6.1 Capacidade antioxidante, p. 49
3.6.6.2 Atividade cardioprotetora, p. 50
3.6.6.3 Atividade anti-inflamatória, p. 50
4 MATERIAIS E MÉTODOS, p. 51
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS UTILIZADAS PARA ELABORAÇÃO DO KEFIR, p. 51
4.2 PREPARAÇÃO DAS BEBIDAS FERMENTADAS, p. 51
4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, p. 51
4.3.1 <u>Contagem de bactérias ácido-láticas</u> , p.52
4.3.2 <u>Contagem de bolores de leveduras</u> , p.52
4.3.3 <u>Contagem de coliformes totais termotolerantes</u> , p. 52
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 53
4.4.1 <u>Determinação do pH</u> , p. 53
4.4.2 <u>Determinação de acidez em ácido láctico</u> , p. 54
4.4.3 <u>Determinação de glicídios redutores em lactose</u> , p. 54
4.4.4 <u>Determinação de glicídios não redutores em sacarose</u> , p. 55
4.5 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, p. 56
4.5.1 <u>Determinação de umidade</u> , p. 56
4.5.2 <u>Determinação de resíduo mineral fixo</u> , p. 57
4.5.3 <u>Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl</u> , p. 58
4.5.4 <u>Determinação de lipídeo com butirômetro de Gerber</u> , p. 59
4.5.5 <u>Determinação de lipídeo pelo método de extração direta em Soxhlet</u> , p. 60
4.5.6 <u>Determinação de carboidrato</u> , p. 61
4.5.7 <u>Determinação de energia</u> , p. 61
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA, p. 61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p. 62

5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS, p. 62

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS, p. 64

5.3 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, p. 66

6 CONCLUSÃO, p. 69

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise microbiológica das amostras de kefir, f. 63

Tabela 2. Análise físico-química das amostras de kefir, f. 67

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1: Benefícios promovidos pelos probióticos aos hospedeiros, f. 19
- Quadro 2: Exemplos de microrganismos probióticos de leites fermentados, f. 20
- Quadro 3: Benefícios promovidos pelos prebióticos, f. 21
- Quadro 4: Leveduras associadas aos grãos de kefir, f. 25
- Quadro 5: Bactérias associadas aos grãos de kefir, f. 26
- Quadro 6: Características físico-químicas dos leites fermentados, f. 31
- Quadro 7: Características físico-químicas, particulares, do kefir, f. 32
- Quadro 8: Contagem de microrganismos específicos presentes no kefir, f. 32
- Quadro 9: Classificação do chocolate, de acordo com a sua composição, f. 45
- Quadro 10: Etapas do processamento industrial do chocolate em pó solúvel, f. 47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Grãos de kefir, f. 23

Figura 2. Rota glicolítica homofermentativa adaptada, f. 28

Figura 3. Rota glicolítica heterofermentativa adaptada, f. 29

Figura 4. Estrutura química da molécula de kefiran, f. 35

Gráfico 1. Valores de pH, acidez e lactose do leite integral UHT e das amostras de kefir, f. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGCC	Ácidos graxos de cadeia curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAA	Bactérias ácido-acéticas
BAL	Bactérias ácido-láticas
BL	Bolores e leveduras
CH ₄	Gás metano
cm	centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	<i>Desoxi Ribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FOS	Fruto-oligossacarídeos
FOSHU	<i>Foods for specified health use</i>
g	grama
GOS	Galactolacto-oligossacrídeos
H ₂	Gás hidrogênio
HDL	<i>High density lipoprotein cholesterol</i> (lipoproteína de alta densidade)
IgA	Imunoglobulina A
LDL	<i>Low density lipoprotein cholesterol</i> (lipoproteína de baixa densidade)
m	massa
µg	micrograma
mL	mililitro
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NK	<i>natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
PEP/PTS	Fosfoenolpiruvato fosfotransferase
PS	Permease
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidade formadora de colônia
UHT	Ultra High Temperature (ultrapasteurização)
v	volume

1 INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos que promovem saúde e bem-estar vem aumentando. Entre os alimentos que atendam a essa demanda, aqueles com propriedades funcionais têm atraído à atenção dos consumidores e da indústria alimentar.

Entre os alimentos funcionais, ressaltam-se os probióticos. Estes têm efeitos positivos sobre a composição da microbiota intestinal e saúde geral. Os produtos lácteos fermentados são, geralmente, boas matrizes alimentares para os probióticos(MARTINS, E.et al., 2013).

Dentre os microrganismos utilizados na produção de bebidas fermentadas probióticas, destaca-se a cultura de kefir. O kefir é um alimento originário do Cáucaso obtido a partir da fermentação do leite pelos grãos ou por fermento de kefir. Os grãos de kefir são descritos como uma associação simbiótica entre leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas, envoltas por uma matriz de polissacarídeos (DINIZ et al.,2003).

Comparado ao iogurte, o kefir além de possuir uma escala maior e mais diversificada de microrganismos viáveis em sua cultura inicial, também apresenta um nível de atividade da β -galactosidase 60% mais elevado, contribuindo para um aumento significativo da digestão da lactose do leite (HERTZLER; CLANCY, 2003).

O kefir apresenta diversos benefícios como: redução dos efeitos de intolerância à lactose, imunomodulação, proteção contra microrganismos patogênicos, modulação dos níveis de colesterol, atividade anticarcinogênica (DINIZ et al.,2003).

A adição de chocolate pode ser uma alternativa para melhorar as características sensoriais do kefir e agregar valor nutricional à bebida devido às propriedades funcionais presentes no cacau. O chocolate é um produto obtido a partir do cacau, que por sua vez é rico em compostos fenólicos. Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau estão dentro das classes dos taninos e dos flavonoides. Os flavonoides têm sido largamente estudados em razão dos efeitos benéficos que propiciam à saúde, tais como: propriedade anti-inflamatória, antiaterogênica, antitrombótica, antimicrobiana, analgésica e vasodilatadora, comprovadas em estudos científicos (WOLLGAST; ANKLAN, 2000;GOTTI et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar as características microbiológicas e físico-químicas de amostras de kefir não saborizado e kefir sabor chocolate obtidas a partir de duas concentrações de grãos de kefir (5% e 10% m/v).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver duas formulações de kefir a partir da fermentação de grãos de kefir nas concentrações de 5% e 10% (m/v) em leite integral UHT
- Desenvolver duas formulações de kefir a partir da fermentação de grãos de kefir nas concentrações de 5% e 10% (m/v) em leite integral UHT com adição de chocolate em pó solúvel (50% cacau) e açúcar refinado;
- Realizar as análises de acidez, lactose, umidade, resíduo mineral fixo, proteínas e lipídios do leite integral UHT;
- Realizar as análises de umidade, resíduo mineral fixo, proteínas, lipídios e carboidratos do chocolate em pó solúvel (50% cacau);
- Determinar e comparar o conteúdo de bactérias ácido-lácticas, bolores e leveduras das amostras de kefir saborizado e não saborizado com chocolate nas concentrações de grãos de kefir de 5% e 10% m/v;
- Avaliar as condições higiênico-sanitárias por meio da análise de coliformes totais e termotolerantes das amostras de kefir saborizado e não saborizado com chocolate nas concentrações de grãos de kefir de 5% e 10% m/v.
- Determinar e comparar as características de pH, acidez, lactose, umidade, resíduo mineral fixo, proteínas, lipídios e valor energético no kefir não saborizado nas concentrações de grãos de kefir de 5% e 10% m/v.
- Determinar e comparar as características de pH, acidez, lactose, sacarose, umidade, resíduo mineral fixo, proteínas, lipídios e valor energético no kefir saborizado com chocolate nas concentrações de grãos de kefir de 5% e 10% m/v.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O conceito de alimentos funcionais foi proposto pelo governo do Japão em meados da década de 1980. A partir dos anos 90, recebeu a designação em inglês de FOSHU (*foods for specified health use*). O princípio foi adotado em outras partes do mundo. Entretanto, as denominações das alegações, bem como os critérios para sua aprovação variam de acordo com a regulamentação local ou regional (STRINGHETA et al., 2007).

No Brasil, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento funcional é “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

Os atributos dos alimentos funcionais incluem redução do risco de doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, obesidade, osteoporose e de outras doenças crônicas não transmissíveis. O interesse pelos alimentos funcionais é crescente e tem atraído à atenção dos consumidores a da indústria de alimentos (COSTA; ROSA, 2010).

O Ministério da Saúde, através da ANVISA, regulamenta os alimentos funcionais através da lista de Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais (BRASIL, 2009). Dentre estes alimentos encontram-se os probióticos e prebióticos.

3.2 PROBIÓTICOS

O termo probióticos é definido como “microrganismos vivos que, administrados em quantidades adequadas, conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro”. No entanto, sabe-se que a origem da linhagem é essencial para que os microrganismos probióticos exerçam sua função (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006; FERREIRA, 2012).

De acordo com a *World Health Organization* (2006) para que um microrganismo seja classificado como probiótico para uso humano, devem-se preencher alguns critérios, sendo os principais:

- Origem humana;
- Resistência ao suco gástrico e à bile;
- Resistência aos processos tecnológicos;
- Adesão aos tecidos epiteliais;
- Propriedades não patogênicas;
- Capacidade de persistir no ambiente gastrointestinal;
- Capacidade de influenciar atividades metabólicas;
- Capacidade de modular o sistema imunológico e outras atividades funcionais.

Além disso, para que as bactérias possam atingir os sítios intestinais específicos e exercer sua função, as bactérias probióticas devem apresentar algumas características, além das citadas acima, tais como: resistência à lisozima; resistências às condições de processamento e armazenamento; concentração adequada no momento do consumo; e capacidade de agregação (FERREIRA, 2012).

Os probióticos potenciais precisam ter boas propriedades tecnológicas para que possam ser cultivados em grande escala; ter uma vida de prateleira aceitável, tolerância aos aditivos e processamentos industriais; contribuir com um bom sabor, aroma e textura e; garantir o processo fermentativo, evitando problemas de contaminação (OUWEHAND et al., 2002; FERREIRA, 2012).

Segundo Ferreira (2012), para o emprego de bactérias probióticas em produtos lácteos ou não lácteos, é necessário saber qual é a melhor estirpe a ser utilizada e o processamento desses produtos, para isso, alguns fatores podem ser citados para o direcionamento da escolha da estirpe, são eles:

- Adequação da cultura levando em conta o público-alvo: criança/adulto/idoso;
- Funcionalidade esperada, nicho ecológico da espécie, relacionada ao intestino grosso/delgado;
- Sobrevivência na matriz alimentar;
- Produção de ácido na taxa esperada, ou ser carregada na forma concentrada;
- Ausência de alteração do sabor e textura característicos do produto;
- Tolerância à acidez do produto e às rápidas alterações de pH após a ingestão;
- Tolerância às concentrações de bile e à presença de outras secreções intestinais.

As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais comumente usadas como probióticos, mas o fermento *Saccharomyces cerevisiae*, e algumas espécies de *Bacillus*, *Pediococcus* e *Lactococcus* também são utilizados como probióticos (Quadro 2). As bactérias ácido-lácticas, entre as quais se encontra a espécie *Lactobacillus* que fora utilizada para a conservação de alimentos por fermentação durante milhares de anos, podem exercer uma função dupla, atuar como agentes fermentadores dos alimentos e também gerar efeitos benéficos à saúde (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2011).

Embora o número específico de microrganismos não tenha sido mencionado na definição de probióticos proposta pela *World Health Organization* (2006), a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2009), preconiza que o produto deverá ser eficaz no carreamento de cultura, cuja quantidade mínima viável de bactérias nos alimentos probióticos deverá estar entre a faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Valores menores podem ser aceitos, desde que seja comprovada a sua eficácia.

Estudos têm demonstrado que o consumo de probióticos deve ser diariamente, pois eles não colonizam o intestino e desaparecem do TGI quando o consumo é interrompido (ALANDER et al., 1999).

A interação normal entre as bactérias intestinais e seu hospedeiro é uma relação simbiótica. A presença de um grande número de estruturas linfóides organizadas na mucosa do intestino delgado (placas de *Peyer*) sugere que as bactérias intestinais têm uma importante influência sobre a função imune. Seu epitélio está especializado em capturar e fazer amostragem de antígenos, e contém centros germinais linfóides para a indução de respostas imunes adaptativas. No cólon, os microrganismos proliferam fermentando os substratos disponíveis da dieta ou as secreções endógenas (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2011).

Desta forma, os probióticos afetam as bactérias intestinais aumentando o número de bactérias anaeróbias benéficas e diminuindo a população de microrganismos potencialmente patogênicos. Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa e os não imunes através de um antagonismo e concorrência com os patogênicos potenciais. Pensa-se que esses fenômenos conduzem a efeitos benéficos, inclusive a redução da incidência e

gravidade da diarreia, a patologia que mais se beneficia do uso de probióticos (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2011).

De acordo com Ferreira (2012), as bactérias lácticas probióticas podem ser adicionadas, basicamente, de três formas:

- a. Como componente do fermento: espera-se que nessa situação o microrganismo probiótico cresça nos parâmetros tempo/temperatura, nas condições de processamento e estocagem praticadas, atingindo ou mantendo populações esperadas no produto, necessárias para a sua funcionalidade. É necessária a seleção de estirpes para que não haja o acúmulo de ácido acético, e dessa forma não interfira no gosto e aroma do produto;
- b. Adição da cultura probiótica concentrada junto com o fermento: no início do processamento: nessa situação geralmente as condições tempo/temperatura de processamento não favorecem o crescimento do microrganismo probiótico, por isso sua adição na forma concentrada, e o produto atua como carreador. Os parâmetros de processamento e manutenção devem ser avaliados para que os números de microrganismos probióticos sejam mantidos até o momento de consumo e suficientes para inferir a funcionalidade esperada;
- c. Adição da cultura probiótica concentrada após a fermentação: antes do envase: é uma prática comum no processamento de produtos probióticos fermentados, e neste caso espera-se também que o produto seja carreador e que a viabilidade dos microrganismos probióticos não seja comprometida durante a vida de prateleira do produto.

Quadro 1: Benefícios promovidos pelos probióticos aos hospedeiros.

Probióticos	
Benefícios imunológicos	<p>Ativar os macrófagos locais para aumentar a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e aumentar a produção de imunoglobulina A secretória (IgA) tanto local quanto sistemicamente</p> <p>Modular os perfis das citocinas</p> <p>Induzir a hipo-resposta aos antígenos alimentares</p>
Benefícios imunológicos	<p>não</p> <p>Digerir os alimentos e concorrer com os patógenos pelos nutrientes</p> <p>Alterar o pH local para criar um ambiente local desfavorável aos patógenos</p> <p>Produzir bacteriocinas para inibir os patógenos</p> <p>Fagocitar os radicais superóxidos</p> <p>Estimular a produção epitelial de mucina</p> <p>Aumentar a função da barreira intestinal</p> <p>Concorrer por aderência com os patógenos</p> <p>Modificar as toxinas de origem patogênica</p>

Fonte: WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (2011).

Quadro 2: Exemplos de microrganismos probióticos de leites fermentados

Gênero	Espécie microbiana
Lactobacillus	<i>L. acidophilus</i> <i>L.acidophilus linhagens LC1, La5, La1, La7, Gilliland</i> <i>L. casei linhagens Shirota, Imunitass, NCC208</i> <i>L.rhamnosus GG</i> <i>L.johnsonii</i> <i>L.helveticus</i> <i>L.delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>L.gasseri</i> <i>L. plantarum</i> <i>L.paracasei ssp. paracaseie ssp.tolerans</i> <i>L.reuteri</i> <i>L.brevis</i> <i>L.cellobiosus</i> <i>L.fermentum</i> <i>L.curvatus</i> <i>L.lactis</i>
Bifidobacterium	<i>B.bifidum</i> <i>B.breve</i> <i>B. longum</i> <i>B.adolescentis</i> <i>B infantis</i> <i>B.animalis</i> <i>B.thermophilum</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>P.acidilactici</i>
	<i>Propionibacterium shermanii</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lac. lactis cremoris</i> <i>Lc.lactis ssp.lactis</i> <i>Lc. lactis diacetylactis</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardii</i> <i>S. cerevisiae</i>
	<i>Bacillus sp</i>
	<i>Aspergillus sp.</i>

Fonte: TAMIME (2002); PARVEZ, et al.(2006); COSTA; ROSA (2010).

3.3 PREBIÓTICOS

Segundo a *World Gastroenterology Organisation* (2011) “os prebióticos são ingredientes não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro pelo estímulo seletivo do crescimento e/ou atividade de uma ou de um número limitado de bactérias no cólon”.

É necessário observar algumas características quando se seleciona um prebiótico, que são elas (COSTA; ROSA, 2010):

- Não deve ser hidrolisado nem absorvido na parte superior do trato digestório.
- Deve ser seletivo para uma quantidade limitada de microrganismos habitantes no cólon.
- Deve alterar essa microbiota, tornando-se mais saudável para o hospedeiro.

Existem diversos prebióticos utilizados na indústria de laticínios são eles: dissacarídeos: lactulose e lactitol; oligossacarídeos: fruto-oligossacarídeos (FOS), galactolacto-oligossacarídeos (GOS), oligossacarídeos de soja e inulina; outros oligossacarídeos produzidos comercialmente: isomalto-oligossacarídeos, xylo-oligossacarídeo, lactossacarose, palatinose; polissacarídeos: amido resistente (COSTA; ROSA, 2010; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2011; FERREIRA, 2012).

Quadro 3: Benefícios promovidos pelos prebióticos.

Prebióticos	
Benefícios	<p>Efeitos metabólicos: produção de ácidos graxos de cadeia curta.</p> <p>Absorção de íons (Ca, Fe, Mg)</p> <p>Aumentar a imunidade do hospedeiro (produção de IgA, modulação de citocinas, etc.)</p>

Fonte: WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (2011).

3.4 SIMBIÓTICOS

Os simbióticos são definidos como “ingredientes e/ou alimentos que contêm ambos os componentes, probióticos e prebióticos”. Portanto, os simbióticos proporcionam ação conjunta de prebióticos e probióticos podendo ser classificados como componentes dietéticos funcionais que podem aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato digestório superior, pelo fato do seu substrato específico estar disponível para fermentação (GIBSON; ROBERFROID, 1995; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION, 2011).

3.5 KEFIR

3.5.1 Histórico

O kefir é uma bebida refrescante, estima-se que a origem dessa bebida remonte a mais de 2000 a. C. nas montanhas do Cáucaso, na Rússia, entre o Mar Negro e o Mar Cáspio. A palavra Kefir, de origem turca, é derivada de *keif*, que significa sentir-se bem. As tribos muçulmanas consideravam o kefir um presente de Alá e, por isso, não permitiam que outros povos, principalmente não muçulmanos, tivessem acesso a ele. Isso fez com que, durante muitos anos, o conhecimento a respeito desse alimento não fosse difundido para o restante do mundo (GORSKI, 1994 apud COSTA; ROSA, 2010; LOPITZ – OTSOA et al., 2006).

No fim do século XIX, uma expedição russa foi à região do Cáucaso com a finalidade de conseguir grãos de kefir e utilizá-los no tratamento de doença, como a tuberculose, em casa de saúde, pois já se falava em propriedades “milagrosas” atribuídas ao produto. Em 1908, o produto chegou a Moscou, e começou a ser difundido para outras regiões. Ao longo dos anos, o consumo de kefir ficou restrito aos indivíduos que tinham grãos em suas residências e os utilizavam, repetindo sucessivamente o processo. Atualmente, o produto é encontrado nos comércios dos países como Rússia, Turquia, EUA, Canadá e França (SANTOS, J.,2008). No Brasil, não é encontrado em forma industrializada, porém, seu consumo artesanal é bastante difundido (COSTA; ROSA, 2010).

3.5.2 Definição

O kefir é um leite fermentado produzido a partir da incubação dos grãos de kefir (cultura *starter*) ou de fermento, geralmente em leite, tais como: de vaca, cabra, ovelha ou búfala. Além disso, tem sido reportado o uso de extrato hidrossolúvel de soja para obtenção do kefir (ABRAHAM; DEANTONI, 1999; LIU; LIN, 2000; BRASIL, 2007; COSTA; ROSA, 2010).

Apresenta as seguintes características sensoriais: um leve sabor ácido e refrescante, devido à formação de ácido láctico e ácido acético; sabor alcoólico, devido à produção de etanol; uma efervescência devida ao gás produzido (CO₂); aroma moderado de levedura fresca; consistência cremosa e uniforme (ABRAHAM; DEANTONI, 1999; ORDÓÑEZ, 2005; LOPITZ – OTSOA et al., 2006; COSTA; ROSA, 2010).

3.5.3 Grãos de kefir

Os grãos de kefir, são grânulos gelatinosos de forma irregular, com coloração branca ou levemente amarela, apresentam aspecto de couve-flor e o tamanho varia de 2- 3 cm de diâmetros (MARSHALL, 1993; GARROTE et al., 2001).

Segundo a definição da *Food and Agriculture Organization/ World Health Organization* (2001), os grãos de kefir são uma mistura complexa de bactérias (*Lactobacillus kefiri* e espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*), além de leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) que apresentam uma associação forte e específica.



Figura 1. Grãos de kefir (acervo pessoal)

3.5.4 Composição centesimal dos grãos de kefir

A composição centesimal dos grãos de kefir varia de acordo com a sua origem. Grãos de kefir originários da Rússia, Iugoslávia e Bulgária contêm aproximadamente 90% de água, 3,2% de proteína, 0,3% de lipídios, 5,8% de substâncias solúveis não-nitrogenados e 0,7% de cinzas (OTOGALLI et al., 1973 apud ZOURARI; ANIFANTAKINS, 1988). Valores similares foram encontrados em grãos de kefir originários da Suécia (BOTTAZZI et al., 1994 apud GARROTE et al., 2001). Entretanto, grãos de kefir originários da Argentina apresentaram 83% de água, 9-10% de polissacarídeos e 4,5% de proteína (ABRAHAM; DE ANTONI, 1999).

3.5.5 Microbiota dos grãos de kefir

Em geral, os grãos de kefir apresentam um predomínio de bactérias ácido-láticas (10^8 - 10^9 UFC/mL), seguido de leveduras (10^5 - 10^6 UFC/mL) e bactérias ácido-acéticas (10^5 - 10^6 UFC/mL). Porém, as condições de fermentação podem afetar esse padrão (KOROLEVA, 1991; GARROTE et al., 2001). Em relação às bactérias ácido-láticas, Garrote et al. (1997) observaram que a microflora dos grãos de kefir apresentam (78,3%) de lactobacilos e (0,9%) de lactococos.

As leveduras colonizam a superfície dos grãos de kefir, enquanto que os lactobacilos e lactococos podem ser encontrados na superfície e no seu interior (DUITSCHAEVER et al., 1988; NEVE, 1992; REA et al., 1996).

Embora ainda não tenha sido totalmente elucidada a composição microbiológica dos grãos do kefir, muitos estudos relatam que a sua constituição é muito variável e depende de sua origem (BERGMANN et al., 2010). Nos Quadros 4 e 5 são descritas as principais leveduras e bactérias encontradas nos grãos de kefir em diversos estudos.

3.5.6 Produção do kefir

O kefir pode ser produzido a partir dos grãos (cultura *starter*) ou de fermento. Esse fermento pode ser parte da própria bebida pronta. Para a produção com os grãos são inoculados de 2% - 10% (m/v) ou com fermento são adicionados em torno

de 3% (m/v), ao leite que é mantido por cerca de 24 horas à temperatura entre 20° C a 25° C (ASSADI; POURAHMAD; MOAZAMI, 2000; HERTZLER; CLANCY, 2003; LOPITZ-OTSOA et al.,2006; COSTA; ROSA, 2010; BERGAMANN et al.,2010).

Quando são utilizados os grãos, estes devem ser recuperados em uma peneira de plástico. O produto coagulado, sem os grãos, é então maturado sob refrigeração (5° C a 10° C) por 24 a 48 horas (GARROTE et al., 1997).

Durante o processo de fermentação os diferentes microrganismos presentes nos grãos de kefir estarão ativos em fases distintas. As bactérias das espécies de lactococos irão se desenvolver primeiro, contribuindo para o aumento da acidez durante as primeiras horas de fermentação. A acidez mais alta irá propiciar condições para o crescimento de lactobacilos. Leveduras, bactérias do ácido acético e as produtoras de aroma têm um crescimento mais lento e irão conferir as suas características ao longo da sua maturação, que ocorre na fase de refrigeração, desta forma, limitando a sua vida de prateleira (REA et al., 1996; COSTA; ROSA, 2010).

Quadro 4: Leveduras associadas aos grãos de kefir

Leveduras	Citação
<i>Candida friedricchii</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Candida kefir</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Garrote et al.,2001
<i>Pichia fermentans</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ângulo et al., 1993; Garrote et al., 1997
<i>Saccharomyces lipolytic</i>	Garrote et al., 1997; Golowczyc et al., 2009
<i>Saccharomyces unisporus</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Ângulo et al., 1993

Fonte: Adaptado pelo autor (2014).

Quadro 5. Bactérias associadas aos grãos de kefir

Bactérias	Citação
<u>Lactobacilli:</u>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Lactobacillus brevis</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Lactobacillus casei</i>	Ângulo et al., 1993
▪ <i>ssp. rhamnosus</i>	
▪ <i>ssp. tolerans</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ângulo et al., 1993
▪ <i>ssp.lactis</i>	
▪ <i>ssp.bulgaricus</i>	
<i>Lactobacillus fermentus</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Miguel et al., 2010
<i>Lactobacillus kefir</i>	Ângulo et al., 1993; Takizawa et al., 1998; Garrote et al., 2001; Golowczyc et al., 2009; Miguel et al., 2010;
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	
▪ <i>ssp. kefiranofaciens</i>	Takizawa et al., 1998
▪ <i>ssp. kefirgranum</i>	
<i>Lactobacillus kefiri</i>	Miguel et al., 2010
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Ângulo et al., 1993; Miguel et al., 2010;
▪ <i>ssp. paracasei</i>	
<i>Lactobacillus parakefir</i>	Garrote et al., 1997; Takizawa et al., 1998; Garrote et al., 2001; Miguel et al., 2010
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Garrote et al., 2001; Miguel et al., 2010
<i>Lactobacillus satsumensis</i>	
<i>Lactobacillus viridescens</i>	Miguel et al., 2010 Ângulo et al., 1993
<u>Outras bactérias:</u>	
<i>Acetobacter aceti</i>	Ângulo et al., 1993
<i>Acetobacter syzygii</i>	Miguel et al., 2010
<i>Lactococcus lactis</i>	
▪ <i>ssp. lactis</i>	Garrote et al., 2001
▪ <i>ssp.lactis biovar diacetylactis</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Garrote et al., 2001
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Ângulo et al., 1993

Fonte: Adaptado pelo autor (2014).

3.5.7 Fermentação láctica

A fermentação láctica ocorre devido à presença de bactérias ácido lácticas (BAL) - lactococos, lactobacilos, leuconostoc e bifidobactérias - presentes nos produtos derivados do leite – que são capazes de fermentar os carboidratos por duas vias: homofermentativa e heterofermentativa (ORDOÑEZ, 2005).

As diferenças nos produtos finais da metabolização da glicose apresentadas pelas bactérias homo e heterofermentativas são resultados das diferenças genéticas e fisiológicas dessas bactérias (JAY, 2005).

O mecanismo de ação inicia com o transporte da lactose para o interior das BAL por meio do transporte ativo com a ajuda da uma permease (PS), utilizada por *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.* e *St. thermophilus*, ou pelo sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase (PEP/PTS), utilizado pelas espécies do gênero *Lactococcus*. No sistema PS, a lactose ingressa no interior da célula sem se modificar, enquanto no sistema PEP/PTS entra fosforilada (ORDOÑEZ, 2005).

Durante o processo fermentativo, a lactose é desdobrada em glicose e galactose por ação enzimática da β -galactosidase presente nas BAL. Na fermentação láctica homofermentativa, as BAL (gênero *Lactococcus* e algumas espécies do gênero *Lactobacillus*) possuem as enzimas aldolase e hexose isomerase e metabolizam a glicose pela via Embden Mayerhof (Figura 2), e o metabólito final majoritário da fermentação, em torno de 98% da lactose utilizada, é o ácido láctico, sendo formado quatro moléculas ácido láctico para cada molécula de lactose (JAY, 2005; ORDOÑEZ, 2005).

Por sua vez na fermentação láctica heterofermentativa, as BAL (algumas espécies do gênero *Lactobacillus* e do gênero *Leuconostoc*) possuem a enzima fosfocetolase e degradam a glicose pela via fosfatos de pentoses (Figura 3), com produção de ácido láctico (duas moléculas para cada lactose), dióxido de carbono, ácido acético e o etanol (ORDOÑEZ, 2005).

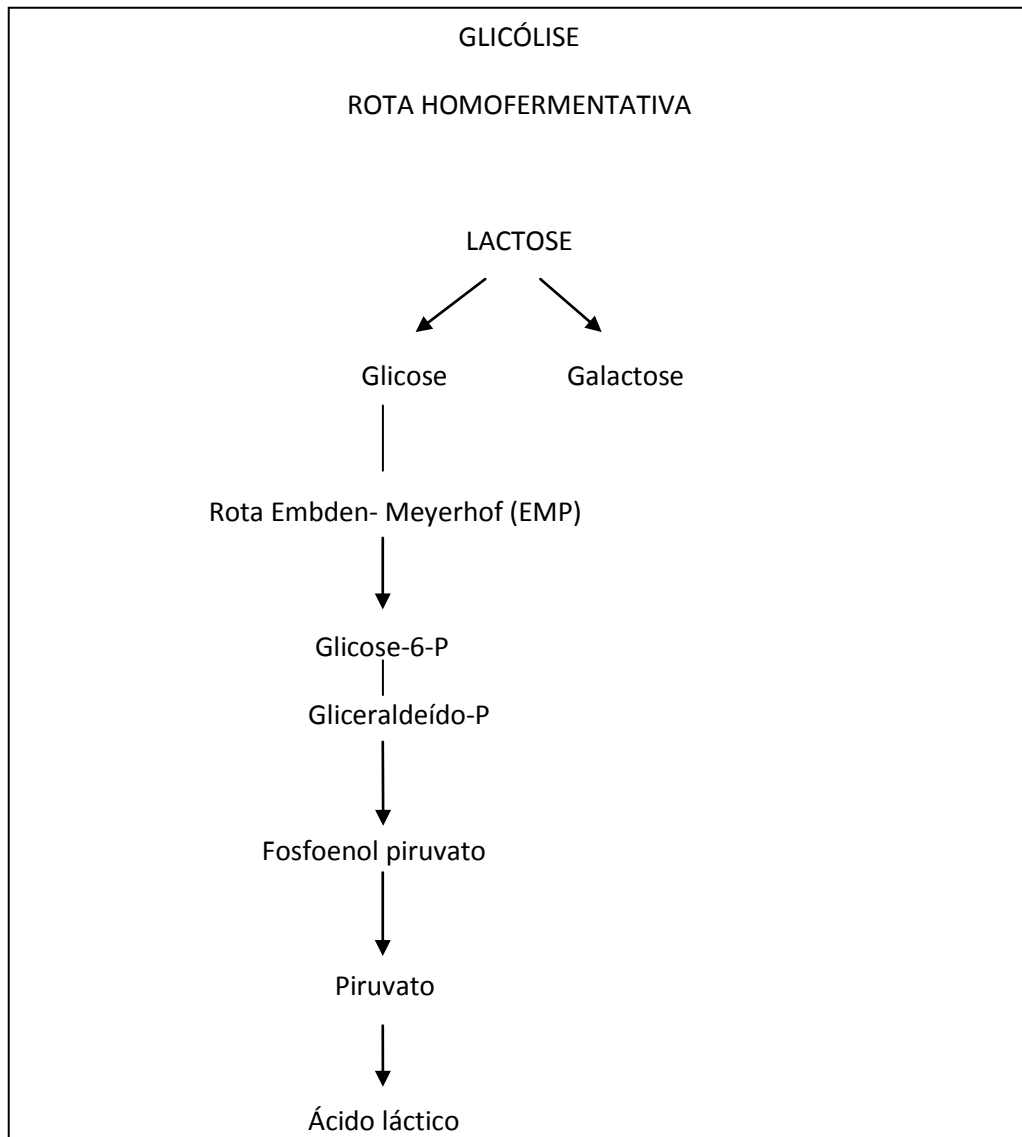


Figura 2. Rota glicolítica homofermentativa adaptada (ORDOÑEZ, 2005)

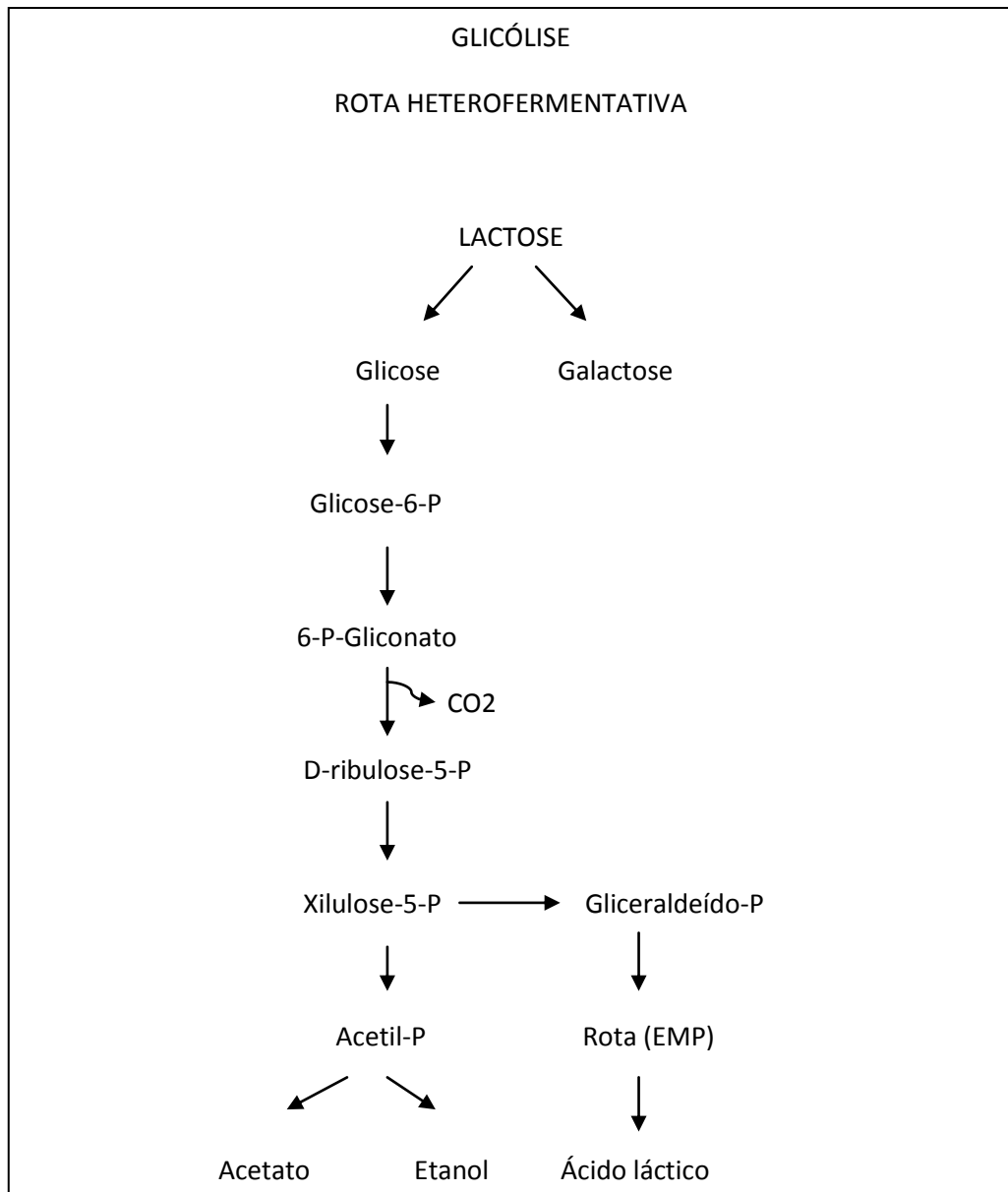


Figura 3. Rota glicolítica heterofermentativa adaptada (ORDOÑEZ, 2005)

3.5.8 Fermentação alcoólica

Na fermentação alcoólica ocorre a produção de etanol e dióxido de carbono (CO_2) nos produtos lácteos, principalmente no kefir, devido à associação de microrganismos capazes de metabolizar a lactose (AQUARONE, 2001 apud CARNEIRO, 2010).

As leveduras, principalmente do gênero *Saccharomyces*, em condições de anaerobiose apresentam o crescimento lento e o piruvato produzido durante o catabolismo da glicose é transformado em acetaldeído e dióxido de carbono. O acetaldeído é então reduzido a etanol pela ação da enzima álcool desidrogenase. A reação geral produz duas moléculas de etanol e dióxido de carbono para cada molécula de glicose consumida (CRUEGER; CRUEGER, 1993 apud CARNEIRO, 2010).

3.5.9 Características físico-químicas da bebida

De acordo com Garcia et al. (1984), a composição físico-química do kefir pode variar conforme a idade dos grãos, as matérias-primas utilizadas, a microbiota e a tecnologia utilizada no processamento.

O kefir tradicional possui 89-90% de umidade, 0,2% de lipídios, 3,0% de proteína, 6,0% de açúcar, 0,7% de cinzas (OZER; OZER, 1999 apud SARKAR, 2007). Segundo Beshkova et al.(2002), kefir tradicional fresco apresentou as seguintes características: pH de 4,50; cerca de $8,18 \text{ g/L}^{-1}$ de ácido láctico; álcool de 0,25 (%m/m); CO_2 de $1,05 \text{ g/L}^{-1}$ e viscosidade de 1,071.

Além disso, o kefir contém diversos compostos com propriedades aromáticas tais como: acetaldeído, diacetil, acetona, acetato de etilo, butanona, ácidos pirúvico, acético, propiônico e butírico (GUZEL-SEYDIM et al., 2000; BESHKOVA et al., 2003; SARKAR, 2007). Estudo realizado por Beshkova et al. (2003) relatou as seguintes concentrações dos compostos aromáticos no kefir tradicional fresco: acetaldeído de $9,10 \mu\text{g}^{-1}$; acetona de $0,60 \mu\text{g}^{-1}$; acetato de etilo de $0,02 \mu\text{g}^{-1}$; butanona de $0,06 \mu\text{g}^{-1}$; diacetil de $1,08 \mu\text{g}^{-1}$; etanol de $2998,0 \mu\text{g}^{-1}$.

O acondicionamento do kefir pode afetar a concentração dos compostos aromáticos. De acordo com Guzel-Seydim et al. (2000), o kefir acondicionado a 4°C por 21 dias apresentou redução nas concentrações de etanol de 0,08%, acetaldeído de 11 µg/g e um declínio em acetoína de 16 µg/g. Entretanto, diacetil não foi detectado durante a fermentação ou acondicionamento.

Segundo a Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007) em geral os leites fermentados devem apresentar as seguintes características físico-químicas apresentados no Quadro 6.

Quadro 6: Características físico-químicas dos leites fermentados

Produto	Matéria Gorda Láctea (g/100g)*	Acidez (g ác. Láctico/100g)	Proteínas Lácteas (g/100g)*
Com creme	Mín. 6,0	0,6 a 2,0	Mín. 2,9
Integral	3,0 a 5,9	0,6 a 2,0	Mín. 2,9
Parcialmente desnatado	0,6 a 2,9	0,6 a 2,0	Mín. 2,9
Desnatado	Máx. 0,5	0,6 a 2,0	Mín. 2,9

Fonte: (BRASIL, 2007)

* Os leites fermentados com agregados, açucarados e/ou saborizados poderão ter conteúdo de matéria gorda e proteínas inferiores, não devendo reduzir-se a uma proporção maior do que a porcentagem de substâncias alimentícias não lácteas, açúcares acompanhados de glicídios (exceto polissacarídeos e polialcoóis) e/ou amidos modificados e/ou maltodextrina e/ou aromatizante / saborizante adicionados.

Ainda segundo a IN nº46 do MAPA (BRASIL, 2007), considerando as características físico-químicas, o kefir deve seguir, em particular, os requisitos apresentados no Quadro 7.

Quadro 7: Características físico-químicas, particulares, do kefir:

Características físico-químicas	Valor de referência
Acidez (g de ác. láctico/100g)	< 1,0
Etanol (% v/m)	0,5 a 1,5

Fonte: (BRASIL, 2007)

3.5.10 Contagem de microrganismos na bebida

Em relação à contagem de microrganismos específicos, o kefir deverá apresentar os seguintes requisitos apresentados no Quadro 8, durante o prazo de validade (BRASIL, 2007).

Quadro 8: Contagem de microrganismos específicos presentes no kefir:

Contagem de microrganismos	Valor de referência
Contagem de bactérias lácticas (UFC/g)	Mín. 10^7
Contagem de leveduras específicas (UFC/g)	Mín. 10^4

Fonte: (BRASIL, 2007)

3.5.11 Tratamento térmico, condições de comercialização e acondicionamento

Os leites fermentados não deverão ter sido submetidos a qualquer tipo de tratamento térmico após a fermentação. Pois o objetivo é que os microrganismos dos cultivos utilizados permaneçam viáveis, ativos e em concentração igual ou superior à definida pela legislação (no produto final e durante seu prazo de validade). A temperatura de conservação e comercialização não deve ser superior a 10°C e, estes produtos devem ser envasados com materiais adequados que não sofram alterações a esta temperatura, de forma a conferir ao produto uma proteção adequada (BRASIL, 2007).

3.5.12 Características nutricionais

O kefir é fonte de vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais que auxiliam na manutenção e funcionamento do corpo humano. O teor de vitaminas do kefir é influenciado pelo tipo de leite e pela microbiota dos grãos de kefir devido à síntese de vitaminas pelos próprios grãos (SARKAR, 2007; FERREIRA, 2012).

Desta forma, é considerado uma boa fonte de vitaminas do complexo B, principalmente B1, B6 e B12, que apresentam numerosos benefícios que incluem atuação no fígado e sistema nervoso, auxílio no tratamento de pele, aumento de energia, entre outros (MAHAM; ESCOTT-STUMP, 2010). Além de ser rico em vitamina K a qual desempenha papel essencial na coagulação sanguínea (SARKAR, 2007; MAHAM; ESCOTT-STUMP, 2010).

Em relação ao teor de proteína, durante a fermentação do leite as proteínas são metabolizadas, sendo facilmente utilizadas pelo organismo. Além disso, há uma mudança no perfil de aminoácidos e aumento da quantidade de treonina, serina, alanina, lisina e amônia (GUZEL-SEYDIM et al., 2003; SARKAR, 2007). Liut Kevicius; Sarkinas (2004) estudaram o perfil de aminoácidos do kefir mostrando a presença de valina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, fenilalanina e triptofano.

Ademais, o kefir é fonte de diversos macroelementos, tais como: potássio, cálcio, magnésio, fósforo e microelementos, tais como: cobre, zinco, ferro, manganês, cobalto e molibdênio (LIUT KEVICIUS; SARKINAS, 2004).

3.5.13 Kefir: Alimento funcional

A área de alimentos funcionais tem atraído um grande interesse, devido ao reconhecimento de que muitos alimentos contêm compostos bioativos que oferecem benefícios para a saúde ou resistência às doenças. Um subconjunto dos alimentos funcionais, alimentos probióticos, é a partir do qual existem várias fontes possíveis de compostos bioativos. Os próprios microrganismos, os metabólitos dos microrganismos formados durante a fermentação ou produtos de degradação da matriz dos alimentos, tais como péptidos, podem ser responsáveis por estes efeitos benéficos (OUWEHAND; SALMINEN, 1998). Kefir tem uma longa tradição de oferecer benefícios de saúde, especialmente na Europa Oriental (HALLÉ et al., 1994

apud FARNWOTH, 2005). Existem diversos compostos de kefir que apresentam propriedades bioativas (FARNWOTH, 2005).

3.5.13.1 Compostos bioativos

- Kefiran

Exopolissacarídeos de diferentes estruturas e composições são produzidos por uma variedade de bactérias de ácido láctico incluindo *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* (DE VUYST et al., 2001; RUAS-MADIEDO et al., 2002). Nos produtos alimentares, os exopolissacarídeos, frequentemente, contribuem para as características organolépticas e de estabilidade. O principal polissacarídeo encontrado nos grãos de kefir é o kefiran, porém os grãos podem conter outros exopolissacarídeos (FARNWOTH, 2005).

O kefiran circunda as bactérias e leveduras presentes nos grãos de kefir, sendo, portanto, responsável por manter a microbiota presa à matriz que será multiplicada, perpetuando, assim, a microbiota presente nos grãos (LOPITZ – OTSOA et al., 2006; COSTA; ROSA, 2010). Sendo constituído por moléculas de D-glicose e D-galactose em uma proporção de 1:1 (Figura 4), composto por uma unidade de pentassacarídeo ligado a um ou dois resíduos de açúcar formando hexa – ou heptassacarídeo (KOOIMAN, 1968; MICHELI et al., 1999). As principais bactérias produtoras do kefiran são *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir* e *Lactobacillus kefiranofaciens* (WANG, S. et al., 2008; COSTA; ROSA, 2010).

A produção do kefiran pelas BAL é otimizada por meio do controle das condições de fermentação e modificação da composição do leite. Estudos têm demonstrado que a temperatura de fermentação (25° C), a velocidade de agitação (80 rpm), e as escolhas das fontes de carboidratos (lactose), fontes de proteína, vitaminas (tiamina) e minerais (FeCl₃) e condição de aerobiose são fatores que aumentam a produção de kefiran. Além da combinação de BAL com leveduras não fermentadoras de lactose, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, devido à assimilação de ácido láctico, que por sua vez contribui estimulando o crescimento das BAL e produção de kefiran (CHEIRSILP et al., 2003; ZAJŠEK et al., 2013).

Além disso, o kefiran apresenta propriedade de dissolução lenta em água fria e rápida em água quente, e forma uma solução viscosa com uma concentração

de 2% (LA RIVIÉRE et al., 1967 apud FARNWOTH, 2005). Desta forma, contribui para a atividade reológica e textura do produto, além de pode ser usado como aditivo para produtos não lácteos, pois atua como agente espessante, geleificante, estabilizador e emulsificante (SHIOMI et al., 1982 apud CHEIRSILP et al., 2003; ZAJŠEK et al., 2013).

Ademais, estudos relatam que o exopolissacarídeo kefiran, apresenta propriedades benéficas à saúde, tais como: propriedades antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante e imonumoduladora (SHIOMI et al., 1982 apud AHMED et al., 2013; VINDEROLA et al., 2006b; VINDEROLA et al., 2006c; UCHIDA et al., 2010).

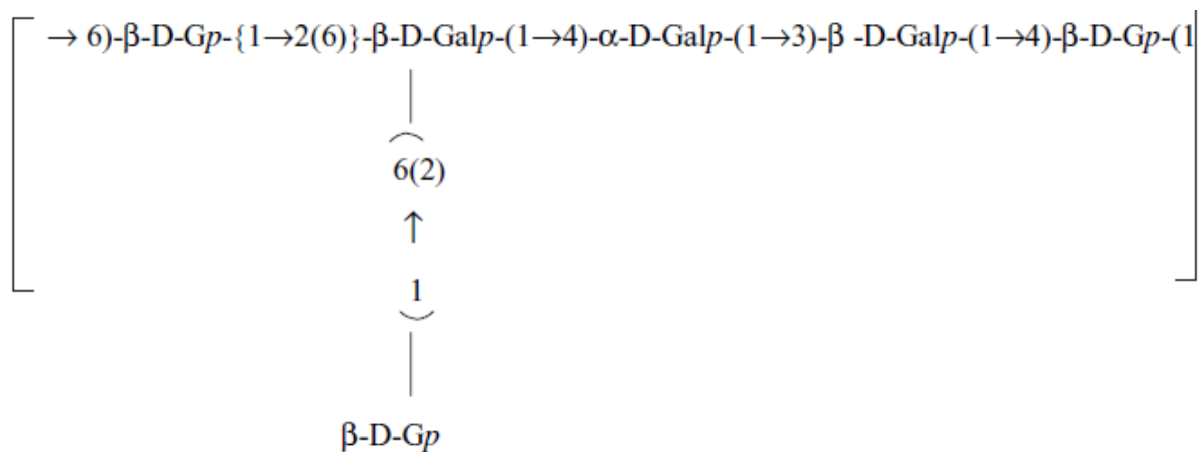


Figura 4. Estrutura química da molécula de kefiran (KOOIMAN, 1968).

- Peptídeos bioativos

Os microrganismos presentes no kefir possuem enzimas capazes de hidrolisar as proteínas, como por exemplo, proteases e peptidases, desta forma, ajudam no crescimento dos microrganismos devido à liberação de peptídeos e aminoácidos (ORDOÑEZ, 2005).

As ações das enzimas proteases e peptidases na proteína do leite resultam na produção de diversos tipos de peptídeos bioativos. Um estudo realizado por Yüsekdağ et al. (2004) apud Farnwoth (2005), mostrou que 13 das 21 estirpes de lactococos, proveniente do kefir, tinham atividade proteolítica mensurável.

Recente estudo realizado por Paul; Somkuti (2010), demonstrou que peptídeos bioativos, como por exemplo, a lactoferricina, proveniente da hidrólise da

lactoferrina por BAL, apresentam potencial de ingredientes alimentares funcionais que podem ser utilizadas pela indústria alimentar, em uma variedade de aplicações.

- Substâncias antimicrobianas produzidas pelo kefir

Devido à microbiota constituinte dos grãos de kefir, são produzidas diversas substâncias inibidoras que atuam sobre microrganismos patogênicos associados às doenças de origem alimentar. Dentre essas substâncias estão os ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (COSTA; ROSA, 2010).

Os ácidos orgânicos são as formas não dissociadas dos ácidos láctico e acético, formados pela ação de BAL durante o processo de fermentação. A ação dos ácidos ocorre devido sua capacidade de penetrar na membrana celular e promover acidificação do citoplasma e degradação de enzimas, conseqüentemente, promove o acúmulo de sais associados à modificação da permeabilidade da membrana (PIARD; DESMAZEAUD, 1992).

Outro metabólito produzido pelas BAL que também contribui para o efeito antagônico sobre os microrganismos patogênicos é peróxido de hidrogênio (HELANDER et al., 1997). As BAL produzem esse metabólito como mecanismo de proteção ao oxigênio, por meio da ação das enzimas oxidases ou NADH peroxidases. O acúmulo do peróxido de hidrogênio nos produtos fermentados ocorre pelo fato das BAL não apresentarem a enzima catalase necessária à sua degradação. A ação de metabólito é atribuída ao seu efeito oxidante, mediante a peroxidação dos lipídeos da membrana e destruição da estrutura básica molecular das proteínas celulares (DAESCHEL et al., 1989 apud COSTA; ROSA, 2010).

Por fim as bacteriocinas presentes no kefir são compostos proteicos que apresentam atividade letal sobre outras bactérias. O modo de ação das bacteriocinas ocorre devido à sua interação com a célula em duas etapas. A primeira corresponde à adsorção das moléculas da bacteriocina a um receptor específico ou não específico da superfície celular, sendo reversível por não produzir qualquer dano fisiológico. Na segunda etapa, ocorrem mudanças patológicas irreversíveis em consequência das alterações bioquímicas, como por exemplo, a inibição de energia e biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas (PLATE; LURIA, 1972).

3.5.13.2 Benefícios para saúde

- Intolerância à lactose

A lactose é o principal carboidrato presente no leite, sua hidrólise ocorre pela ação enzima β -galactosidase presente parede intestinal sendo desdobrada em dois monossacarídeos: glicose e galactose.

Na maioria dos mamíferos a atividade da enzima β -galactosidase diminui na parede intestinal após o desmame, desta forma, caracteriza a hipolactasia primária que provoca sintomas da má digestão da lactose (HETZLER; CLANCY, 2003; FERREIRA, 2012).

Há uma diferença entre “má digestão da lactose” e “intolerância à lactose”. A má digestão de lactose é a digestão incompleta da lactose devido à quantidade insuficiente de β -galactosidase no intestino delgado humano. Por sua vez, a intolerância à lactose é caracterizada pela presença de sintomas gastrointestinais, tais como dores abdominais, flatulência, distensão abdominal, náuseas e diarreia, em razão da fermentação, da lactose não digerida, por bactérias com produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e gases, tais como: hidrogênio (H_2), metano (CH_4), dióxido de carbono (CO_2) (HETZLER et al., 1996; HETZLER; CLANCY, 2003).

Indivíduos com intolerância à lactose têm que reduzir ou evitar a ingestão de leite, conseqüentemente, perdem uma importante fonte de cálcio, fósforo e proteína de alto valor biológico (MONTES et al., 1995). No entanto, estudos têm demonstrado que a ingestão de produtos lácteos fermentados é uma estratégia alternativa na terapêutica dessa desordem (SAVAIANO et al., 1984; PELLETIER et al., 2001). Pois durante o processo de fermentação, pelas bactérias ácido lácticas (BAL), dos produtos lácteos ocorre uma diminuição da quantidade de lactose. Segundo um estudo realizado Hertzler et al. (1996), relataram que indivíduos com intolerância à lactose são capazes tolerar produtos lácteos contendo no máximo 6 g de lactose por porção.

Outro fator relevante é que as bactérias ácido lácticas (BAL) apresentam altos níveis de β -galactosidase, por conseguinte, são liberadas no lúmen intestinal quando estas bactérias são lisadas pela ação das secreções biliares. A β -galactosidase,

então, age sobre a lactose não digerida, desta forma, aliviando os sintomas da má digestão que podem ocorrer em decorrência da presença desse carboidrato (TUOHY et al., 2003).

O primeiro estudo que avaliou diretamente o efeito do kefir na digestão da lactose foi realizado por De Vrese et al. (1992), no qual demonstraram melhoria na digestão da lactose ao dosar galactose no plasma sanguíneo de mini porcos alimentados com kefir.

Um estudo realizado em adultos intolerantes à lactose demonstrou que a ingestão de kefir natural melhorou a digestão da lactose tão bem quanto o iogurte natural, parte da explicação para este fato pode ser devido ao elevado nível de atividade da β -galactosidase no kefir, que foi aproximadamente 60% maior do que o iogurte natural. Embora nem todos os microrganismos do kefir possuem atividade da β -galactosidase, por exemplo, a levedura *Saccharomyces florentinus* (DE VRESE et al., 1992), parece que a contagem de células, a atividade da β -galactosidase, e/ou sensibilidade da secreção biliar de outras culturas permanecem elevadas o suficiente para permitir a digestão da lactose (HETZLER; CLANCY, 2003).

- Estímulo do Sistema Imune

O kefir apresenta capacidade imunomoduladora devido aos microrganismos probióticos presentes nele. Os efeitos benéficos exercidos pelos probióticos ocorrem em dois sentidos, diretamente, quando se relacionam com a presença dos próprios microrganismos, ou indiretamente, quando são efetivados por produtos do seu metabolismo (peptídeos e exopolissacarídeos) (VINDEROLA et al., 2006a; COSTA; ROSA, 2010).

Um estudo realizado por Vinderola et al. (2005a) em modelo murino demonstrou que a capacidade imunomoduladora do kefir depende da dose e da viabilidade dos probióticos para afetar a resposta Th1 e Th2 no intestino delgado. Enquanto o kefir induziu uma resposta típica de Th2, desta forma, aumentando o número de IgA, IL4, IL6 e IL 10, o kefir pasteurizado induziu simultaneamente a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), porém sem danos nos tecidos estudados.

Vinderola et al., (2005b) demonstrou que o consumo de kefir está associado ao aumento da atividade fagocitária de macrófagos peritoneais e pulmonares e,

além disso, foi capaz de aumentar a imunidade da mucosa mediada por IgA em locais distantes, principalmente, o tecido brônquico.

Além disso, os produtos do metabolismo dos microrganismos probióticos são capazes de controlar a resposta da mucosa do intestino para a imunidade protetora induzida permitindo, assim, a manutenção da homeostasia interna do intestino para o aumento da produção de IgA e influenciando a imunidade sistêmica através das citocinas liberadas para a circulação sanguínea (VINDEROLA et al., 2006b; VINDEROLA et al., 2006c).

- Efeito antitumoral

Diversos estudos epidemiológicos mostraram que a ingestão de produtos lácteos fermentados podem diminuir o risco de aparecimento de câncer de mama, ovário em mulheres (REDDY et al., 1983 apud AHMED, 2013; VEER et al., 1989; CRAMER et al., 1989). Esta redução do risco de câncer pode ser atribuída à presença de componentes bioativos no leite fermentado (AHMED et al., 2013).

Os componentes bioativos, principalmente, os probióticos, exercem atividade antitumoral por meio de vários mecanismos. Estes incluem supressão do crescimento de tumores por inativação de enzimas, de modo que não ocorra a conversão do pró-carcinógeno em carcinógeno (AHMED et al., 2013), ligação e remoção de substâncias cancerígenas do cólon (TAVAN et al., 2002), imunomodulação de diferentes células, tais como células NK, células dendríticas, células B e células T (LINK - AMSTER et al., 1994 apud GHONEUM; GIMZEWSKI, 2014; HONG et al., 2010) e a indução de apoptose em células de câncer (PERDIGÓN et al., 2002; LEE et al., 2007; IYER et al., 2008; MAALOUF et al., 2011).

Estudos têm relatado que os efeitos antitumorais do kefir ocorrem devido à presença de exopolissacarídeos solúveis em água isolados dos grãos de kefir ou produzidos pelos microrganismos, sendo o mais conhecido o kefiran (SHIOMI et al., 1982 apud AHMED et al., 2013). No entanto, durante o estudo comparativo sobre exopolissacarídeos solúveis e insolúveis em água do kefir, demonstrou que exopolissacarídeos solúveis em água, pareceu mais eficaz para a supressão de tumores (FURUKAWA et al., 2000 apud AHMED et al., 2013) e a sua eficácia contra tumores também melhorou com dosagem mais elevada (MUROFUSHI et al., 1983 apud AHMED et al., 2013).

Além da natureza e dosagem de exopolissacarídeos, a atividade antitumoral, também depende do tipo de microrganismo durante a fermentação, pois estirpes isoladas de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoce* *Streptococcus lactis subsp. cremoris* a partir de kefir têm uma capacidade de se ligar aos mutagênicos ou induzir apoptose nas células cancerígenas (HOSONO et al., 1990 apud AHMED et al., 2013; MIYAMOTO et al., 1991 apud AHMED et al., 2013; LIU et al., 2002; SANTOS, A. et al., 2003; GHONEUM; GIMZEWSKI, 2014).

Furukawa et al. (1990 apud Sarkar (2007), relatou que o consumo de 2g/kg de kefir por camundongos em um período de nove dias foi mais eficaz na inibição do crescimento do tumor (carcinoma pulmonar de Lewis) do que o iogurte.

Um estudo realizado por Ghoneum; Gimzewski (2014), demonstrou o efeito apoptótico de uma mistura composta por *Lactobacillus kefiri* em leucemia mielóide multirresistente humana em células *in vitro*. Os resultados indicam que a indução da apoptose das células cancerosas dependem da dose administrada e sugerem que a mistura composta por *Lactobacillus kefiri* pode atuar como uma terapia potencial para o tratamento de leucemia mielóide multirresistente em humanos.

Outro nutriente que desempenha um papel importante por fornecer atividade antitumoral no kefir e produtos similares é a proteína do leite, especialmente os aminoácidos contendo enxofre (GUZEL-SEYDIM et al., 2003 apud SARKAR, 2007).

Güven et al. (2003), mostraram que camundongos expostos ao tetracloreto de carbono (uma hepatotóxica que induz danos oxidativos) e recebendo kefir por gavagem, tiveram diminuição dos níveis de tumores do fígado e rim, indicando que o kefir agiu como antioxidante. Além disso, o kefir foi mais eficaz do que a vitamina E na proteção contra danos oxidativos.

- Modulação dos níveis de colesterol

Considerável atenção tem sido dada aos níveis de colesterol dos alimentos devido à sua importância de saúde pública, pois níveis elevados estão associados ao maior risco de doenças cardiovasculares (SARKAR, 2007).

Atualmente, diversos estudos relatam diferentes mecanismos para tentar explicar a ação exercida pelas BAL para reduzir o nível de colesterol. Segundo Wang, Y. et al. (2009), as células bacterianas são capazes de fazer ligação direta e incorporação ao colesterol, impedindo a absorção do colesterol pelo organismo.

Além disso, as BAL são capazes de promover a desconjugação dos sais biliares e produzir ácidos biliares livres em função da atividade da enzima hidrolase.

Os ácidos biliares desconjugados são menos solúveis em pH menor que 6 e precipitam, induzindo a uma coprecipitação do colesterol. Desta forma, a coprecipitação do colesterol com ácidos biliares desconjugados pode tornar os ácidos biliares indisponíveis para reabsorção no fígado, sendo, portanto, eliminado nas fezes. Com a eliminação dos ácidos biliares desconjugados, mais colesterol é requerido para síntese de novos sais biliares no fígado, diminuindo, assim, os níveis de colesterol sérico (KLAVER; VAN DER MEER, 1993).

Além disso, as bactérias presentes no intestino são capazes de fermentar carboidratos indigeríveis e produzir os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Por sua vez, os AGCC – acetato, propionato e butirato - alteram a síntese de colesterol hepático (BRIDGES et al., 1992; HARA et al., 1999).

Estudo realizado com ratos alimentados com dieta rica em colesterol e suplementados com *Lactobacillus plantarum* MA2 isolado de kefir apresentaram redução significativa nos níveis séricos de colesterol total, LDLc e triacilgliceróis, enquanto não houve mudança no nível HDLc. Além disso, o colesterol total e triacilgliceróis do fígado também foram reduzidos. Já o colesterol e triacilgliceróis das fezes dos animais aumentaram significativamente (WANG, Y. et al., 2009).

- Propriedades antimicrobianas

Durante o processo de fermentação as BAL, BAA e leveduras são capazes de produzir diversas substâncias antimicrobianas, tais como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos (ácido láctico e ácido acético), peptídeos, bacteriocinas, entre outras (FARNWORTH, 2005; SARKAR, 2007; COSTA; ROSA, 2010).

Os metabólitos presentes no kefir têm a capacidade de inibir o crescimento de patógenos por meio da inibição da aderência, da reprodução e da ação patogênica dos microrganismos invasivos (SAAVEDRA, 1995).

Um estudo realizado por Czamanski et al.(2004) foi observado que o kefir apresenta um maior efeito bacteriostático contra as bactérias Gram-negativo e um melhor efeito bactericida contra Gram-positivo. Este estudo corrobora com um estudo realizado por Garrote et al. (2000) no qual apresentou maior atividade

inibitória do kefir sobre os microrganismos Gram-positivo em relação aos Gram-negativo.

Além disso, estudos têm mostrado que as substâncias antimicrobianas presentes no kefir apresentam atividade inibitória contra *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* (GARROTE et al., 2000; GÜLMEZ; GÜVEN, 2003; SANTOS, A. et al., 2003; CZAMANSKI et al., 2004; ROSSLAND et al., 2005).

3.6 CACAU E CHOCOLATE

3.6.1 Histórico

O cacaveiro é uma planta da família das *Sterculiáceae*. De acordo com a literatura botânica, foi citado pela primeira vez por Charles de L'êcluse que o descreveu com o nome de *Cacao fructus*. Em 1737 foi classificado por Linnaeus com a denominação de *Theobroma fructus*, porém, em 1753 o nome foi modificado para *Theobroma cacao*, denominação que permanece até hoje, no qual significa do grego "alimento dos deuses" (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA, 1978).

Segundo a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (1978), a história do chocolate iniciou-se há séculos com as civilizações asteca e maia. Por volta de 600 a.C, os maias estabeleceram as primeiras plantações de cacau em Yucatan e na Guatemala. O cacau apresentava grande valor comercial nessa região, pois suas sementes eram utilizadas como moeda (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA, 1978).

O povo asteca cultivava o cacau antes da chegada dos europeus ao México. Inicialmente, as sementes do cacau eram utilizadas como ingrediente para preparação de uma bebida amarga. No final do século XV, com a chegada de Cristovão Colombo e Hernan Cortez na América, a bebida passou a ser consumida, por eles, adoçada com açúcar. Com o tempo, os colonizadores já familiarizados com a bebida de cacau, difundiram-na em toda a Europa, porém, seu custo era alto, sendo consumida por pessoas das mais altas classes sociais. Foi somente no século XVII que o consumo de chocolate se espalhou pela Europa, sendo cultivado

e industrializado, adicionado de açúcar e outros componentes tornando-se um alimento amplamente distribuído e aceito no mundo todo (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA, 1978; AFOAKWA, 2008).

3.6.2 Definição

O cacau é a semente do cacauzeiro *Theobroma cacao* L. (e suas variedades) liberta por fermentação do invólucro, dessecada e tostada segundo a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (1978), embora esta legislação não esteja mais vigente. A partir da moagem das sementes e posterior tratamento mecânico é obtida uma massa homogênea, a pasta de cacau. O cacau em pó é definido como produto obtido pela moagem dessa pasta de cacau parcialmente desengordurada. Para que se obtenha cacau solúvel é realizado tratamento do cacau em pó com substâncias alcalinas (CNNPA, 1978).

3.6.3 Chocolate

Atualmente, tem sido relacionado a quantidade de sólidos de cacau à qualidade do produto final, tendo em vista inúmeros estudos que relatam sobre os benefícios à saúde que estão associados aos compostos naturalmente presentes no licor de cacau (CIDELL; ALBERTS, 2006; PIMENTEL, 2007).

Segundo a Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (1978), o chocolate é definido como produto preparado com cacau, obtido por processo tecnológico adequado, e açúcar, podendo conter outras substâncias alimentícias aprovadas. Além disso, o chocolate deve ser classificado como apresentado no Quadro 9.

Os diferentes tipos de chocolate apresentam proporções variáveis do teor de gorduras, carboidratos, proteínas, sendo, portanto, nutricionalmente diferentes. Quanto maior o teor de cacau, maior o teor de compostos benéficos à saúde (AFOAKWA, 2008).

Os antioxidantes presentes no cacau estão presentes também nos diferentes tipos de chocolate, com exceção do chocolate branco, pois este não contém sólidos de cacau. Também é importante notar que o chocolate amargo

contém maior quantidade de flavonoides de cacau do que o chocolate ao leite, devido ao maior teor de cacau (*ibidem*).

3.6.4 Produção e consumo do cacau e chocolate

O cacauero cresce entre os trópicos de Câncer e Capricórnio, com variedades originárias de áreas de floresta da América do Sul. A variedade forasteiro cresce, principalmente, no Brasil e na África, enquanto híbridos prosperaram na Europa Central e América do Sul (AFOAKWA, 2008).

O cultivo do cacau no Brasil iniciou no Estado do Pará, em 1746, posteriormente, começou o cultivo na Bahia, onde apresentou desenvolvimento em bases econômicas (COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA, 1978). Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Chocolate, Cacau, Balas e Derivados (2011), o cacauero exige temperatura sempre superior a 20 graus e, por isso, sua faixa ideal para cultivo, no Brasil, fica entre os Estados do Espírito Santo, Bahia e Rondônia.

Segundo a Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (1978) maior produtor de cacau no Brasil é o sul da Bahia, com 95%, enquanto o Estado do Espírito Santo produz 3,5% e a Amazônia 1,5%. O Brasil é o 5º produtor de cacau do mundo, ao lado da Costa do Marfim, Gana, Nigéria e Camarões. Cerca de 90% de todo o cacau brasileiro é exportado.

A semente é o principal produto comercializado, após fermentação e secagem, para fabricação de chocolate, sob diversas formas. Dela extrai-se a manteiga, muito utilizada na indústria farmacêutica e cosmética, a torta e o pó, utilizados na indústria chocolateira e moageira para fabricação de doces, confeitos e massas. Já a polpa do cacau, rica em açúcares, é utilizada na fabricação de geleia, vinho, licor, vinagre e suco (SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS, 2003).

De acordo com Zugaib et al. (2005), no Brasil, existe cerca de cinco indústrias de processamento de cacau (*Cargill, Joanes, Barry Callebaut, Nestlé e Indeca*) que diferenciam seus produtos em líquido, torta, manteiga e pó, e 57 indústrias de fabricação de chocolate sendo 19 delas de grande porte e 38 de pequeno porte.

Quadro 9: Classificação do chocolate, de acordo com a sua composição

O chocolate, de acordo com a sua composição, é classificado em:	
Chocolate em pó	Produto obtido pela mistura de cacau em pó com açúcar
Chocolate em pó parcialmente desengordurado e chocolate em pó solúvel	Produto obtido pela mistura de cacau em pó parcialmente desengordurado ou cacau solúvel, com açúcar
Chocolate ao leite	Produto preparado com pasta de cacau, açúcar e leite, leite em pó evaporado ou condensado
Chocolate fantasia ou composto	Produto preparado com mistura, em proporções variáveis, de chocolate, adicionado ou não de leite e de outros ingredientes, tais como amêndoa, avelã, amendoim, nozes, mel e outras substâncias alimentícias, que caracterizam o produto
Chocolate "fondant" e chocolate tipo suíço	Produto contendo no mínimo 30% de gordura de cacau
Chocolate recheado moldado	Produto contendo um recheio de substâncias comestíveis, completamente recoberto de chocolate
Chocolate amargo	Produto preparado com cacau, pouco açúcar adicionado ou não de leite
Chocolate cobertura	Produto preparado com menor proporção de açúcar e maior proporção de manteiga de cacau, empregado no revestimento de bombons e outros produtos, de confeitaria

Fonte: CNNPA (1978).

O processamento industrial do cacau para obtenção do chocolate em pó solúvel inicia com a etapa da limpeza, seguida da torrefação, remoção da casca, moagem, alcalinização e prensagem do líquido, pulverização e peneiragem da torta, mistura e adição de ingredientes, embalagem, armazenagem e expedição. As etapas estão descritas no Quadro 10 (SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS, 2003; TEIXEIRA, 2011).

O chocolate está entre os produtos mais consumidos no Brasil e no mundo, apreciado por crianças, adultos e idosos. Segundo o estudo realizado por Vieira (2008), que procurou estabelecer quais eram os critérios de compra e consumo de chocolate, os consumidores desde os jovens até adultos afirmaram que o chocolate lhes proporciona sensação de maior disposição, energia e vigor físico. Outras sensações psicológicas também foram relatadas: prazer, alívio, recompensa e felicidade.

Outro motivo cujo destaque para o consumo mostra-se presente principalmente entre os adultos: as afirmações que o chocolate faz bem à saúde, se consumido sem excessos. Desta forma, o chocolate assume papel de alimento terapêutico e lugar de destaque entre os alimentos. Mesmo as pessoas adultas e idosas, cuja preocupação com a saúde é a maior barreira para o consumo de chocolate, apresentaram-se atentas às novas pesquisas médicas e sentem-se satisfeitas em aliar um produto saboroso com o benefício à saúde (VIEIRA, 2008).

Neste contexto, produtos elaborados com chocolate compartilham preferência dos consumidores, em comparação a outros produtos semelhantes, mas que não levam este ingrediente, não só pelo seu valor nutricional, mas principalmente devido às suas propriedades químicas e físicas percebidas pelos consumidores como propriedades sensoriais únicas. O sabor é um dos atributos sensoriais que contribuem para a singularidade do chocolate (BECKETT, 2000 apud RIBEIRO, 2011).

Quadro 10. Etapas do processamento industrial do chocolate em pó solúvel

Etapas do processamento industrial do chocolate em pó solúvel	
Etapa 1. Limpeza	Ocorre a separação das amêndoas secas das sujidades. As amêndoas isentas de sujidades são transportadas para esterilização em autoclave contínua.
Etapa 2. Torrefação	As amêndoas são torradas e quebradas em pequenos fragmentos denominados <i>nibs</i> .
Etapa 3. Remoção da casca	Os <i>nibs</i> passam por um sistema de separação da casca.
Etapa 4. Moagem	Nesta etapa, os <i>nibs</i> são centrifugados e moídos, sendo transformados em estado líquido devido ao alto teor de gordura (55%) dando origem a uma massa pastosa - o líquor.
Etapa 5. Alcalinização e Prensagem do Líquor	Ocorre a adição de álcalis à massa pastosa, sendo posteriormente esmagada em uma prensa eletromecânica, a partir do que se obtém dois produtos - a manteiga de cacau e a torta de cacau.
Etapa 6. Pulverização e Peneiragem da Torta	A torta de cacau é pulverizada e peneirada, assumindo a forma de chocolate em pó solúvel em água.
Etapa 7. Mistura e Adição de Ingredientes	Adiciona-se, ao pó de cacau solúvel, açúcar e aromatizante artificial, misturando-se bem.
Etapa 8. Embalagem	O pó é acondicionado mecanicamente por máquinas embaladoras em recipientes plásticos de 500g cada e identificados com o número do lote e data de validade; depois, os recipientes plásticos são acondicionados em caixas de papelão com capacidade para 24 unidades cada.
Etapa 9. Armazenagem e Expedição	As caixas são armazenadas por um prazo de até 24 meses após a fabricação em um depósito com umidade relativa do ar abaixo de 70% (utilizando-se desumidificadores), temperatura abaixo de 28°C e livre de insetos, roedores ou produtos com cheiro forte (já que o pó de cacau absorve facilmente umidade e odores)

Fonte: SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS (2003); TEIXEIRA (2011).

3.6.5 Propriedades nutricionais

Atualmente, os produtos de cacau e chocolate têm atraído atenção dos investigadores e consumidores, em função do seu potencial nutricional e de suas propriedades nutricionais (AFOAKWA, 2008).

Estudos têm demonstrado que o cacau *in natura*, alguns produtos de cacau e o chocolate são extraordinariamente ricos num grupo de antioxidantes conhecido como flavonóides, que pertencem a uma ampla e diversa classe de fitoquímicos chamados polifenóis (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

3.6.5.1 Polifenóis presentes no cacau

Os compostos fenólicos são formados a partir do metabolismo secundário de plantas, sintetizados a partir de duas principais vias primárias: via do chiquimato e via do acetato (BRAVO, 1998). Além disso, são distribuídos, dependendo da sua estrutura básica, em classes como fenóis simples, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, xantonas, antraquinonas, flavonoides, lignanas e ligninas, entre outras (BRAVO, 1998; WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

Os principais compostos fenólicos encontrados nas sementes de cacau estão dentro das classes dos taninos e dos flavonoides. Os flavonoides presentes incluem flavanóis, flavonóis, antocianinas, flavonas e flavanonas. Entre estes, os flavanóis são os mais abundantes, sendo a (+)-catequina e a (-)-epicatequina os principais representantes. A (-)-epicatequina tem sido reportada como o principal flavanol monomérico do cacau, representando aproximadamente 35% do conteúdo total dos fenólicos (WOLLGAST; ANKLAM, 2000).

As sementes do cacau também contêm uma série complexa de procianidinas, formadas a partir da condensação de unidades individuais de catequinas ou epicatequinas, chamados monômeros; por isso, são também conhecidas como taninos condensados. As procianidinas diferem na posição e na configuração das ligações entre os monômeros, e são encontradas em altas concentrações em cacau e chocolate, uvas e vinho, maçã e amendoim. Também

são encontradas em quantidades menores em outros vegetais, principalmente frutas (DE PASCUAL-TERESA et al., 2000).

3.6.6 Benefícios do cacau

3.6.6.1 Capacidade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (ERO) têm papel importante em muitos processos biológicos. Quando produzidos em excesso e não destruídos pelo sistema antioxidante de defesa do organismo, podem reagir facilmente com o DNA, as proteínas e os lipídios, provocando doenças como câncer, aterosclerose, injúria da mucosa gástrica e envelhecimento (HALLIWELL, 1990 apud EFRAIM et al., 2011).

Para auxiliar os sistemas antioxidantes de defesa, é desejável a ingestão de substâncias com capacidade antioxidante para combater o excesso de ERO. Alguns polifenóis, como o flavonol quercetina e os flavanóis catequina e epicatequina, apresentam elevada atividade antioxidante (JACOB; BURRI, 1996).

Sanbongi et al. (1998), avaliaram o efeito *in vitro* de um extrato rico em flavonoides obtido a partir de liquor de cacau em solução alcoólica 80%. Os resultados indicaram que não apenas catequinas e epicatequinas apresentaram efeito antioxidante, como também quercetina, quercetina-3-glicosídeo, quercetina-3-arabinosídeo e dideoxiclovamida.

Mao et al. (2000) demonstraram a elevada atividade antioxidante *in vitro* das procianidinas do cacau, tanto na fase de indução (atuando como antioxidante preventivo), como na fase de propagação (atuando como antioxidante de quebra de cadeias) da peroxidação de lipídios.

Em estudos realizados *in vivo* em humanos, as catequinas foram responsáveis pelo aumento da atividade antioxidante, diminuição de malonaldeído e peróxido lipídico no plasma, aumento das concentrações de ascorbato no plasma, diminuição da absorção de ferro não-heme e aumento da resistência do LDL-colesterol à oxidação (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

3.6.6.2 Atividade cardioprotetora

O consumo de produtos de cacau com alto teor de flavanóis e procianidinas diminui a tendência de agregação das plaquetas e, portanto, a formação de coágulos (KWIK-URIBE, 2005).

O consumo de bebidas à base de cacau com elevado teor de flavanóis e procianidinas pode favorecer a saúde cardiovascular por meio do aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) por reflexo da melhoria das funções endoteliais (SCHNORR et al., 2008).

Balzer et al. (2008) avaliaram a proteção vascular pelo impacto da ingestão de bebidas à base de cacau contendo teores variáveis de flavanóis e procianidinas administradas diariamente a pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2. Demonstraram que houve regressão das disfunções vasculares sem afetar o controle glicêmico com a ingestão da dose de $963 \text{ mg}\cdot\text{dia}^{-1}$ de flavanóis. Além da inalteração do metabolismo e dos parâmetros hemodinâmicos dos pacientes.

3.6.6.3 Atividade anti-inflamatória

Estudos *in vitro* realizados com flavanóis e procianidinas do cacau demonstraram que estes possuem capacidade de reduzir a produção de compostos pró-inflamatórios e de aumentar a produção de pelo menos uma molécula com propriedades anti-inflamatórias (EFRAIM et al., 2011).

Rein et al. (2000) demonstraram a capacidade dos flavanóis modularem etapas-chave que regulam a formação de moléculas pró-inflamatórias e de afetarem enzimas envolvidas diretamente na formação de tais moléculas.

Osakabe et al. (1998) também verificaram, em estudo realizado *in vivo*, que a ingestão de flavanóis e procianidinas favoreceu a produção de compostos anti-inflamatórios. Foi demonstrada ainda propriedade anti-inflamatória por meio da redução da severidade de lesões gástricas induzidas pelo consumo de álcool. Neste sentido, concluiu-se que tais compostos oferecem proteção cardiovascular por causa da capacidade de modularem moléculas envolvidas em processos inflamatórios.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS- PRIMAS UTILIZADAS PARA ELABORAÇÃO DO KEFIR

Foram utilizados leite integral UHT, chocolate em pó solúvel (50% cacau), açúcar refinado. Os ingredientes foram obtidos de marcas consagradas no mercado, de um mesmo lote e comprados no comércio de Niterói – RJ. Os grãos de kefir foram doados por uma família da cidade de Niterói – RJ.

4.2 PREPARAÇÃO DAS BEBIDAS FERMENTADAS

Os grãos de kefir foram inoculados em uma proporção de 5% (m/v) e 10% (m/v) em vidros previamente esterilizados contendo leite integral UHT. A partir disto, as amostras foram fermentadas em temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, posteriormente foram maturadas sob refrigeração ($5 \pm 5^\circ\text{C}$) por 48 horas.

Após a fermentação, os grãos de kefir foram retirados com auxílio de uma peneira de plástico e inoculados em um novo substrato para próxima fermentação. Em seguida, foram obtidas quatro amostras de bebidas fermentadas, sendo que duas amostras foram saborizadas com 10% de chocolate em pó solúvel (50% cacau) e 10% de açúcar refinado, e homogeneizadas com um mini processador (Mix Philips Walita ®). Sendo mantidas sob refrigeração até o momento das análises.

4.3 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas análises microbiológicas quantitativas de bactérias ácido-láticas (BAL), bolores e leveduras (BL) por contagem padrão em placas e análises qualitativas de coliformes totais e termotolerantes por número mais provável. As análises foram feitas em duplicata e seguiram a metodologia da *American Public Health Association* (2001) no Laboratório Silo Microbiologia. As amostras foram levadas ao laboratório em bolsa térmica contendo blocos de gelo e posteriormente foram acondicionadas em geladeira até o momento das análises.

4.3.1 Contagem de bactérias ácido-láticas

Uma alíquota de 25 mL de amostra foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de caldo Lactosado. As alíquotas foram homogeneizadas, e posteriormente foram realizadas as diluições (10^{-1} a 10^{-8}) em tubos de ensaios contendo 9 mL de água peptonada.

Em seguida foi realizado o plaqueamento em duplicata de 1 mL do inóculo das diluições 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} em placas de Petri, depois 15 mL do meio Agar de Man Rogosa & Sharpe (MRS) foram vertidos nas placas, as quais foram incubadas a 8 a 10°C por 5 dias.

4.3.2 Contagem de bolores e leveduras

Uma alíquota de 25 mL de amostra foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de caldo Lactosado. As alíquotas foram homogeneizadas, e posteriormente foram realizadas as diluições (10^{-1} a 10^{-8}) em tubos de ensaios contendo 9 mL de água peptonada.

Em seguida foi realizado o plaqueamento em duplicata de 0,1 mL do inóculo das diluições 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} e 10^{-8} em placas de Petri contendo o meio HC com 2% tween 80, espalhando o inóculo com alça de Drigalski, as quais foram incubadas a 25°C por 5 a 7 dias.

4.3.3 Contagem de coliformes totais e termotolerante

Uma alíquota de 25 mL de cada amostra foi transferida para um frasco de homogeneização previamente esterilizado, contendo 225 mL de solução diluente (solução salina peptonada). As alíquotas foram homogeneizadas, com finalidade de se obter a diluição inicial (10^{-1}). A mesma foi homogeneizada em seguida foi transferida 1 mL para um tubo contendo 9 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% obtendo-se a diluição 10^{-2} e o mesmo procedimento foi repetido para a obtenção da diluição 10^{-3} .

Para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerante, diluições de (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) das amostras. Foram tomados três tubos contendo 9 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) contendo um tubo de Durham invertido. Foram incubados em estufa a temperatura de 35-37°C, por 24-48 h. Os positivos foram semeados em tubos contendo 9 mL de Caldo Verde Brilhante Bile 2%, com tubo de Durham invertido, incubando-os a 35°C, durante 24-48 h. A prova foi considerada positiva somente quando for verificado a turvação do meio e produção de gás nos tubos de Durham, dentro de um período de incubação máximo de 48 h. Para cada diluição, o número de tubos positivos foi anotado e quantificado por meio da tabela de NMP, determinando, assim, o NMP de bactérias coliformes termotolerantes por grama de produto analisado (*American Public Health Association*, 2001).

Para a etapa confirmativa de coliformes termotolerantes, uma alçada de cada cultura foi tomada em dos tubos positivos de LST e transferida para tubos de Caldo *E. coli* (EC), contendo tubos de Durham invertidos, e incubados a 45°C, em banho-maria. Após a incubação por 24-48 horas foi realizada leitura, e os tubos que apresentarem turvação do meio e produção de gás foram considerados positivos para bactérias do grupo coliformes termotolerantes. Para cada diluição, o número de tubos positivos foi anotado e quantificado por meio da tabela de NMP, determinando, assim, o NMP de bactérias coliformes termotolerantes por grama de produto analisado. A determinação quantitativa foi realizada de acordo com a técnica do NMP, recomendada pela *American Public Health Association* (2001).

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Foram realizadas análises das características físico-químicas em triplicata e seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 2008) no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

4.4.1 Determinação do pH

Foi realizada nas amostras de kefir.

Material:

- Béquero de 50 mL;
- Phmetro calibrado.

Procedimento:

Transferiu-se 50 mL da amostra em um béquer. Foi utilizado pHmetro T-1000 (Tekna®), previamente calibrado para medida do pH.

4.4.2 Determinação de acidez em ácido láctico

Foi realizada nas amostras de kefir e leite integral UHT.

Material e reagentes:

- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Proveta de 100 mL;
- Bastão de vidro;
- Bureta de 25 mL;
- Solução alcoólica de fenolftaleína 1%;
- Solução de hidróxido de sódio 0,1N.

Procedimento:

Foram transferidos 10 mL da amostra para um Erlenmeyer de 250 mL, adicionado 100 mL de água destilada e misturado com bastão de vidro. Foram adicionados 2 gotas de solução alcoólica de fenolftaleína 1% e titulado com hidróxido de sódio 0,1 N, até o aparecimento de uma coloração rósea.

4.4.3 Determinação de glicídios redutores em lactose

Foi realizada nas amostras de kefir e leite integral UHT.

Material e reagentes:

- Pipeta volumétrica de 25 mL;
- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Balão volumétrico de 500 mL;
- Provetas de 40 mL;
- Bureta de 25 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Solução de hidróxido de sódio 0,5 N;
- Solução de sulfato de cobre a 6,925%;
- Soluções de Fehling A e B.

Procedimento:

Foram transferidos com auxílio de uma pipeta volumétrica 25 mL da amostra para um balão volumétrico de 250 mL. Adicionou-se 8,8 mL da solução de hidróxido de sódio 0,5 N, 10 mL de solução de sulfato de cobre 6,925% e completou-se com água destilada. Deixando sedimentar, para posterior filtração em papel de filtro seco. O filtrado foi acondicionado em frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Transferiu-se o filtrado para uma bureta de 25 mL. Em outro frasco de Erlenmeyer de 250 mL, foram transferidas com auxílio de pipeta volumétrica, 10 mL das soluções de Fehling A e B, 40 mL de água destilada, 2 gotas de azul de metileno e pérolas de vidro. Foi aquecido até a ebulição e titulou-se a solução da amostra, agitando sempre, até que o líquido sobrenadante ficasse de azulado a incolor (no fundo do balão deve ficar um resíduo vermelho-tijolo).

4.4.4 Determinação de glicídios não redutores em sacarose

Foi realizada nas amostras de kefir saborizadas com chocolate em pó e açúcar.

Material e reagentes:

- Pipeta volumétrica de 20 mL;

- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Balão volumétrico de 100 mL;
- Provetas de 40 mL;
- Bureta de 25 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Solução de ácido clorídrico concentrado;
- Carbonato de sódio anidro;
- Soluções de Fehling A e B.

Procedimento:

Foram transferidos com auxílio de uma pipeta volumétrica 20 mL da amostra clarificada para um béquer. Adicionou-se 3 mL de ácido clorídrico concentrado. Logo após, foi aquecido em banho-maria fervente por 15 minutos. Esfriou-se. O excesso de ácido clorídrico foi neutralizado com adição de carbonato de sódio anidro. Transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL e completou o volume com água destilada. O filtrado hidrolisado foi transferido para uma bureta de 25 mL. Em outro frasco de Erlenmeyer de 250 mL, foram transferidas com auxílio de pipeta volumétrica, 10 mL das soluções de Fehling A e B, 40 mL de água destilada, 2 gotas de azul de metileno e pérolas de vidro. Foi aquecido até a ebulição e titulou-se a solução da amostra, agitando sempre, até que o líquido sobrenadante ficasse de azulado a incolor (no fundo do balão deve ficar um resíduo vermelho-tijolo).

4.5 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Foram realizadas análises da composição centesimal em triplicata e seguiram a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (SÃO PAULO, 2008) no Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense.

4.5.1 Determinação da umidade

Foi realizada nas amostras de kefir, leite integral UHT e chocolate em pó.

Material:

- Cápsula de porcelana;
- Areia lavada;
- Bastão de vidro;
- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Estufa a 105° C.

Procedimento:

Para as amostras de leite e kefir foram transferidas 10 mL para cápsulas contendo 10 g de areia lavada e bastão de vidro, previamente calcinadas. Para a amostra de chocolate em pó foi pesado 5 g em cápsulas previamente calcinadas. Foi realizada a secagem em estufa a 105° C por pelo menos 3 horas. Foram realizadas pesagens até peso constante.

4.5.2 Determinação de resíduo mineral fixo

Foi realizada nas amostras de kefir, leite integral UHT e chocolate em pó.

Material:

- Cadinho de porcelana;
- Pipeta volumétrica de 2 mL;
- Chapa aquecedora;
- Mufla a 550°C.

Procedimento:

Foram transferidos 2 mL da amostra, para o leite e kefir, e foram pesados 3 g da amostra, para o chocolate em pó, em cadinho previamente calcinado. O excesso de água, das amostras de leite e kefir, foi evaporado em chapa aquecedora. Foi realizada a calcinação em mufla a 550°C pelo período aproximado de 4 horas. Até o resíduo ficar branco ou ligeiramente acinzentado. Foram realizadas pesagens até peso constante.

4.5.3 Determinação de proteína pelo método de Kjeldahl

Foi realizada nas amostras de kefir, leite integral UHT e chocolate em pó.

Material e reagentes:

- Micropipeta;
- Balão de Kjeldahl;
- Solução de ácido sulfúrico;
- Mistura catalítica;
- Digestor de Kjeldahl;
- Aparelho destilador;
- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Solução de ácido bórico;
- Solução de hidróxido de sódio 50%;
- Solução de ácido sulfúrico 0,01 N;
- Indicador vermelho de metila e verde de bromocresol.

Procedimento:

▪ 1ª etapa - Digestão:

No primeiro momento, mediu-se 0,2 mL com auxílio de micropipeta para as amostras de leite e kefir e pesou-se em torno de 0,2 g para a amostra de chocolate em pó. As amostras foram transferidas para o balão de Kjeldahl. Foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico e cerca de 0,5 g da mistura catalítica. Em seguida, foi levado ao aquecimento no digestor de Kjeldahl, até a solução se tornar azul-esverdeada e livre de material não digerido (pontos pretos).

▪ 2ª etapa - Destilação:

Foram transferidos 10 mL de solução de ácido bórico para um erlenmeyer de 250 mL e adicionadas 2 gotas do indicador vermelho de metila e verde de bromocresol. A amostra digerida foi acoplada ao destilador e por meio de um funil,

do próprio aparelho, adicionado à amostra uma solução de hidróxido de sódio 50% para neutralização do meio ácido. Foi levado ao aquecimento até a ebulição e destilado até obter cerca de 250-300 mL do destilado.

▪ 3ª etapa - Titulação:

O excesso de ácido sulfúrico foi titulado com solução de ácido sulfúrico 0,01N com indicador vermelho de metila e verde de bromocresol. O volume de hidróxido de sódio utilizado foi anotado e utilizado para se realizar os cálculos. A conversão do teor de nitrogênio em proteína foi feita através do fator de conversão 6,38 utilizado para leite e derivados.

4.5.4 Determinação de lipídeo com butirômetro de Gerber

Foi realizada nas amostras de kefir e leite integral UHT.

Material e reagentes:

- Lactobutirômetro de Gerber;
- Pipeta volumétrica de 10 mL;
- Pipeta volumétrica de 11 mL;
- Pipeta volumétrica de 1 mL;
- Termômetro graduado de 0 a 100° C;
- Centrífuga de Gerber com banho-maria;
- Ácido sulfúrico;
- Álcool amílico.

Procedimento:

Transferiu-se, com pipeta volumétrica, 10 mL de ácido sulfúrico para o butirômetro de Gerber. Foram adicionados lentamente, com o auxílio de pipeta volumétrica, 11 mL da amostra, evitando queimar ao contato com o ácido. Juntou-se com o auxílio de pipeta volumétrica, 1 mL de álcool amílico. Foi fechado o butirômetro e agitado até completa dissolução. A amostra foi colocada na centrífuga de Gerber, para posterior centrifugação a 1200+- 100 rpm durante 3 a 5 minutos,

logo após, foi levada para um banho-maria a 70°C, por 3 a 5 minutos, com a rolha para baixo. O lactobutirômetro foi retirado do banho na posição vertical (rolha para baixo). Manejando a rolha, foi colocada a camada amarelo-clara, transparente (gordura), dentro da escala graduada do lactobutirômetro. O valor que foi obtido na escala corresponde diretamente à porcentagem de gordura, cuja leitura foi feita no menisco inferior.

4.5.5 Determinação de lipídeo pelo método de extração direta em Soxhlet

Foi realizada na amostra de chocolate em pó.

Material e reagentes:

- Aparelho extrator de Soxhlet
- Bateria de aquecimento com refrigerador de bolas
- Balança analítica
- Cartucho de Soxhlet
- Balão de fundo chato com boca esmerilhada
- Algodão desengordurado
- Espátula
- Dessecador
- Éter

Procedimento:

Foram pesadas 5 g de amostra em cartucho de Soxhlet e colocou-se o algodão desengordurado. Transferiu-se o cartucho para o aparelho extrator tipo Soxhlet. O balão de fundo chato, previamente tarado a 105°C, foi acoplado ao extrator. Foi adicionado o éter em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. Logo após, foi adaptado a um refrigerador de bolas e mantido sob aquecimento em chapa elétrica à extração contínua. Retirou-se o cartucho e destilou o éter e transferiu o balão com o resíduo extraído para uma estufa à 105°C, mantendo cerca de uma hora. Foram realizadas pesagens até peso constante.

4.5.6 Determinação de carboidrato

Foi realizado na amostra de chocolate em pó. O teor de carboidrato foi determinado por diferença, subtraindo de 100% do valor de proteínas, lipídios, cinzas e umidade.

$$\text{Carboidrato} = 100 - \text{umidade} - \text{cinzas} - \text{proteínas} - \text{lipídeos}$$

4.5.7 Determinação de energia

Foi realizada nas amostras de kefir, leite integral UHT e chocolate em pó. O valor energético total (VET) foi calculado pela soma das calorias (kcal) fornecidas por carboidratos, proteínas e lipídeos, multiplicando-se seus valores em gramas pelos fatores de Atwater 4 Kcal, 4 Kcal e 9 Kcal, respectivamente.

$$\text{Energia} = (4 \times \text{carboidrato}) + (4 \times \text{proteína}) + (9 \times \text{lipídeo})$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se análise descritiva dos indicadores avaliados e análise da variância (ANOVA) para identificar a influência do conteúdo de grãos de kefir sobre os indicadores analisados. Sendo utilizado o programa estatístico *Statgraphics®* versão 2012, considerando significativamente os valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Os resultados das análises microbiológicas das amostras de kefir (5% e 10% m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcarsão apresentados na Tabela 1.

Os resultados das contagens de BAL e BL obtidos no estudo são consistentes com os dados observados na literatura. Garrote et al. (2001) obtiveram contagens de BAL em torno de 10^8 (UFC/mL) e BL em torno de 10^7 (UFC/mL) após 48 horas de fermentação à 20°C. Leite et al. (2013) encontraram BAL em torno de 10^{10} (UFC/mL) e BL em torno de 10^6 (UFC/ mL) após 24 horas de fermentação à 25° C e 48 horas de maturação à 4° C em leite desnatado.

Os conteúdos de BAL foram semelhantes tanto nas amostras de kefir não saborizados nas concentrações de 5% e 10% (m/v) quanto na amostra saborizada com chocolate em pó e açúcar na concentração de 5% (m/v). No kefir 5% (m/v) saborizado com chocolate em pó e açúcar o conteúdo de BAL foi cerca de 100 vezes maior que o kefir 10% (m/v) saborizado.

Um estudo realizado por Irigoyen et al. (2005) demonstrou que a contagem de microrganismos depende da porcentagem de grãos de kefir inoculados. O conteúdo de BAL foi mais elevado nas amostras de kefir com concentração de 1% (m/v) dos grãos comparado às amostras com concentração de 5% (m/v). Concluíram que o aumento da concentração de grãos de kefir favorece o crescimento de microrganismos que inibem a proliferação das BAL.

No presente estudo, é possível observar que o aumento da concentração de grãos de kefir e a adição de chocolate em pó e açúcar na bebida fermentada inibiu o crescimento das BAL, provavelmente, pelo aumento de microrganismos que podem competir por nutrientes de crescimento ou produzir metabólitos que inibem o crescimento do outro (NARVHUS; GADAGA, 2003). Estudo realizado por Santa et al. (2008) demonstrou que a amostra de kefir com adição de polpa de morango e açúcar apresentou um menor valor de BAL quando comparada à amostra de kefir não saborizada.

O conteúdo de BL foi cerca de 100 vezes maior na amostra de kefir 5% (m/v) não saborizado, e cerca de 1000 vezes maior no kefir 10% (m/v) saborizado com

chocolate em pó e açúcar, quando comparado com as amostras não saborizadas e saborizadas, respectivamente.

O presente estudo sugere que a adição de chocolate em pó e açúcar ao kefir favorecem o crescimento de BL não fermentadoras de lactose na concentração de 10% (m/v), pois o açúcar atua como substrato para os microrganismos não fermentadores de lactose sendo formadas moléculas de etanol e dióxido de carbono.

Corroborando com o presente estudo, Liu; Lin (2000) observaram o aumento de leveduras e produção de etanol após a adição de carboidratos (glicose ou sacarose) em kefir fermentado em extrato hidrossolúvel de soja devido à utilização destes carboidratos por leveduras não fermentadoras de lactose, tais como: *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia fermentans*, presentes nos grãos de kefir.

Tabela 1. Análise microbiológica das amostras de kefir

Análises	Amostras			
	Kefir 5%	Kefir 10%	Kefir 5% sabor chocolate	Kefir 10% sabor chocolate
Contagem de BAL (UFC/mL)	5,1x10 ⁹	2,1x10 ⁹	1,3x10 ⁹	4,6x10 ⁷
Contagem de BL (UFC/mL)	4,1x10 ⁷	3,3x10 ⁵	4,5x10 ³	1,2x10 ⁶
Coliformes totais e termotolerantes (NMP/mL)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

As formulações elaboradas em nosso estudo apresentaram boas condições higiênico-sanitárias devido à ausência de coliformes totais e termotolerantes. Desta forma, as amostras estão de acordo com o estabelecido pelo Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos (BRASIL, 2001).

De maneira geral as amostras apresentaram contagem de BAL e BL igual ou superior ao mínimo estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados (contagem $\geq 10^7$ e 10^4 UFC/mL, respectivamente) com exceção do kefir 5% (m/v) saborizado com chocolate em pó e açúcar que apresentou um conteúdo de BL menor do que 10^4 UFC/mL (BRASIL, 2007).

Considerando a porção de 200 mL/dia segundo a RDC ANVISA n° 359 de 23 de dezembro de 2003 (BRASIL, 2003), as bebidas do estudo podem ser consideradas probióticas, pois atendem a quantidade mínima viável de BAL em alimentos probióticos que deve estar entre a faixa de 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2009).

5.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Os resultados das análises físico-químicas das amostras de kefir (5% e 10% m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar são apresentados no Gráfico 1.

As amostras de kefir (5% e 10% m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar apresentaram os valores do pH semelhantes em diferentes estudos (GARROTE et al., 1998; SIMOVA et al., 2002; IRIGOYEN et al., 2005; SANTA et al., 2008; MONTANUCI et al., 2012; LEITE et al., 2013).

Os valores de pH das amostras de kefir 10% (m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar foram significativamente menores ($p < 0,05$) que as amostras de kefir 5% (m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó (Gráfico 1). Um estudo realizado por Garrote et al. (1998), demonstrou que o aumento da concentração dos grãos de kefir acarreta na diminuição do valor do pH devido à formação de ácido láctico.

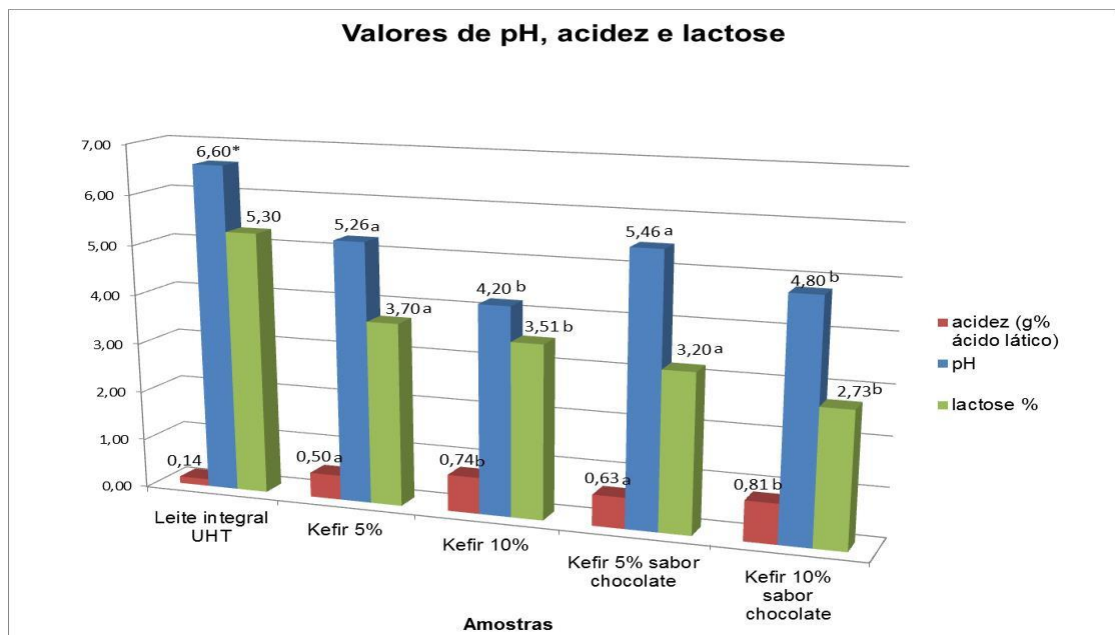
Em relação aos valores de acidez do kefir encontrados no presente estudo foram entre 0,50 a 0,81g de ácido láctico/ 100mL, dentro do estabelecido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados ($< 1,0$ g de ácido láctico/100mL) (BRASIL, 2007) e de acordo com o observado em outros estudos (entre 0,60 a 0,80g de ácido láctico/100g) (SANTA et al., 2008; LEITE et al., 2013).

O aumento significativo ($p < 0,05$) da acidez nas amostras com concentração de 10% (m/v) foi consistente com o processo de fermentação e redução do pH. Isto ocorre devido processo de fermentação pelas BAL que metabolizam a lactose formando moléculas de ácido láctico, conseqüentemente, elevam a acidez do produto (Gráfico 1).

Valores médios de lactose, em torno de 3,05g a 3,51g de lactose/100mL, foram encontrados em amostras de kefir (IRIGOYEN et al., 2005; MONTANUCI et al., 2012; LEITE et al., 2013) e são semelhantes aos encontrados no presente estudo.

O processo de fermentação da lactose para produção de ácido láctico é dependente do tempo de fermentação e da concentração de grãos de kefir. A redução do teor de lactose observada no presente estudo foi influenciada pelo aumento na concentração dos grãos kefir (de 5% para 10% m/v) nas amostras não saborizadas e saborizadas. Estes resultados são consistentes com o estudo realizado por Irigoyen et al. (2005), onde o menor teor de lactose foi observado no kefir com maior concentração dos grãos. No presente estudo a redução da lactose nas amostras variou de 29 a 49% quando comparada à lactose do leite integral UHT (Gráfico 1).

Gráfico 1. Valores de pH, acidez e lactose do leite integral UHT e das amostras de kefir.



*Valor médio encontrado na literatura (MARTINS, A. et al., 2008; DOMARESKI et al., 2010). Letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de kefir.

5.3 ANÁLISES DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

Os resultados das análises da composição centesimal das amostras de kefir (5% e 10% m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar são apresentados na Tabela 2.

Os teores de umidade encontrados nas amostras de kefir ficaram próximos dos valores encontrados na literatura por Garrote et al. (2001), entre 79,3 a 83,8%. O kefir 5% (m/v) e 10% (m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar, apresentaram teores de umidade semelhantes. Entretanto, observou-se que a adição de chocolate em pó e açúcar aumenta o teor de sólidos, conseqüentemente, diminui a umidade.

Os valores de resíduo mineral fixo e proteína das amostras de kefir 5% e 10% (m/v) não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar não apresentaram diferença significativa. O resultado obtido de resíduo mineral fixo para o kefir 5% m/v não saborizado está abaixo do valor encontrado na literatura por Ozer; Ozer (1999) apudSarkar(2007) de 0,7 g/100mL. Em relação ao valor obtido para a amostra de kefir 5%(m/v) saborizado, Ribeiro et al., 2011 encontraram valores de 0,88 a 0,97 g/ 100mL de resíduo mineral fixo em iogurte sabor chocolate com menta.

Além disso, os teores de proteínas das amostras de kefir encontram-se dentro do limite mínimo de 2,9 g/100mL estabelecido pela legislação de leites fermentados (BRASIL, 2007).

Em nosso estudo o teor médio de lipídeo das amostras de kefir é consistente com o estudo realizado por Irigoyen et al. (2005) que encontrou um teor de lipídeo de 3,60 g/100mL em kefir produzido com concentração de 5% dos grãos.

Os teores de lipídeo das amostras de kefir 10% m/v não saborizado e saborizado com chocolate em pó foram significativamente menores($p < 0,05$) que o kefir 5% m/v não saborizado e saborizado com chocolate em pó e açúcar. Isto pode ser explicado pela presença de lipases produzidas pelos grãos de kefir durante a fermentação (VUJIČIĆ et al., 1992). Terra (2007)obteve resultados similares ao presente estudo, com um decréscimo do teor de lipídio de 13,51% comparado ao leite integral UHT, após 72 horas de fermentação.

Tabela 2. Análise da composição centesimal das matérias-primas e das amostras de kefir

Análises	Amostras					
	Leite integral UHT	Chocolate	Kefir5%	Kefir10%	Kefir 5% chocolate	Kefir 10% chocolate
Umidade (%)	88±0,01	5,4±0,08	88±0,05 ^a	89±0,18 ^a	71±0,3 ^a	77±0,3 ^a
Resíduo mineral fixo (%)	0,7±0,03	4,2±0,06	0,5±0,04 ^a	0,7±0,01 ^a	0,9±0,02 ^a	0,8±0,01 ^a
Proteína (%)	2,9±0,02	12±0,28	3,3±0,2 ^a	3,1±0 ^a	3,6±0,2 ^a	3,3±0,03 ^a
Lipídeo (%)	3,0±0,1	6,2±0,1	3,1±0,06 ^a	2,8±0,1 ^b	3,8±0,05 ^a	3,4±0,1 ^b
Carboidratos (%)	5,3	72±0	3,7	3,5	21±0,3 ^{a*}	17±0,6 ^{a*}
Valor energético total (kcal/100 mL)	60	392	56 ^a	52 ^a	133 ^a	112 ^b

Letras diferentes demonstram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras de kefir.

*Carboidratos é a soma dos resultados de lactose e sacarose de cada amostra.

As amostras saborizadas apresentaram teor lipídico maior comparado ao não saborizado devido à adição do chocolate em pó. Estudo realizado por Ribeiro et al. (2011), obteve valores de teor de lipídeo entre 3,31 a 3,46 g/100mL em iogurte integral sabor chocolate com menta. Estes valores estão próximos aos encontrados no presente estudo.

Em relação aos carboidratos totais, os valores obtidos para as amostras de kefir 5% m/v e 10% m/v saborizadas não apresentaram diferença significativa e encontram-se acima dos valores encontrados por Ribeiro et. al (2011) em iogurte sabor chocolate com menta (12,40 a 15,22 g/ 100mL). Tais diferenças podem ser explicadas por diferenças na concentração de chocolate e açúcar à amostra de kefir.

O valor energético foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas amostras saborizadas com chocolate em pó e açúcar comparadas às não saborizadas. Entre as amostras saborizadas a amostra de kefir 10% m/v apresentou menor valor energético, devido ao menor teor de lipídeo, proteína, lactose e carboidratos totais encontrados.

No estudo de Otlés; Cagindi (2003), o valor energético médio de kefir foi de 65 kcal/100mL. Nossos resultados são consistentes com estes dados. Entretanto, os valores energéticos encontrados no presente estudo nas amostras de kefir saborizado com chocolate em pó e açúcar estão acima dos valores energéticos encontrados por Musaiger et al. (1998), para iogurte integral que variou de 55 a 106 kcal/100mL. Diferenças nos tipos de bebidas, processo de fermentação, quantidades e tipos de ingredientes adicionados justificam possíveis diferenças.

Sendo assim, estudos sobre o desenvolvimento de bebidas probióticas a base de kefir devem levar em consideração o tempo e temperatura de fermentação, a concentração dos grãos, os tipos e quantidade dos ingredientes adicionados, já que estes fatores podem interferir no conteúdo de microrganismos e de nutrientes no kefir.

6 CONCLUSÃO

A saborização das bebidas do estudo se baseou nas características de qualidade preconizadas pela legislação para leites fermentados. Pela legislação a adição de componentes não lácteos (em nosso estudo, chocolate e açúcar) não deve ultrapassar o valor de 30%. No presente estudo, a adição de 10% de chocolate e 10% de açúcar está de acordo com a legislação, visto que soma o total 20% de componentes não lácteos nas bebidas.

As amostras não saborizadas (5% e 10% m/v) e saborizadas (5% m/v) de kefir apresentaram conteúdo de BAL semelhantes. A amostra saborizada 5 % (m/v) apresentou maior conteúdo de BAL quando comparada a amostra saborizada 10% (m/v). Em relação ao conteúdo de BL foi maior na amostra de kefir não saborizado com a concentração de grãos de 5% m/v.

A adição do chocolate em pó e açúcar favoreceu o crescimento de BL e, provavelmente, contribuiu para a inibição do crescimento de BAL na amostra de kefir saborizado (10% m/v) devido à competição por nutrientes ou produção de metabólitos que inibem o seu crescimento. Podemos concluir que a concentração dos grãos de kefir e a adição de chocolate em pó e açúcar influenciaram no conteúdo de microrganismos do kefir.

Ademais, para porção de 200 mL de leite fermentado preconizado pela RDC nº 359/03 as amostras de kefir podem ser classificadas como alimentos funcionais probióticos, visto que a contagem de BAL está de acordo com o requisito recomendado de mínimo de 10^8 UFC por porção. As amostras apresentaram boas condições higiênico-sanitárias devido à ausência de coliformes totais e termotolerantes.

Quanto às análises físico-químicas das amostras de kefir não saborizadas e saborizadas, observou-se que a concentração dos grãos de kefir (de 5% e 10% m/v) influenciou nos valores de pH, acidez, lactose e lipídeo do kefir.

Estudos sobre o desenvolvimento de bebidas probióticas a base de kefir devem levar em consideração o tempo e temperatura de fermentação, a concentração dos grãos, os tipos e quantidade dos ingredientes adicionados, já que

estes fatores podem interferir no conteúdo de microrganismos e de nutrientes no kefir.

Concluimos que o desenvolvimento de kefir sabor chocolate contribui para inovação na área de bebidas fermentadas, pois agrega valor nutricional ao kefir. Além disso, do ponto de vista dos alimentos funcionais, as bebidas são classificadas como probióticas, e provavelmente, os microrganismos probióticos irão conferir efeitos benéficos à saúde. Sendo necessário mais estudos sobre aceitabilidade das bebidas e a viabilidade dos microrganismos presentes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Analía Graciela; DE ANTONI, Graciela Liliana. Characterization of kefir grains grown in cows' milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*, v. 66, n. 2, p. 327-333, 1999.

AFOAKWA, Emmanuel Ohene. Cocoa and chocolate consumption: Are there aphrodisiac and other benefits for human health? *South African Journal of Clinical Nutrition*, v. 21, n. 3, p. 107-113, 2008.

AHMED, Zaheer; WANG, Yanping; AHMAD, Asif; KHAN, Salman Tariq; NISA, Mehrun; AHMAD, Hajra; AFREEN, Asma. Kefir and health: A contemporary perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 5, p.422–434, 2013.

ALANDER, Minna; SATOKARI, Reetta; KORPELA, Riitta; SAXELIN, Maija; VILPPONEN-SALMELA, Terttu; MATTILA-SANDHOLM, Tiina; VON WRIGHT, Atte. Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus Rhamnosus GG*, after oral consumption. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, n1, p. 351-354, 1999.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4ª edição. Washington: APHA, 2001.

ÂNGULO, Luis; LOPEZ, Eliseo; LEMA, Cesar. Microflora present in kefir grains of the galician region (North West of Spain). *Journal of Dairy Research*, v.60, n. 2, p. 263-267, 1993.

AQUARONE, Eugênio; BORZANI, Walter; SCHMIDELL, Willibaldo; LIMA, Urgel de Almeida. *Biotechnologia industrial*. São Paulo: Ed. Blücher, 2001. v. 4, 523 p.

ASSADI, M. M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 16, n. 6, p. 541-543, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CHOCOLATE, CACAU, BALAS E DERIVADOS. História. Disponível em: <<http://www.abicab.org.br/associado-chocolate-e-cacau/historia/>>. Acesso em: 30 jul. 2014.

BALZER, Jan; RASSAF, Tienush; HEISS, Christian; KLEINBONGARD, Petra; LAUER, Thomas; MERX, Marc; HEUSSEN, Nicole; GROSS, Heidrun B.; KEEN, Carl L.; SCHROETER, Hagen; KELM, Malte. Sustained benefits in vascular function through flavanol-containing cocoa in medicated diabetic patients: A double-masked, randomized, controlled trial. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 51, n.22, p. 2141-2149, 2008.

BECKETT, Stephen T. *The science of chocolate*. 2ª edição. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000. 240p.

BERGMANN, Rafaela Strada de Oliveira; PEREIRA, Maria Aparecida; VEIGA, Sandra Maria Oliveira Moraes; SCHNEEDORF, José Maurício; OLIVEIRA, Nelma de

Mello Silva; FIORINI, João Evangelista. Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.

BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; SIMOV, Z.I.; FRENGOVA, G.I.; SPASOV, Z.N. Pure cultures for making kefir. *Food Microbiology*, v. 19, n. 5, p. 537-544, 2002.

BESHKOVA, D. M.; SIMOVA, E. D.; FRENGOVA, G. I.; SIMOV, Z. I.; DIMITROV, Zh. P. Production of volatile aroma compounds by kefir starter cultures. *International Dairy Journal*, v.13, n. 7, p. 529-535, 2003.

BOTTAZZI, V., ZACCONI, C., SARRA, P. G., DALLAVALLE, P. & PARISI, M. G. Kefir. Microbiologia, chimica e tecnologia. *L'Industria del latte*, v.30, n.1, p. 41-62, 1994.

BRASIL.Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução nº. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 03 maio. 1999.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2001.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº46, 23 de Outubro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 out. 2007. Seção 1, p. 5.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária, 2009. Alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wuE>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 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, DF, 26 dez. 2003. Seção 1.

BRIDGES, Susan R.; ANDERSON, James W.; DEAKINS, Dee A.; DILLON, Debra W.; WOOD, Constance L. Oat bran increases serum acetate of hypercholesterolemic men. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, n. 2, p. 455- 459, 1992.

BRAVO, Laura. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

CARNEIRO, Raphaella Puccti. *Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para a produção de kefir*. Belo Horizonte, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

CHEIRSILP, Benjamas; SHIMIZU, Hiroshi; SHIOYA, Suteaki. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, v. 100, n. 1, p. 43-53, 2003.

CIDELL, Julie L; ALBERTS, Heike C. Constructing quality: The multinational histories of chocolate. *Geoforum*, v. 37, n. 6, p. 999-1007, 2006.

COMISSÃO EXECUTIVA DO PLANO DA LAVOURA CACAUEIRA. Cacau: História e evolução no Brasil e no mundo, 1978. Disponível em: <http://www.ceplac.gov.br/paginas/publicacoes/paginas/historia_do_cacau/cartilhas/CACAU%20HIST%3%93RIA%20E%20EVOLU%3%87%3%83O.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2014.

_____. Informações de Mercado, 2010. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/paginas/infomercado/infomercado.asp>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Resolução nº 12 de 1978. Aprova as seguintes Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 jul. 1978.

COSTA, Neuza Maria Brunoro; ROSA, Carla de Oliveira Barbosa. *Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos*. Rio de Janeiro: Rubio, 2010. 560 p.

CRAMER, Daniel W.; WILLETT, Walter C.; BELL, Debra A.; NG, Won G.; HARLOW, Bernard L.; WELCH, William R.; SCULLY, Robert E.; KNAPP, Robert C. Galactose consumption and metabolism in relation to the risk of ovarian cancer. *The Lancet*, v. 334, n. 8654, p. 66-71, 1989.

CRUEGER, Wulf; CRUEGER, Anneliese. *Biotechnologia: manual de microbiologia industrial*. Zaragoza: Acribia, 1993. 392 p.

CZAMANSKI, R.T.; GRECO, D.P.; WIEST, J.M. Evaluation of antibiotic activity in filtrates of traditional kefir. *Higiene Alimentar*, v. 18, n. 124, p. 75-77, 2004.

DAESCHEL, M. A. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, v. 43, p. 164-166, 1989.

DE PASCUAL-TERESA, Sonia; SANTOS-BUELGA, Celestino; RIVAS-GONZALO, Julián C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in spanish foodstuffs and beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, n. 11, p. 5331-5337, 2000.

DE VRESE, Michael; KELLER, Birgit; BARTH, Christian A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*, v. 61, n. 1, p. 61-75, 1992.

DE VUYST, Luc; DE VIN, Filip; VANINGELGEM, Frederik; DEGEEST, Bart. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.11, n.9, p.687–707, 2001.

DINIZ, R.O.; PERAZZO F.F.; CARVALHO, J.C.T.; SCHNEENEDORF, J.M. Atividade anti-inflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.13, n. 1, p. 19-21, 2003.

DOMARESKI, Jackson Luiz; BANDIERA, Nataly Simões; SATO, Rafael Tamostu; ARAGON-ALEGRO, Lina Casale; SANTANA, Elsa Helena Walter de. Avaliação físico-química e microbiológica do leite UHT comercializado em três países do Mercosul (Brasil, Argentina e Paraguai). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.60, n.3, p. 261-269, 2010.

DUITSCHAEVER, C. L.; KEMP, N.; SMITH, A. K. Microscopic studies of the microflora of kefir grains and kefir made by different methods. *Milchwissenschaft*, v. 43, n.8, p. 479–481, 1988.

EFRAIM, Priscilla; ALVES, Adriana Barreto; JARDIM, Denise Calil Pereira. Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

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

FERREIRA, Célia Lúcia de Lucas Fortes. *Prebióticos e Probióticos: atualização e prospecção*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012. 248p.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. CODEX Standard for Fermented Milks #243. Disponível em: <http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.jsp>. Acesso em: 15 abril. 2014.

FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; YAMANAKA, Y. Effects of orally administered yogurt and kefir on tumor growth in mice. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science*, v.43, p.450–453, 1990.

FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; TAKAHASHI, T.; YAMANAKA, Y. Anti-metastatic effect of kefir grain components on Lewis Lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma in mice. *Journal of Agriculture Science*, v.45, n.1, p. 62-70, 2000.

GARCIA, S.; SOUZA, G.; VALLE, J.L. E. Quefir e sua tecnologia - aspectos gerais. *Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 2, p. 137-155, 1984.

GARROTE, Graciela Liliana; ABRAHAM, Analía Graciela; DE ANTONI, Graciela Liliana. Preservation of kefir grains, a comparative study. *LWT – Food Science and Technology*, v. 30, n. 1, p. 77–84, 1997.

_____. Characteristics of kefir prepared with different grain: milk ratios. *Journal of Dairy Research*, v. 65, n. 1, p. 149- 154, 1998.

_____. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. *Journal of Food Protection*, v. 63, n.3, p. 364-369, 2000.

_____. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *Journal of Dairy Research*, v.68, n.4, p. 639-652, 2001.

GHONEUM, Mamdooh; GIMZEWSKI, James. Apoptotic effect of a novel kefir product, PFT, on multidrug-resistant myeloid leukemia cells via a hole-piercing mechanism. *International Journal of Oncology*, v. 44, n. 3, p. 830-837, 2014.

GIBSON, Glenn R.; ROBERFROID, Marcel B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of Nutrition*, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOLOWCZYC, Marina Alejandra; MOBILI, Pablo; GARROTE, Graciela Liliana; SERRADELL, María de los Angeles; ABRAHAM, Analía Graciela; DE ANTONI, Graciela Liliana. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* isolated from kefir grains: evidence for lectin-like activity of bacterial surface proteins. *Journal of Dairy Research*, v.76, n.1, p.111-116, 2009.

GORSKI, D. Kefir: 21 st century yogurt? *Dairy Foods*, p. 95 - 149, 1994.

GOTTI, Roberto; FURLANETTO, Sandra; PINZAUTI, Sergio; CAVRINI, Vanni. Analysis of catechins in *Theobroma cacao* beans by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1112, n. 1–2, p. 345–352, 2006.

GÜLMEZ, M.; GÜVEN, A. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in ayran and modified kefir as pre- and postfermentation contaminant. *Veterinarni medicina Czech*, v. 48, n.5, p. 126-132, 2003.

GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMENZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride induced mice tissues. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health*, v.50, n.8, p.412–416, 2003.

GUZEL-SEYDIM, Zeynep B.; SEYDIM, Atif C.; GREENE, Annel K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 2, p. 275-277, 2000.

_____. Comparison of amino acid profiles of milk, yoghurt and Turkish Kefir. *Milchwissenschaft*, v. 58, n.3-4, p.158–160, 2003.

HALLÉ, C., LEROI, F., DOUSSET, X. AND PIDOUX, M. Les kefirs - Des associations bactériennes lactique-levures. In: de Roissart, H. and Luquet, F.M. *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques*. Uriage: Lorica, 1994. v. 2, p. 169-182.

HALLIWELL, Barry. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communications*, v. 9, n.1, p. 1-32, 1990.

HARA, Hiroshi; HAGA, Satoko; AOYAMA, Yoritaka; KIRIYAMA, Shuhachi. Short-chain fatty acids suppress cholesterol synthesis in rat liver and intestine. *The Journal of Nutrition*, v.129, n. 5, p. 942- 948, 1999.

HELANDER, I.M.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. M. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, v.8, n. 5, p. 146-150, 1997.

HERTZLER, Steven R; HUYNH, Bao- Chau L; SAVAIANO, Dennis A. How much lactose is low lactose? *Journal of the American Dietetic Association*, v. 96, n. 3, p. 243-246, 1996.

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

HONG, Wei-Sheng; CHEN, Yen-Po; CHEN, Ming-Ju. The antiallergic effect of kefir Lactobacilli. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 8, p. 244-253, 2010.

HOSONO, A.; TANAKO, T.; OTANI, H. Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, v. 45, n. 10, p.647–651, 1990.

IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F. C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, v. 90, n. 4, p. 613-620, 2005.

IYER, Chandra; KOSTERS, Astrid; SETHI, Gautam ;KUNNUMAKKARA, Ajaikumar B.; AGGARWAL, Bharat B.; VERSALOVIC, James. Probiotic Lactobacillus reuteri promotes TNF-induced apoptosis in human myeloid leukemia-derived cells by modulation of NF- κ B and MAPK signaling. *Cellular Microbiology*, v. 10, n. 7, p. 1442 -1452, 2008.

JACOB, Robert A; BURRI, Bety J. Oxidative damage and defense. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.63, n.6, p.985S-990S, 1996.

JAY, James M. *Microbiologia de alimentos*. 6ªed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712p.

KWIK-URIBE, Catherine. Potential health benefits of cocoa flavanols. *The Manufacturing Confectioner*, v. 85, n. 10, p. 43-49, 2005.

KLAVER, Frank A. M.; VAN DER MEER, Roelof. The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt-desconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n.4, p. 1120-1124, 1993.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefirin, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, v. 7, n.2, p. 200-211, 1968.

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

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

LEE, Mee-Young; AHN, Kyung-Seop; KWON, Ok-Kyung; KIM, Mee-Jin; KIM, Mi-Kyoung; LEE, In-Young; OH, Sey-Ryang; LEE, Hyeong-Kyu. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*, v. 212, n. 8, p. 647-654, 2007.

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, n. 7, p. 4149-4159, 2013.

LINK-AMSTER, H.; ROCHAT, F.; SAUDAN, K.Y.; MIGNOT, O.; AESCHLIMANN, J.M. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 55-63, 1994.

LIU, Je-Ruei; LIN, Chin-Wen. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. *Journal of Food Science*, v. 65, n. 4, p. 716-719, 2000.

LIU, Je-Ruei; WANG, Sheng-Yao; LIN, Yuh-Yih; LIN, Chin-Wen. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer*, v. 44, n. 2, p. 183-187, 2002.

LIUT KEVICIUS, Algirdas; SARKINAS, Antanas. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains – as a food and forage biomass. *Dairy Science Abstracts*, v. 66, p. 903, 2004.

LOPITZ – OTSOA, Fernando; REMENTERIA, Aitor; ELGUEZABAL, Natalia; GARAIZAR, Javir. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 23, n.2, p. 67-74, 2006.

MAALOUF, Katia; BAYDOUN, Elias; RIZK, Sandra. Kefir induces cell-cycle arrest and apoptosis in HTLV-1-negative malignant T-lymphocytes. *Cancer Management and Research*, v. 14, n.3, p. 39-47, 2011.

MAHAN, L. Kathleen; ESCOTT- STUMP, Sylvia. *Krause, alimentos, nutrição e dietoterapia*. 12ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1358 p.

MAO, Tin K. ; POWELL, Jonathan; VAN DE WATER, Judy; KEEN, Carl L.; SCHMITZ, Harold H.; HAMMERSTONE, John F.; GERSHWIN, M. Eric. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 β in peripheral blood mononuclear cells. *Life Sciences*, v. 66, n. 15, p. 1377-1386, 2000.

MARSHALL, Valerie M. Starter cultures for milk fermentation and their characteristics. *Journal of the Society of Dairy Technology*, v.46, n.2, p. 49-56, 1993.

MARTINS, Ana Maria Centola Vidal; ROSSI JUNIOR, Oswaldo Durival; SALOTTI, Bruna Maria; BÜRGER, Karina Paes; CORTEZ, Ana Ligia Lordello; CARDOZO, Marita Vedovelli. Efeito do processamento UAT (Ultra Alta Temperatura) sobre as características físico-químicas do leite. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.28, n.2, p. 295-298, 2008.

MARTINS, Eliane M. Furtado; RAMOS, Afonso Mota; VANZELA, Ellen Silva Lago; STRINGHETA, Paulo César; PINTO, Cláudia Lúcia de Oliveira; MARTINS, José Manoel. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*, v.51, n.2, p. 764–770, 2013.

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. Isolation and characterization of aropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, n. 1, p. 69-74, 1999.

MIGUEL, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo; CARDOSO, Patrícia Gomes; LAGO, Lilian de Assis; SCHWAN, Rosane Freitas. Diversity of bacteria present in milk grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*, v.43, n. 5, p. 1523-1528, 2010.

MIYAMOTO, T.; MORITA, H.; NISHIOKA, K.; KATAOKA, K.; IZUMIMOTO, M.; KUYAMA, T. Constituent species of lactic acid bacteria from kefir and their desmutagenic properties. *Japan Journal of Dairy Federation Science*, v. 40, p.111–112, 1991.

MONTANUCI, Flávia Daiana; PIMENTEL, Tatiana Colombo; GARCIA, Sandra; PRUDENCIO, Sandra Helena. Effect of starter culture and inulin addition on microbial viability, texture, and chemical characteristics of whole or skim milk kefir. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 32, n. 4, p. 850-861, 2012.

MONTES, R. G.; BAYLESS, T. M.; SAAVEDRA, J. M.; PERMAN, J. A. Effect of milks inoculated with Lactobacillus acidophilus or a yogurt starter culture in lactose-maldigesting children. *Journal of Dairy Science*, v.78, n.8, p.1657-1664, 1995.

MUROFUSHI, M.; SHIOMI, M.; AIBARA, K. Effect of orally administered polysaccharide from kefir grain on delayed-type hypersensitivity and tumor growth in mice. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, v. 36, n. 1, p.49–53, 1983.

MUSAIGER, Abdulrahman O.; AL-SAAD, Jalal A.; AL-HOOTI, Dabia S.; KHUNJI, Zakaria A. Chemical composition of fermented dairy products consumed in Bahrain. *Food Chemistry*, v. 61, n. 1-2, p. 49-52, 1998.

NARVHUS, Judith A.; GADAGA, Tendekayi Henry. The role of interaction between yeasts and lactic acid bacteria in African fermented milks: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 86, n. 1, p. 51-60, 2003.

NEVE, H. Analysis of kefir grain starter cultures by scanning electron microscopy. *Milchwissenschaft*, v. 47, n.5, p. 275–278, 1992.

ORDOÑEZ, J. A. *Tecnología de Alimentos: alimentos de origem animal*. Porto Alegre: Artmed, 2005. 280p.

OUWEHAND, Arthur C.; SALMINEN, Seppo J. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *International Dairy Journal*, v.8, n.9, p. 749-758, 1998.

OUWEHAND, Arthur C; SALMINEN, Seppo; ISOLAURI, Erika. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 82, n. 1-4, p. 279- 289, 2002.

OSAKABE, Naomi; YAMAGISHI, Megumi; SANBONGI, Chiaki; NATSUME, Midori; TAKIZAWA, Toshio; OSAWA, Toshihiko. The antioxidative substances in cacao liquor. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, v. 44, n. 2, p. 313 -321, 1998.

OTLES, Semih; CAGINDI, Ozlem. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

OTTOGALLI, G.; GALLI, A.; RESMINI, P.; VOLONTERIO, G. Composizione microbiologica, chimica ed ultrastruttura dei granuli di kefir. *Annals of Microbiology*, v.23, p.109-121, 1973.

OZER, D.; OZER, B.H. (1999), Product of Eastern Europe and Asia. In Robinson, R.K. *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press, 1999. v.2, p. 798-805.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; KANG S. AH; KIM H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, n.6, p. 1171-1185, 2006.

PAUL, Moushumi; SOMKUTI, George A. Hydrolytic breakdown of lactoferricin by lactic acid bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 37, n. 2, p. 173-178, 2010.

PELLETIER, X.; LAURE-BOUSSUGE, S.; DONAZZOLO, Y. Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: Importance of the live flora. *European Journal Clinical Nutrition*, v. 55, n.6, p. 509-512, 2001.

PERDIGÓN, Gabriela; DE MORENO DE LEBLANC, A.; VALDEZ, J.; RACHID, M. Role of yoghurt in the prevention of colon cancer. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, n. 3, p. S65-S68, 2002.

PIARD, J.C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*, v.72, n.2, p.113-142, 1992.

PIMENTEL, Fernanda Araujo. *Avaliação do poder antioxidante do chocolate amargo: um comparativo com o vinho tinto*. Porto Alegre, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

PLATE, C. A.; LURIA, S. E. Stages in Colicin K Action, as Revealed by the Action of Trypsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.69, n. 8, p. 2030-2034, 1972.

REA, M.C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F.D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, T.M. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *Journal of Applied Microbiology*, v. 81, n. 1, p. 83–94, 1996.

REDDY, G.V., FRIEND, B. A., SHAHANI, K. M., AND FARMER, R. E. Antitumor activity of yogurt components. *Journal of Food Protection*, v.46, p. 8–11, 1983.

REIN, Dietrich; PAGLIERONI, Teresa G.; WUN, Ted; PEARSON, Debra A.; SCHMITZ, Harold H.; GOSSELIN, Robert; KEEN, Carl L. Cocoa inhibits platelet activation and function. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 72, n.1, p.30-35, 2000.

RIBEIRO, Aline Milles; ANDREOLLI, Ezequiel Felipe; MENEZES, Leidiane Andréia Acordi. *Elaboração de iogurte de chocolate com menta*. Medianeira, 2011. Trabalho de conclusão de curso (Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2011.

ROSSLAND, E.; LANGSRUD, T.; GRANUM, P.E.; SORHAUG, T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* cocultured in milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 98, n. 2, p.193-200, 2005.

RUAS-MADIEDO, Patricia; HUGENHOLTZ, Jeroen; ZOON, Pieterneela. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, v.12, n. 2-3, p. 163–171, 2002.

SAAVREDA, J.M. Microbes to fight microbes: a not so novel approach to controlling diarrheal diseases. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition*, v.21, n.2, p. 125-129, 1995.

SANBONGI, Chiaki; OSAKABE, Naomi; NATSUME, Midori; TAKIZAWA, Toshio; GOMI, Shuichi; OSAWA, Toshihiko. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vl. 46, n. 2, p. 454 - 457, 1998.

SANTA, Osmar Roberto Dalla; CARDOSO, Fernanda; MOTA, Graziela; BASTOS, Reinaldo Gaspar; RIGO, Maurício; SANTA, Herta Stutz Dalla. Avaliação sensorial de kefir sabor ameixa e morango. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 14, n4-4, p.77-85, 2008.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J.M.; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, n.3, p. 434-437, 2003.

SANTOS, João Paulo Victorino. *Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas*. Viçosa, 2008. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2008.

SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4ªed., coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglia, São Paulo, 2008, p. 1020. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7>. Acesso em: 10 abril. 2013.

SAVAIANO, Dennis A.; ABOUELANOUAR, Abdeihak; SMITH, David E.; LEVITT, Michael D. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in β -galactosidase-deficient individuals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 40, n. 6, p. 1219-1223, 1984.

SARKAR, S. Potencial of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, n.4, p. 280-290, 2007.

SCHNORR, Oliver; BROSSETTE, Tatjana; MOMMA, Tony Y.; KLEINBONGARD, Petra; KEEN, Carl L; SCHROETER, Hagen; SIES, Helmut. Cocoa flavanols lower vascular arginase activity in human endothelial cells in vitro and in erythrocytes in vivo. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 476, n.2, p. 211-215, 2008.

SHIOMI, M.; SASAKI, K.; MUROFUSHI, M.; AIBARA, K. Antitumor activity in mice orally administered polysaccharide from kefir grains. *Japanese Journal of Medical Science & Biology*, v. 35, n. 2, p.75–80, 1982.

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

STRINGHETA, Paulo César; DE OLIVEIRA, Tânia Toledo; GOMES, Ricardo Corrêa; DO AMARAL, Maria da Penha Henriques; DE CARVALHO, Antônio Fernandes; VILELA, Miriam Aparecida Pinto. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.2, p. 181-194, 2007.

SUPERINTENDÊNCIA DA ZONA FRANCA DE MANAUS, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Projeto potencialidades regionais estudo de viabilidade econômica: cacau, 2003. Disponível em: <http://www.suframa.gov.br/publicacoes/proj_pot_regionais/cacau.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2014.

TAKIZAWA, Satoru; KOJIMA Setsurou; TAMURA, Shunji ; FUJINAGA, Shigeo; BENNO, Yoshimi ; NAKASE, Takashi . The composition of the

Lactobacillus flora in kefir grains. *Systematic and Applied Microbiology*, v.21, n.1, p. 121-127, 1998.

TAMIME, A.Y. Fermented milks: a historical food with modern applications--a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 56, n. 4, p. S2-S15, 2002.

TAVAN, Emanuelle; CHANTAL, Cavuela; ANTOINE, Jean-Michel; TRUGNAN, Germain; CHAUGIER, Chantal; CASSAND, Pierrette. Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 23, n. 3, p. 477-483, 2002.

TEIXEIRA, Renata Cristina. *Produção de alimentos probióticos do tipo não-lácteo com células de Lactobacillus acidophilus LA-5 e chocolate*. Uberlândia, 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

TERRA, Flávio Marques. Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir. Brasília, 2007. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

TUOHY, Kieran M.; PROBERT, Hollie M.; SMEJKAL, Chris W.; GIBSON, Glenn R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today*, v.8, n. 15, p. 692-700, 2003.

UCHIDA, Masashi; ISHII, Itsuko; INOUE, Chika; AKISATO, Yoshie; WATANABE, Kenta; HOSOYAMA, Saori; TOIDA, Toshihiko; ARIYOSHI, Noritaka; KITADA, Mitsukazu. Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, v. 17, n. 9, p. 980-988, 2010.

VEER, Pieter van't; DEKKER, Jacqueline M.; LAMARS, Jos W. J.; KOK, Frans J.; SCHOUTEN, Evert G.; BRANTS, Henny A. M.; STURMANS, Ferd, HERMUS, Rudolph J. J. Consumption of fermented milk products and breast cancer: A case control study in the Netherlands. *Cancer Research*, v. 49, n. 15, p 4020–4023, 1989.

VIEIRA, Aline Colombo de Deus. *Os fatores que influenciam o processo de compra e consumo de chocolate*. Porto Alegre, 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Administração) – Escola de Administração, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

VINDEROLA, Gabriel; PERDIGÓN, Gabriela; DUARTE, Jairo; FARNWORTH, Edward; MATAR, Chantal. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 72, n.2, p. 195-202, 2005a.

VINDEROLA, Gabriel; PERDIGÓN, Gabriela; DUARTE, Jairo; FARNWORTH, Edward; MATAR, Chantal. Remote-site stimulation and duration of the immune response by kefir. *European Journal of Inflammation*, v. 3, n. 2, p. 63-73, 2005b.

VINDEROLA, Gabriel; PERDIGÓN, Gabriela; DUARTE, Jairo; FARNWORTH, Edward; MATAR, Chantal. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. *Journal of Dairy Research*, v. 73, n. 4, p.472-479, 2006a.

VINDEROLA, Gabriel; PERDIGÓN, Gabriela; DUARTE, Jairo; FARNWORTH, Edward; MATAR, Chantal. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine*, v. 36, n.5-6, p. 254-260, 2006b.

VINDEROLA, Gabriel; PERDIGÓN, Gabriela; DUARTE, Jairo; FARNWORTH, Edward; MATAR, Chantal. Effects of kefir fractions on innate immunity. *Immunobiology*, v. 211, n.3, p. 149-156, 2006c.

VUJIČIĆ, I.F.; VULIĆ, M.; KÖNYVES T. Assimilation of cholesterol in milk by kefir cultures. *Biotechnology Letters*, v. 14, n. 9, p. 847-850, 1992.

WANG, S. Y.; CHEN, H.C.; LIU, J. R.; CHEN, M. J. Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese kefir and viili starters. *Journal Dairy Science*, v.91, n. 10, p.3798–3805, 2008.

WANG, Yanping; XU, Nv; XI, Aodeng; AHMED, Zaheer; ZHANG, Bin; BAI, Xiaojia. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 84, n.2, p. 341-347, 2009.

WILLIAMSON, Gary; MANACH, Claudine. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v.81, n. 1, p. 243S-55S, 2005.

WOLLGAST, Jan; ANKLAM, Elke. Polyphenols in chocolate: is there a contribution to human health? *Food Research International*, v. 33, n. 6, p. 449-459, 2000.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia. Probióticos e prebióticos, 2011, p.29. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html>>. Acesso em: 29 jul. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. In: FAO Food and Nutrition paper 85, 2006. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

YÜKSEKDAĞ, Zehra Nur; BEYATLI, Yavuz; ASLIM, Belma. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, v. 37, n. 6, p. 663–667, 2004.

ZAJŠEK, Katja; GORŠEK, Andreja; KOLAR, Mitja. Cultivating conditions effects on kefir production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, v.139, n. 1-4, p. 970–977, 2013.

ZOURARI, Athéna; ANIFANTAKIS, E.M. Le kefir Caractères physico-chimiques, microbiologiques et nutritionnels. Technologie de production. Une revue. *Le Lait*, v. 68, n. 4, p.373- 391, 1988.

ZUGAIB, Antonio César Costa; DOS SANTOS, Almir Martins; MIDDLEJ, Rosalina Ramos; FILHO, Lindolfo Pereira Santos. Análise do mercado processador de cacau no Brasil vista sob o modelo estrutura-conduta-desempenho. CEPLAC/CEPEC/SESOE, 2005.