

Teor de lactose e contagem de microrganismos em leites fermentados por kefir: um estudo comparativo

Lactose concentration and microorganism count in fermented milks by Kefir: a comparative study

Letícia Corrêa Lopes*, Isabela Rosier Olimpio Pereira**

Universidade Presbiteriana Mackenzie – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Curso de Farmácia

RESUMO

Objetivo: Avaliar o efeito do tempo de fermentação e teor de gordura do leite sobre parâmetros fermentativos do kefir.

Materiais e Métodos: Amostras de leite integral (LI) e desnatado (LD) foram inoculadas com grãos de kefir por 48h a 25°C. Foram realizadas análises físico-químicas (pH, acidez, lactose) e microbiológicas (bactérias lácticas-BAL e leveduras) em amostras do início (T0), após 24 horas (T24) e 48 horas (T48). Considerou-se significativo * $p < 0,05$.

Resultados: Após 24h de fermentação houve redução (34%) do teor de lactose (%g/ml) de ambos os leites que não diferiram entre si (LI, de $4,3 \pm 0$ para $*2,8 \pm 0,5$; LD, de $4,0 \pm 0$ para $*2,6 \pm 0,1$), porém após 48h não houve diferença significativa em relação a 24h (LI $2,5 \pm 0,1$ e LD $2,5 \pm 0,1$). Foi observado aumento da acidez (% de ácido láctico) das amostras de leite integral e desnatado após 24h de fermentação em relação ao T0 (LI, de $0,17 \pm 0$ para $*0,74 \pm 0,01$; LD, de $0,16 \pm 0$ para $*0,88 \pm 0,05$), porém os valores para o leite desnatado foram significativamente maiores que o integral. A contagem de BAL variou de 10^8 a 10^9 UFC/ml e a de leveduras de 10^6 a 10^7 UFC/ml, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os tipos de leite nem entre tempos de fermentação.

Conclusão: A fermentação do leite por 24h com kefir reduziu significativamente o teor de lactose e elevou a contagem de bactérias lácticas e leveduras, independentemente do teor de gordura do leite utilizado. A fermentação por 48 horas não trouxe vantagem adicional sobre redução do teor de lactose nem contagem de microrganismos.

Palavras-chave: Kefir, lactose, intolerância à lactose, fermentação.

ABSTRACT

Objective: Evaluate the effect of fermentation time and milk fat content on fermentation parameters of kefir.

Material and Methods: Samples of whole milk (LI) and skimmed milk (LD) were inoculated with kefir grains for 48h at 25°C. Physicochemical (pH, acidity, lactose) and microbiological analyzes (BAL lactic bacteria and yeasts) were performed in samples from the beginning (T0), after 24 hours (T24) and 48 hours (T48). * $p < 0.05$ was considered significant.

Results: After 24h of fermentation, there was a significant reduction (34%) in the lactose content (%g/ml) of both milks, that did not differ among them (LI, 4.3 ± 0 to $*2.8 \pm 0.5$; LD, 4.0 ± 0 to $*2.6 \pm 0.1$), but after 48h there was no significant difference (LI 2.5 ± 0.1 and LD 2.5 ± 0.1). Acidity increase (% lactic acid) of whole and skim milk samples was observed after 24h of fermentation in relation to T0 (LI, $0,17 \pm 0$ to $*0,74 \pm 0,01$; LD, $0,16 \pm 0$ to $*0.88 \pm 0.05$), but the values for the skim milk were significantly higher than whole milk. The BAL count ranged from 10^8 to 10^9 UFC/ml and yeasts from 10^6 to 10^7 UFC/ml, but no significant differences were found between milk types and fermentation times.

Conclusion: The fermentation of milk for 24 hours with kefir significantly reduced the lactose content and increased the lactic acid and yeast counts, regardless of the fat content of the milk used. Fermentation for 48 hours did not bring additional advantage over lactose content reduction or microorganism count.

Keywords: Kefir, lactose, lactose intolerance, fermentation.

*Farmacêutica. leticiacorrealopes@yahoo.com.br

**Farmacêutica. isabela.pereira@mackenzie.br

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que 70% dos brasileiros adultos manifestam algum desconforto gastrointestinal após consumir leite de vaca ou derivados¹. A lactose é um dissacarídeo encontrado no leite e seus derivados que durante a digestão é hidrolisada em dois monossacarídeos (glicose e galactose), que são totalmente absorvidos pelo intestino delgado, através de transporte ativo dependente de sódio e mediado por carreador, e vão para a corrente sanguínea. Essa hidrólise é dependente da enzima beta galactosidase, conhecida como lactase, produzida pelos enterócitos, que são as células que revestem o intestino²⁻³.

Na maioria da população mundial, após o desmame, há um declínio gradual na atividade da lactase. Esse fenômeno, denominado hipolactasia primária do tipo adulto, é a forma mais comum de deficiência de lactase determinada geneticamente³. O que permite o consumo de leite por adultos, sem efeitos colaterais adversos, é um traço genético que possibilita a persistência de lactase no intestino, na vida adulta, denominada de lactase persistente⁴. O traço de lactase persistente na vida adulta tem herança autossômica dominante, enquanto a hipolactasia é herdada de forma autossômica recessiva³.

A intolerância a lactose manifesta-se quando a quantidade ingerida é superior à capacidade de hidrólise do intestino delgado, que promove a chegada da lactose ao cólon, onde será fermentada gerando ácidos orgânicos, dióxido de carbono e hidrogênio, que são responsáveis pela diarreia e pela flatulência⁵.

Pode ser do tipo primária (por um defeito intrínseco da enzima lactase) ou secundária (surge como resultado do comprometimento da mucosa intestinal). A do tipo primária é uma condição permanente, causada por deficiência de lactase após o desmame do leite materno, por deficiência congênita da lactase ou pode se manifestar em indivíduos adultos, que é o mais comum²⁻⁶. A do tipo secundária pode ocorrer em indivíduos afetados por diarreia infecciosa, desnutrição, alergia à proteína do leite, úlcera duodenal, fibrose cística, doença celíaca, colite ulcerativa, síndrome do cólon irritável, giardíase e uso prolongado de antibióticos. Como ocorre dano aos enterócitos, a produção da enzima lactase é afetada, e após uma dessas ocorrências a lactase é a enzima intestinal que mais demora para ter seus níveis reestabelecidos (1 a 8 meses)⁶. O processo do envelhecimento também pode promover a intolerância secundária².

Os leites pasteurizados devem obedecer aos regulamentos do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)²³, onde, de acordo com a

Portaria Nº 38/2018, em 100g de leite contém no mínimo 4,3g de lactose, e em 100ml de leite humano, pode-se encontrar 7g de lactose⁷. A maioria dos adultos e jovens diagnosticados com má digestão de lactose, pode ter um consumo diário de até 12g do dissacarídeo (quantidade equivalente a lactose encontrada em um copo de leite), sem manifestar sintomas característicos. Para este grupo, o ideal é o consumo de derivados lácteos com baixo teor de lactose, leites fermentados e probióticos⁵⁻⁸⁻⁹.

De acordo com “Food and Agriculture Organization” (FAO)¹⁰ da Organização Mundial de Saúde das Nações Unidas (OMS), probióticos são microorganismos vivos que administrados em quantidades adequadas modulam a microbiota intestinal estimulando a proliferação de bactérias boas em detrimento de bactérias potencialmente prejudiciais. Em geral, os benefícios atribuídos são: alívio dos sintomas causados pela intolerância à lactose, tratamento de diarreias, diminuição do colesterol séricos, aumento da resposta imune e efeitos anticarcinogênicos.

Um alimento com características probióticas que está sendo estudado por seus diversos benefícios, inclusive no alívio dos sintomas da intolerância a lactose, é o kefir. O kefir pode aumentar a tolerância a lactose, pois bactérias presentes nele e que se alojam no intestino, fermentam a lactose vinda da alimentação, por causa da elevada quantidade da enzima betagalactosidase presente em seus grãos¹¹⁻¹². Além disso, também possui propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas, antioxidante, antibacterianas, antifúngicas, imunomoduladoras e hipocolesterolêmicas¹³.

O kefir é o produto obtido da fermentação do leite pelos grãos de kefir de leite ou da fermentação de açúcar pelos grãos de kefir de água, também chamados de tibico. Esta fermentação, quando feita com leite, pode ser feita com leite de vaca, cabra ou ovelha. Se realizada em água, adiciona-se açúcar mascavo, leite de coco, extrato de arroz ou soja ou em sucos de frutas, sendo sua coloração dependente do substrato utilizado para cultivo. Existem diferenças na microbiota do fermentado, dependendo do substrato, procedência e tipo de grão utilizado⁵.

Os grãos do kefir de leite medem de 0,5 a 3,5cm de diâmetro e se parecem com partículas gelatinosas, brancas ou amarelas. Esses grãos contêm bactérias do ácido láctico, acético e uma mistura de leveduras aglomeradas com a caseína e um complexo de açúcares, unidos por uma matriz de polissacarídeos

referidos como kefir. É descrito como uma associação simbiótica, e sua composição microbiana pode variar em número e espécies de acordo com a fase de fermentação (ácido ou álcool) e as condições ambientais de inoculação, resultando em uma massa ligeiramente azeda, cujos vários microrganismos, que se associam simbioticamente, parecem conferir ao alimento propriedades terapêuticas⁵⁻¹⁴.

A forma de produção tradicional do kefir seria adicionar os grãos ao leite em um recipiente de vidro higienizado (de preferência esterilizado), onde a fermentação ocorre à temperatura ambiente ($\pm 25\text{C}^\circ$) por aproximadamente 24 horas. Após a fermentação, os grãos são coados, e o líquido resultante é o kefir, que pode ser consumido fresco ou maturado. A maturação seria realizar uma fermentação secundária por mais 24 ou 48 horas, sob refrigeração, para promover o crescimento de leveduras e a indução da fermentação alcoólica que acumulará etanol, CO_2 , vitaminas do complexo B e conferir sabor e aroma específicos à bebida. Os grãos coados podem ser adicionados novamente a mais leite, e o processo repetido infinitamente, enquanto os microrganismos estiverem em ambiente adequado⁵⁻¹⁵.

Segundo a Instrução Normativa nº 46 de 2007 do MAPA²³, o kefir é um produto da fermentação do leite pasteurizado ou esterilizado, cuja fermentação se dá com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono e se realiza com cultivos elaborados com os grãos de kefir, contendo espécies de bactérias dos gêneros *Lactobacilli*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus* e *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), permanecem ativos, viáveis, e abundantes no produto. A composição da microbiota dos grãos de kefir será definida conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas de manipulação.

O ácido láctico é o ácido orgânico produzido em maior concentração após a fermentação, e é formado a partir da fermentação da lactose, agindo como conservante natural. O produto é de alta digestibilidade, pela sua natureza coalhada, cujas proteínas sofreram desnaturação em vários graus, durante a fermentação, obtendo-se uma coalhada de partículas que são facilmente penetradas pelos sucos gástricos. Durante a fermentação também são formados alguns aminoácidos como a valina, leucina, lisina e serina¹⁵⁻¹⁶.

Terra¹⁷ avaliou as características físico-químicas do kefir, com ênfase no teor de lactose, em períodos de fermentação variados, comparando leite integral e semidesnatado. Foi observado que ambos os leites fermentados apresentaram comportamentos semelhantes e estatisticamente idênticos para os parâmetros analisados e que o teor de lactose foi reduzido significativamente após 24 horas de fermentação, em 39,8%, com tendência decrescente até 72 horas, analisando alíquotas a cada 12 horas de fermentação.

No presente estudo objetivou-se comparar o teor de lactose, pH, acidez e crescimento microbiológico dos leites integral e desnatado fermentados por grãos de kefir durante 48h, para deste modo avaliar o efeito do tempo de fermentação em relação ao teor de gordura do leite sobre parâmetros fermentativos do kefir.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa aqui realizada trata-se de um estudo original experimental prospectivo comparativo e auto-controlado com amostra de 6 repetições do experimento de fermentação, sendo 3 de leite desnatado e 3 de leite integral.

Para garantir o padrão bioquímico em todas as amostras utilizou-se os grãos de kefir de uma única origem (**Figura 1**), oriundas do Laboratório de Bromatologia da Universidade Presbiteriana Mackenzie, que estavam sendo cultivados desde 2016, e para garantir o padrão dos leites utilizados no processo de fermentação, utilizou-se leite UHT integral e desnatado de um mesmo fabricante, de um único lote escolhido ao acaso.



FIGURA 1 – Grãos utilizados para a fermentação. Foto do autor.

Os grãos foram inoculados ao leite (500ml) na proporção de 5% (m/m) em frascos de vidro com tampa de metal com capacidade para 600ml. A fermentação foi controlada a 25°C.

Foram coletadas alíquotas de 50 ml para as análises a: 24h e 48h, para cada leite (**Figura 2**), portanto o experimento foi constituído da análise de 12 alíquotas distintas, conforme o tempo de fermentação (24h, 48h) e o tipo de leite utilizado durante a fermentação (integral ou desnatado). Antes da inoculação dos grãos aos leites, foram realizadas as análises físico-químicas no tempo 0 (controle sem fermentação). As análises foram realizadas em duplicata para cada alíquota.

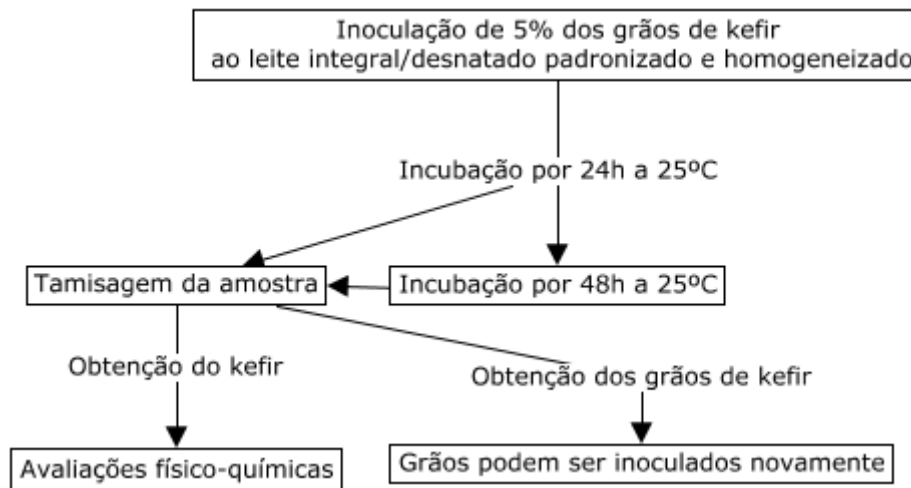


FIGURA 2. Fluxograma do processo de manipulação do kefir adotado durante o experimento

Foram realizadas determinação de pH; glicídios redutores em lactose; acidez em ácido láctico e umidade.

Os métodos analíticos utilizados seguiram os procedimentos técnicos descritos por IAL²⁹.

A acidez foi determinada através de uma titulação com hidróxido de sódio e calculada através da seguinte fórmula:

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

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

P = nº g ou ml da amostra

0,9 = fator de conversão para o ácido láctico

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

Para os glicídios redutores em lactose, foram utilizadas as soluções de Fehling tituladas, e o teor de lactose em 100g foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\frac{680}{V \times 5} = \text{lactose \%m/m}$$

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

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Aplevicz et al.¹⁸. A contagem de bactérias lácticas (BAL) foi realizada em meio MRS Agar em microaerofilia. Para as leveduras, utilizou-se o meio de cultura Potato Dextrose Agar em meio ácido, através da adição de 1,5 mL ácido tartárico 10% para cada 100 mL de meio, até pH 3,5. Todas as culturas foram semeadas e incubadas a 30°C por 48h, e em seguida foi feita a contagem.

Assepticamente, 0,05 g de cada amostra foi diluída em 450 uL de solução salina peptonada (NaCl 0,8% e peptona 0,1%) esterilizada prosseguindo com diluições seriadas de 10⁻³ a 10⁻⁶ para cada amostra¹⁷. O acompanhamento do crescimento foi feito através da contagem do número de células viáveis em logaritmo (log UFC/ml).

A avaliação dos resultados foi realizada com base nas médias das análises em triplicata, seguido pelos seus respectivos valores de desvio padrão com o emprego de análise estatística por teste T utilizando o programa Microsoft Excel®. Foram considerados significativos valores de p<0,05.

3 RESULTADOS

Avaliando-se a **Tabela 1**, pode-se observar que nas primeiras 24 horas ocorre consumo significativo (p<0,05) de lactose dos leites ao longo da fermentação tanto para o leite integral, como desnatado, resultando em uma tendência decrescente no valor do teor de lactose com o aumento do tempo de fermentação. Não houve diferença significativa em 48 horas de fermentação para nenhum dos leites, assim como não houve diferença significativa (p>0,05) de redução no teor de lactose quando comparados os leites integral e desnatado.

TABELA 1. Valores médios de parâmetros físico-químicos do leite integral e desnatado e seus fermentados.

Parâmetros	Tratamentos					
	LI	LD	KI 24h	KI 48h	KD 24h	KD 48h
Lactose (%)	4,26	3,94	2,79	2,45	2,61	2,54
Ác. Lático (%)	0,17	0,16	0,74	0,95	0,88	1,11
pH	6,76	6,76	4,29	3,91	4,30	3,93

LI = leite integral; LD = leite desnatado; KI 24, KI 48 = leite integral fermentado; KD 24, KD 48 = leite desnatado fermentado

A **Figura 3** ilustra a variação do teor de lactose dos fermentados de leite integral e desnatado.

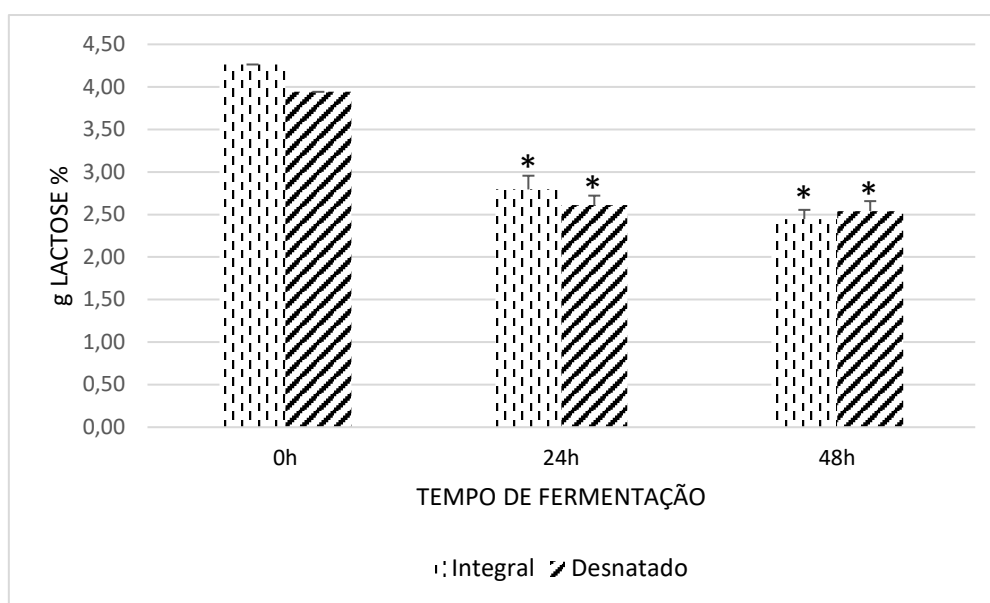


FIGURA 3 – Comparação do teor de lactose ao longo do tempo de fermentação dos leites integral e desnatado (símbolos diferentes indicam diferença significativa em relação ao respectivo valor anterior de tempo de fermentação ou na comparação entre os tipos de leite dentro do mesmo tempo ($p < 0,05$)).

Na **Figura 4** a redução do teor de lactose foi apresentada em porcentagem. Foi possível identificar uma redução de 34,44% de lactose nas primeiras 24 horas, no leite integral, e de mais 12,42%, em 48 horas de fermentação. No leite desnatado, a redução em 24 horas foi de 33,74%, seguida por uma redução de 2,69% em 48 horas. Porém, só houve significância destes resultados em 24 horas de fermentação.

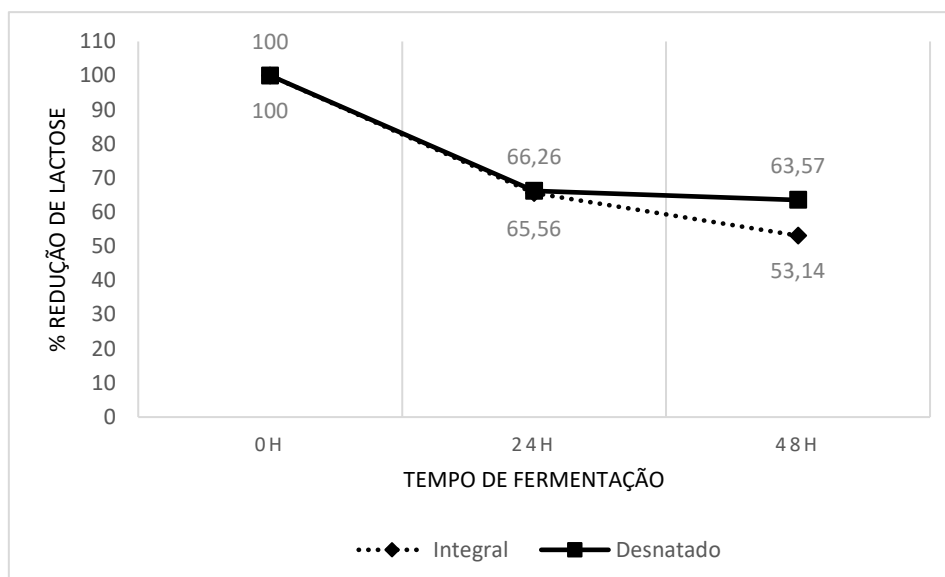


FIGURA 4 – Comparação na porcentagem de redução de lactose durante a fermentação dos leites integral e desnatado.

A **Figura 5** mostra os resultados obtidos para a avaliação de pH nas amostras de leite desnatado e integral ao longo do tempo. Foi observada uma redução significativa de pH, tanto nas amostras de leite integral como desnatado, em 24 horas de fermentação em relação ao tempo 0, como em 48 horas em relação a 24 horas ($p < 0,05$). Ambos os leites apresentaram valores de pH muito próximos ao longo da fermentação, não apresentando diferença significativa entre eles.

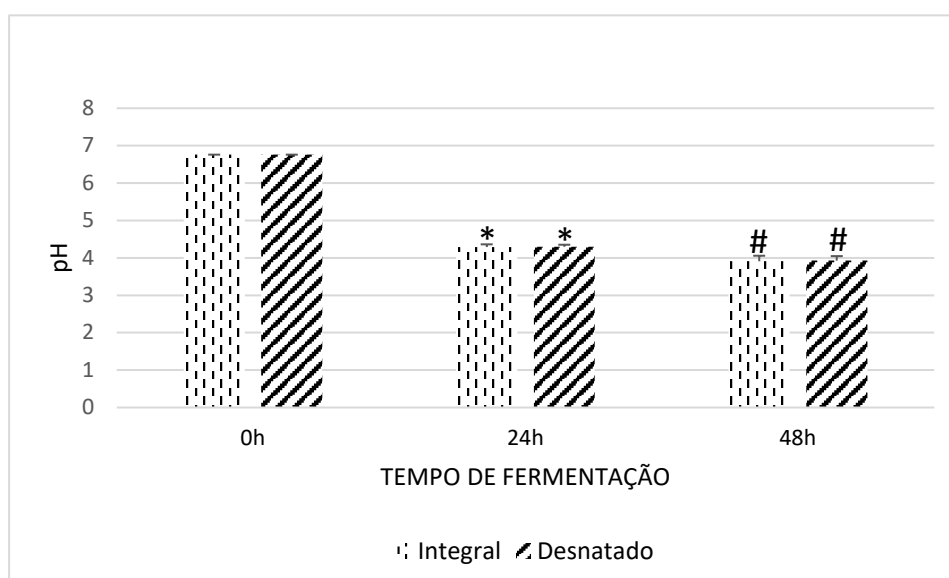


FIGURA 5 – Comparação de médias \pm desvio padrão das medidas de pH ao tempo de fermentação das amostras de leite integral e desnatado (símbolos diferentes indicam diferença significativa em relação ao respectivo valor anterior de tempo de fermentação ou na comparação entre os tipos de leite dentro do mesmo tempo ($p < 0,05$)).

O aumento da acidez do fermentado foi significativo no leite integral em 24 horas ($p < 0,05$), porém não se acentuou de forma significativa em 48 horas, em relação a 24 horas. Já no leite desnatado, houve diferença significativa sequencial em 24 e 48 horas ($p < 0,05$) (**Figura 6**). Também foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) em 24 horas entre os tipos de leite, onde o leite desnatado apresentou maior porcentagem de ácido lático do que o leite integral.

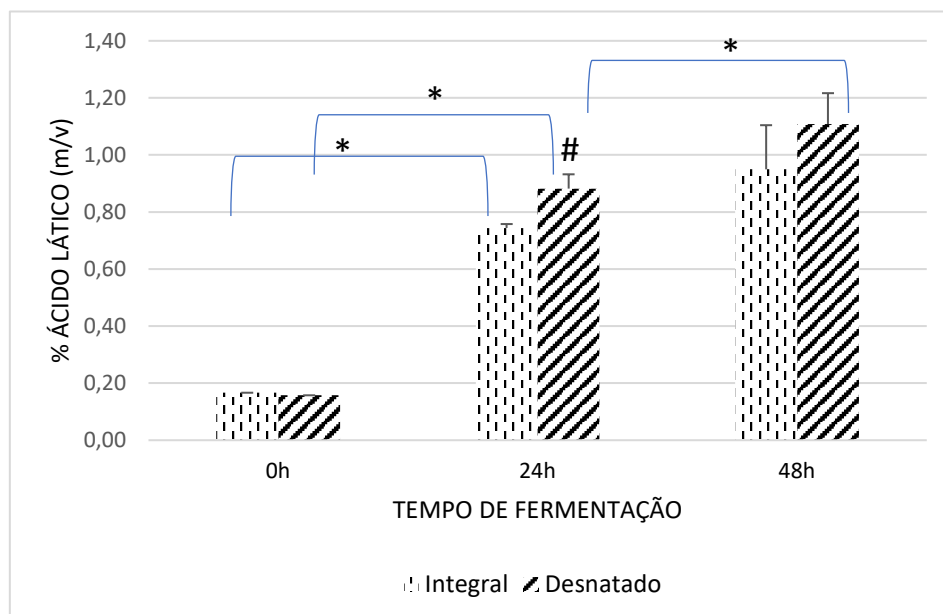


FIGURA 6 – Comparação médias \pm desvio padrão das medidas da % (m/v) de ácido lático produzido ao longo da fermentação de leite integral e desnatado (* indica diferença significativa ($p < 0,05$) na comparação entre tipos de leite dentro do mesmo tempo de fermentação, # indica diferença significativa na comparação entre os tipos de leite dentro do mesmo tempo de fermentação).

A **Tabela 2** mostra a contagem de bactérias lácticas e a **Tabela 3**, de leveduras, encontradas após os tempos de fermentação. O crescimento das bactérias ácido láticas e leveduras nos leites fermentados por grãos de kefir não apresentaram diferença significativa nos períodos de 24 horas e 48 horas. Não houve diferença de crescimento microbiano entre os leites integral e desnatado.

TABELA 2. Contagem de bactérias ácido lácticas (BAL) nos leites integral (LI) e desnatado (LD) fermentados por grãos de kefir por 24 horas e 48 horas expressa em logaritmo (média±desvio padrão) de unidades formadoras de colônia por ml (log UFC/ml). Valor p indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Contagem de BAL	Tipo de Leite			
	Leite Integral		Leite Desnatado	
log UFC/ml (média ± DP)	24h	48h	24h	48h
	9,06±0,43	9,16±0,58	8,63±0,32	8,74±0,69
p (24hx48h)	0,52		0,73	
p 24h (LIxLD)	0,37			
p 48h (LIxLD)	0,58			

Fonte: A autoria própria (2018).

TABELA 3. Contagem de leveduras nos leites integral (LI) e desnatado (LD) fermentados por grãos de kefir por 24 horas e 48 horas expressa em logaritmo (média±desvio padrão) de unidades formadoras de colônia por ml (log UFC/ml). Valor p indica diferença significativa ($p < 0,05$).

Contagem de Leveduras	Tipo de Leite			
	Leite Integral		Leite Desnatado	
log UFC/ml (média ± DP)	24h	48h	24h	48h
	7,24±0,34	7,75±0,64	6,45±0,47	6,02±0,03
p (24hx48h)	0,25		0,44	
p 24h (LIxLD)	0,19			
p 48h (LIxLD)	0,06			

Fonte: A autoria própria (2018).

4 DISCUSSÃO

A tendência decrescente no teor de lactose nos leites fermentados com diferentes teores de gordura (integral e semi-desnatado) também foi encontrada nos estudos de Terra¹⁷, onde a fermentação foi feita com um inóculo de 8% em 200ml de leite, em temperatura ambiente. Seu estudo apresentou uma redução do teor de lactose de 39,8% em 24 horas e de 41% em 48 horas de fermentação do leite integral. No leite semidesnatado a redução no fermentado de 24 horas foi de 39%, e em 48 horas a redução também foi de 41%. O estudo acompanhou a redução até 72 horas de fermentação, e os valores encontrados de teor de

lactose em ambos os leites foram superiores ao do leite de baixo teor de lactose. De modo semelhante, nosso estudo mostrou que em 24 horas a diferença de redução foi significativa (**Figura 3**), porém a redução em 48 horas foi inferior aos estudos de Terra¹⁷.

De acordo com os estudos de Irigoyen et al.¹⁹, onde a fermentação foi feita com leite integral e inoculado a 5% de grãos, a 25°C, foi observada uma redução de 20-25% nos teores de lactose nas primeiras 24 horas de fermentação, em relação aos valores iniciais presentes no leite integral, um valor menor do que encontrado no presente trabalho (**Figura 4**).

Essas diferenças podem ser dadas pela quantidade de leite utilizada para a fermentação, onde Weschenfelder et al.¹⁵, utilizando concentrações de grãos e leite de 1:10 e 1:5, encontrou uma redução menor da lactose em uma maior quantidade de leite, comparado ao uso de menor quantidade de leite, considerando os níveis iniciais de lactose.

Mascarenhas²⁰, avaliando o teor de lactose, constatou em seu trabalho que o iogurte natural (4,06% de lactose), apesar de possuir menos lactose do que o leite (4,86%), possui mais lactose do que o leite fermentado por kefir por 24 horas (3,90%), sendo o último, o mais aconselhável para o consumo, por pessoas intolerantes à lactose, além de apresentar menor acidez que o fermentado de 48 horas. O teor de lactose do leite integral encontrado por Mascarenhas²⁰ foi um pouco acima do encontrado neste trabalho (4,26%), assim como o do fermentado de 24 horas (2,79%) para o leite integral (**Tabela 1**). Valores superiores podem ter sido encontrados pois a autora inoculou o leite com 2% de grãos de kefir, quantidade inferior à deste estudo (5%).

Rocha-Gomes¹³, utilizando 10% de grãos, na fermentação por 48 horas obteve 3,16% de lactose no leite integral (LI) e 2,37% no desnatado (LD). Com isso, encontrou redução significativa no teor de lactose, a partir de um valor inicial de 4,23% LI e 4,93% LD. Os valores encontrados neste trabalho (**Tabela 1**) foram similares para o fermentado de LD em 48 horas (2,54%) e inferiores para o fermentado de LI (2,45%). Apesar disso, todos os resultados indicam que a microbiota presente nos grãos de kefir, consome boa parte da lactose durante a fermentação de ambos os tipos de leite, para a formação de ácido láctico (**Figura 6**).

Irigoyen et al.¹⁹ analisou também a presença de galactose, que não foi detectada na forma livre, pois a galactose formada pela hidrólise da lactose é

utilizada pelos microrganismos do kefir para formar o polímero kefiran, e formar novos grãos, durante a fermentação.

Como o grau de gravidade da intolerância a lactose pode variar, o limite de ingestão de lactose é diferente para cada indivíduo, para que não cause desconfortos gastrointestinais. A maioria dos intolerantes consegue tolerar cerca de 12g de lactose por dia (equivale a aproximadamente 250ml de leite) e quando essa quantidade é consumida em porções menores ao longo do dia, existe maior tolerância, e as manifestações clínicas podem não ser observadas⁸⁻⁹⁻²¹. De acordo com o presente trabalho, 50ml da alíquota de leite integral fermentados por 24 horas por kefir a 5% de grãos apresentou 2,79g de lactose, comparado a 4,26g encontrados no T0, tornando aceitável para um intolerante consumir em média 200ml de fermentado por dia, sem apresentar desconforto. O mesmo pode ser observado para o leite desnatado (**Tabela 1**).

Além da redução do teor de lactose dos leites fermentados por grãos de kefir, que facilita a ingestão dos mesmos por intolerantes, vale ressaltar que os probióticos possuem efeito sobre o equilíbrio bacteriano intestinal e ajudam a controlar diarreias (sintoma característico da intolerância) e melhoram o funcionamento intestinal²⁰.

A avaliação do pH nos leites fermentados indica que, quanto maior o tempo de fermentação, menor o pH do fermentado (**Figura 5**), o que pode interferir na preferência de palatabilidade, uma vez que o kefir possui um sabor e odor característico e de teor ácido, que difere dos fermentados industriais que os indivíduos estão habituados a consumir²⁰.

Espera-se que ocorra uma diminuição de pH e um aumento da acidez, já que o ácido láctico é o ácido orgânico produzido em maior concentração após a fermentação das bactérias ácido-láticas, acidificando o meio. Como no kefir também participam bactérias acéticas, ácido acético também é produzido e acentua o sabor ácido do produto. Esta acidez auxilia na absorção e utilização dos nutrientes pelo organismo, além de prevenir possíveis doenças transmitidas por alimentos¹⁶⁻²². Nos estudos de Irigoyen et al.¹⁹ e Rocha-Gomes¹³, também foi encontrada queda do pH durante a fermentação, na presença dos grãos.

A acidez dos leites fermentados deve estar entre 0,6 a 2,0g/100ml³⁰. As amostras fermentadas pelo kefir apresentaram em média 0,74g/100ml para o leite integral em 24h, e 0,88g/100ml para o leite desnatado. Esse aumento da acidez pode ser observado em ambas as amostras do fermentado em 24 horas,

porém, a maior concentração de ácido láctico nos fermentados de leite desnatado pode indicar que o menor teor de gorduras diminui a produção de ácido acético e desvie para uma maior produção de ácido láctico²⁴.

O ácido acético também é produzido por bactérias ácido lácticas através da hidrólise da gordura do leite e pode interagir com a membrana celular e causar acidificação intracelular e desnaturação das proteínas. Ele age sinergicamente com o ácido láctico diminuindo o pH do meio¹⁶.

Como não houve diferença significativa na redução de pH entre os tipos de leite (**Figura 5**), pode-se supor que a produção de ácido acético e ácido láctico tenha sido equilibrada de acordo com o teor de gordura das amostras.

A contagem de BAL variou de 10^8 a 10^9 UFC/ml e a de leveduras de 10^6 a 10^7 UFC/ml, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os tipos de leite nem entre tempos de fermentação. No estudo de Irigoyen et al.¹⁹, a contagem de BAL foi de 10^8 UFC/ml nos primeiros dois dias de fermentação, decrescendo até o décimo quarto dia de armazenamento, e a contagem de leveduras foi de 10^5 UFC/ml e manteve-se constante durante 28 dias de armazenamento para o inoculado com 5% de grãos de kefir, ligeiramente abaixo do encontrado neste trabalho.

De acordo com o MAPA²³, os leites fermentados por kefir devem ter mínimo de 10^7 UFC/ml de bactérias lácticas totais, incluindo o iogurte, e mínimo de 10^4 UFC/ml de leveduras, o que mostra que os valores de microrganismos encontrados neste trabalho estão dentro dos requisitos da legislação.

Nos estudos de Kivanc²⁵, com inoculação de 5% de grãos de kefir em leite integral, em 24 horas de fermentação a contagem de BAL foi para 6,44 Log UFC/ml e de leveduras aumentou para 5,78 Log UFC/ml. A diferença nos valores encontrados no presente trabalho pode se dar devido a condições experimentais distintas de temperatura de fermentação, qualidade do leite e ambiente, pois a composição de microrganismos dos grãos varia de acordo com a região do mundo⁵.

Os lactobacilos presentes em probióticos, como o kefir, possuem uma particular importância para os indivíduos intolerantes à lactose, devido a capacidade de diminuir a concentração da lactose por sua hidrólise durante a fermentação, aumentar a atividade da enzima lactase no intestino delgado e diminuir a velocidade do esvaziamento gástrico, que também influencia na melhor digestão da lactose²⁶⁻²⁷.

Os probióticos também demonstraram ter um efeito inibitório no crescimento de bactérias patogênicas, aderência as células epiteliais intestinais, resistência a acidez do estômago e ter efeitos positivos na saúde do indivíduo. Além disso, alteram o metabolismo microbiano, diminuindo ou aumentando a atividade enzimática e estimulam a imunidade do hospedeiro²⁵⁻²⁸.

A fermentação do leite por 24h com kefir reduz significativamente o teor de lactose, com conseqüente aumento de acidez e da contagem de bactérias lácticas e leveduras no leite fermentado, independentemente do tipo de leite utilizado para fermentação, exceto para a acidez do leite desnatado fermentado que é maior que a do leite integral, onde este fator pode influenciar na preferência em relação a palatabilidade. A fermentação por 48 horas não trouxe vantagem adicional sobre redução do teor de lactose nem contagem de microrganismos viáveis.

Para observar outras possíveis diferenças significativas em relação a acidez, redução no teor de lactose e influência no crescimento microbiológico será necessário um período de fermentação mais longo, juntamente com um maior número de replicatas.

5 REFERÊNCIAS

- 1 – Casagrande M, Pistorello RI, Bisi B. Intolerância a lactose. Mostra IFTEC em Resumos. 2015; (3).
- 2 – Fernandes TF. Intolerância à lactose. Revista ABCFARMA. 2015; 40-45.
- 3 – Pretto FM, Silveira TR, Menegaz V, Oliveira JD. Lactose malabsorption in children and adolescents: diagnosis through breath hydrogen test using cow milk. *Jornal de pediatria*. 2002; 78(3):213-218.
- 4 – Jones BL, Oljira T, Liebert A, Zmarz P, Montalva N, Tarekeyn A, Swallow DM. Diversity of lactase persistence in African milk drinkers. *Human genetics*. 2015; 134(8):917-925.
- 5 – Francisco DC. Kefir: uma alternativa funcional? [monografia]. Brasília: Universidade Católica de Brasília, Escola de Saúde, 2016.
- 6 – Téo CRPA. Intolerância à lactose: uma breve revisão para o cuidado nutricional. *Arq Ciências da Saúde da UNIPAR*. 2002; 6(3).
- 7 – Mattar R, Mazo DFDC. (2010). Intolerância à lactose: mudança de paradigmas com a biologia molecular. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010; 56(2):230-236.
- 8 – Vonk RJ, Priebe MG, Koetse HA, Stellaard F, Lenoir-Wijnkoop I, Antoine JM, Huang CY. Lactose intolerance: analysis of underlying factors. *European journal of clinical investigation*. 2003; 33(1):70-75.
- 9 – Pereira MCS, Brumano LP, Kamiyama CM, Pereira JPF, Rodarte MP, de Oliveira Pinto MA. Lácteos com baixo teor de lactose: uma necessidade para portadores de má digestão da lactose e um nicho de mercado. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes*. 2012; 67(389):57-65.
- 10 – FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working group report. London: World Health Organization, 2002.
- 11 – Silanikove N., Leitner G., Merin U. The interrelationships between lactose intolerance and the modern dairy industry: global perspectives in evolutionary and historical backgrounds. *Nutrients*. 2016; 7(9):7312-7331.
- 12 – Quilici FA, Missio A. Intolerância a lactose [Internet]. Campinas (São Paulo): Sociedade Integrada de gastroenterologia; 2004 [acesso em: 11 nov 2018]. Disponível em: <<http://www.unigastrocampinas.com.br/artigos/intolerancia.pdf>>
- 13 – Rocha-Gomes A, Escobar A, Soares JS, Silva AAD, Dessimoni-Pinto NAV, Riul TR. Chemical composition and hypocholesterolemic effect of milk kefir and water kefir in Wistar rats. *Revista de Nutrição*. 2018; 31(2):137-145.
- 14 – Otles S, Cagindi O. Kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2003; 2(2):54-59.

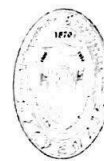
- 15 – Weschenfelder S, Pereira GDM., Carvalho HHC., Wiest JM. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. *Arq bras med veterinária e zootecnia*. 2011 Abr; 63 (2):473-480.
- 16 – Martins LSP. Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentado pelos grãos de Kefir e do Tibet utilizando técnicas voltamétricas e HPLC [dissertação]. São Carlos: Universidade de São Paulo, 2006.
- 17 – Terra FM. Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir [monografia]. Brasília: Universidade de Brasília; 2007.
- 18 – Aplevicz KS, Ogliari PJ, Sant'Anna ES. Influence of fermentation time on characteristics of sourdough bread. *J Bras Ciências Farmacêuticas*. 2013; 49(2):233-239.
- 19 – Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibanez FC (2005). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*. 2005; 90(4):613-620.
- 20 – Mascarenhas M. QualiKefir: avaliação da qualidade físico-química e sensorial em produtos derivados de kefir, leite e iogurte líquido natural [dissertação]. Peniche: Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto politécnico de Leiria, 2012.
- 21 – Soares LF, Peracini LC, de Freitas S, Ferreira FP, dos Santos LF, Manhani LC, Manochio-Pina MG. Aspectos nutricionais e metabólicos da intolerância à lactose. *Investigação*. 2016; 15(4).
- 22 – Silva, JE. A. Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos. São Paulo: Varela, 1995. 352p.
- 23 – Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº46. Diário Oficial da União; (23 out, 2007).
- 24 – Fontaneli, RS. Fatores que afetam a composição e as características físicoquímicas do leite. 2001; 19:09-15. Disponível em: <[www. ufrgs. br/bioquímica/posgrad/BTA/química_leite. pdf](http://www.ufrgs.br/bioquímica/posgrad/BTA/química_leite.pdf)> [Acesso em 11 nov de 18]
- 25 – Kivanc M, Yapici E. Survival of Escherichia coli O157: H7 and Staphylococcus aureus during the fermentation and storage of kefir [internet]. Campinas (São Paulo): Food Science and Technology; 2018. [acesso em: 12 nov 2018]. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1590/fst.39517>>
- 26 – Pinto LPS, Almeida PC, Baracho M, Simioni PU. O uso de probióticos para o tratamento do quadro de intolerância à lactose. *Ciência & Inovação*. 2018; 2(1).
- 27 – Varavallo MA, Thomé JN, Teshima E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Semina: Ciências biológicas e da saúde*. 2008; 29(1):83-104.
- 28 – da Cunha MET, Sugimoto HH, de Oliveira AN, Sivieri K, de Rezende Costa M. Intolerância à lactose e Alternativas tecnológicas. *Journal of Health Sciences*. 2015; 10(2).

29 – Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 2008. p. 205-206.

30 – Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº38, Diário Oficial da União; (26 abr, 2018).



UNIVERSIDADE PRESBITERIANA MACKENZIE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
ANEXO 7



DECLARAÇÃO DE CONFORMIDADE DE CONTEÚDO

Declaro ter atualizado do conteúdo do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado e que cumprimos as determinações da banca examinadora na versão final entregue do Trabalho de Conclusão de Curso. Esta cópia preenchida e assinada deverá ser entregue no prazo determinado pelo professor da disciplina de TCC anexada à cópia digitalizada da versão final do trabalho, no Moodle da disciplina.

Nome do Orientador: Isabela Rosier Olimpio DRT: 113177-9

Assinatura: Isabela Rosier Olimpio Data: 10 / 12 / 18

Nome do Aluno: Letícia Corrêa Lopes Matrícula: 31422462

Assinatura: Letícia Lopes Data: 10 / 12 / 18

Titulo final do trabalho Teor de lactose e contagem de microrganismos em leites fermentados por Kefir: Um estudo comparativo