

MARCOS COELHO BISSOLI

**Respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão  
de ração suplementada com quefir**

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maurício  
Schneedorf Ferreira da Silva

UNIFENAS  
Alfenas-MG  
2005

MARCOS COELHO BISSOLI

**Respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão  
de ração suplementada com quefir**

Dissertação apresentada à UNIFENAS, como parte das exigências do Programa de Mestrado em Ciência Animal, para obtenção do Título de Mestre.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maurício  
Schneedorf Ferreira da Silva**

**UNIFENAS  
Alfenas-MG  
2005**

## FICHA CATALOGRÁFICA

BISSOLI, Marcos Coelho

Respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão de quefir./ Marcos Coelho Bissoli. Alfenas: UNIFENAS, 2005.

48p.

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira da Silva.

Dissertação (Mestrado - Ciência Animal), Universidade José do Rosário Vellano.

1. Alimentação terapêutica- 2. Nutrição- 3. Suplementação alimentar.

CDU: 521.2

## DEDICATÓRIA

Aos coelhos “participantes” da pesquisa, com quem tive pouco contato, mas de respeito e carinho.

À minha “mãedrinha” Maria Lúcia e à minha “Tia” Héliida, por terem me iniciado na arte da escrita.

## AGRADECIMENTOS

Àqueles que, sem ter nada a ver com a história, me permitiram compartilhar de um lar e uma família. Obrigado por participar de toda minha infância e adolescência: Maria Lúcia (Tia Madrinha), Maria de Nazareth (Vovó Nazareth), Orlando (Vovô da Cabeça Pequena) e Paulo Sérgio (Tio Au-Au).

Ao meu amigo e orientador, José Maurício. Ao arriscar-se aceitando-me como seu orientado, entregou-se totalmente, principalmente em meus difíceis momentos da vida particular. Outrossim, por sua sapiência na arte de produzir e estimular a produção de ciência.

Ao Paulo Romeu, por nunca ter deixado falhar minha saúde, alimentação e educação. Mas, principalmente, por ser um exemplo de coerência ética, empenho no trabalho, inteligência, cultura, alegria.

À Elizabeth, por ainda conseguir transmitir-me afeição apesar de toda a distância.

À minha irmã Cecília, por ter sido tão crucial na coleta de material para este estudo. Mas, principalmente, por vir se tornando cada vez mais uma grande amiga, capaz de me ouvir e até mesmo me entender, e me servir de exemplo de uma pessoa que transmite bondade a todos e que se dedica com afinco à sua profissão.

Analogamente, obrigado Alice (muito especialmente), João, Luís Gustavo, Dennys, Marlon, Sapo Cururu e Rafaela, por terem colocado a mão na massa em momentos cruciais dos experimentos.

Às minhas escolas formais: Soneca, Gasparzinho, Salesiano de Rocha Miranda e Curso Projeção.

Ao Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, por ter me concedido o grau de uma profissão apaixonante: Nutrição. Especialmente, às professoras Haydeé Lanzillotti, Joyce do Valle e Eliane Soares, por terem me incentivado e me orientado nos primeiros passos (na verdade em quase todos eles) da pesquisa na área de saúde humana (a única justificável).

À Universidade José do Rosário Vellano, por provavelmente me conceder o título de mestre.

À CAPES e à FAPEMIG, por não terem me concedido bolsas de estudo, possibilitando-me continuar trabalhando durante o mestrado, e não ter me exigido relatórios periódicos.

Ao Movimento Estudantil de Nutrição (minha verdadeira graduação foi passada no Centro Acadêmico de Nutrição da UERJ e na Executiva Nacional dos Estudantes de Nutrição, onde aprendi, antes de tudo, a ser um cidadão ético, crítico e comprometido com a justiça social);

Às instituições onde até hoje trabalhei, em minha carreira insubstituível de docente (obrigado UFOP, UERJ, Unifenas, Efoa, FUOM, UNIS, FMI e Univás);

A todos os meus alunos, passados e atuais (vocês sempre serão meus verdadeiros mestres. Minha motivação de continuar atuando como docente e de existir como ser social);

Aos amigos, alunos-mestres, Dennys e Michel (sem a participação de vocês, especialmente no momento de concluir, esta dissertação contaria uma história bastante diferente e provavelmente pouco verdadeira);

Finalmente, seria injusto aqui correr o risco de deixar de citar o nome de qualquer um de meus amigos. Vocês são o bem mais valioso que carrego em meu coração. Em nenhum momento de minha vida jamais esquecerei de qualquer um de vocês. Vocês me movem no sentido do fazer o bem e bem feito.

À professora Rosely por, aceitando gentilmente o convite, ter contribuído com debates positivos para a redação deste documento final;

À Juliana Pereira (minha instrutora de Análise de Alimentos), Laisa, Marcela, Carol, ... Nós bem que tentamos. Mas o que valeu mesmo foi a dedicação e empenho demonstrado por vocês;

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANAVA – análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

FOSHU – Alimentos para Uso Específico em Saúde (*Food for specific Health Use*)

FUFOSE – Ciência do Alimento Funcional Européia (*Functional Food Science in Europe*)

HDL – lipoproteína de alta densidade (*High Density Lipoprotein*)

ILSI – Instituto Internacional de Ciência da Vida (*International Life Science Institute*)

LDL – lipoproteína de baixa densidade (*low density lipoprotein*)

QIN – quefir *in natura*

QL – quefir liofilizado

Susp – suspensão de quefir

UFC – unidade formadora de colônia

UFLA – Universidade Federal de Lavras

Unifenas – Universidade José do Rosário Vellano

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low Density Lipoprotein*)

## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão de diferentes apresentações de rações formuladas com quefir. Para tanto, utilizaram-se 40 animais distribuídos em um delineamento em blocos casualizados cujas fontes de variação consideradas foram sexo e tratamento. Foram administradas quatro apresentações de rações industrializadas peletizadas reconstituídas artesanalmente: 1) controle; 2) adicionada de quefir liofilizado; 3) adicionada de suspensão de quefir; 4) adicionada de quefir *in natura*. Os animais, após o período de desmame e adaptação à ração, foram submetidos a 30 dias de experimentos, recebendo as diferentes rações. O crescimento foi avaliado levando-se em consideração os pesos inicial e final e o consumo de ração. Amostras de sangue foram coletadas antes do início do experimento e aos 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias de administração das rações. Foram analisados HDL, VLDL, colesterol total, LDL, e triglicérides. O índice II de Castelli foi calculado a partir da divisão de LDL por HDL. A análise estatística do índice de crescimento foi feita através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Os valores lipidêmicos foram contrastados por análises de taxas de inclinação de curvas de regressão linear (teste de *slope*). Os resultados indicaram que apenas os coelhos que receberam quefir *in natura* tiveram alteração de crescimento, sendo significativamente menor que o dos demais ( $p < 0,05$ ). Apenas as frações de colesterol total e HDL apresentaram aumentos significativos ( $p < 0,05$ ). Tal fato ocorreu apenas nos animais que receberam formulações suplementadas com quefir *in natura*. A análise do índice II de Castelli levou a crer que apenas o aumento do HDL deva ser considerado. Concluiu-se que a administração de quefir pode não ser vantajosa sob o ponto de vista da produção animal à análise dos resultados do índice de crescimento. Sob o ponto de vista da saúde humana, inferiu-se que o probiótico pode apresentar vantagens em terapêuticas para controle de peso e em ações profiláticas contra dislipidemias. No entanto, outros estudos são incentivados no sentido de esclarecer melhor os possíveis riscos do consumo contínuo do quefir.

## ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate the lipidemic responses of rabbits to the intake of different rations formulated with kefir. Therefore, 40 animals were separated into randomized blocks whose variation sources were sex and treatment. Four personally reconstituted pelletized industrial rations were administered: (1) control; (2) lyophilized kefir; (3) kefir suspension; and (4) *in natura* kefir. After weaning and adaptation to the ration, the animals were submitted to 30 days of experiment, when they ingested the different rations. Growth was assessed taking into account the initial and final weight, and ration consumption. Blood samples were taken before the beginning of the experiment, and on the 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days of ration administration. HDL, VLDL, total cholesterol, LDL, and triglycerides were analyzed. The Castelli II index was calculated by dividing LDL by HDL. The statistical analyzes of the growth index was made by the nonparametric test of Mann-Whitney. The lipidemic values were contrasted by analyses of the inclination of linear regression curves (slope tests). The results indicate that only the rabbits who received *in natura* kefir had significantly lesser growth than the others ( $p < 0,05$ ). Only fraction of total cholesterol and HDL had significant increase ( $p < 0,05$ ), and it occurred only in the *in natura* kefir animals. The Castelli II index indicated that only HDL increase should be considered. It was concluded that kefir administration may not be advantageous from the viewpoint of animal production as revealed by the analysis of the results of growth indexes. For human health, this probiotic can be useful for weight control therapies and prophylactic actions against dyslipidemies. However, further studies should be stimulated in order to better explain possible risks of kefir continuous consumption.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	14
2.1.1 HISTÓRICO E DEFINIÇÃO	14
2.1.2 PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS E SIMBIÓTICOS	15
2.1.2.1 HISTÓRICO E CONCEITOS	15
2.1.2.2 PROBIÓTICOS	17
2.1.2.2.1 EFEITOS DOS PROBIÓTICOS SOBRE A LIPIDEMIA	19
2.1.2.3 PREBIÓTICOS	21
2.1.2.4 QUEFIR	22
2.1.2.4.1 HISTÓRICO E CONCEITOS	22
2.1.2.4.2 COMPOSIÇÃO DO QUEFIR	24
2.1.2.4.3 PROPRIEDADES SIMBIÓTICAS	29
2.1.2.4.4 INOCUIDADE DO QUEFIR	31
2.2 METABOLISMO DE LIPÍDIOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 CULTURA DO QUEFIR	34
3.2 ANIMAIS	34
3.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
3.4 ANÁLISE DE CRESCIMENTO	35
3.5 ANÁLISE DA RESPOSTA LIPIDÊMICA	36
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4 RESULTADOS	38
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÕES	48
7 REFERÊNCIAS	51

## 1 INTRODUÇÃO

O *International Life Sciences Institute* (ILSI) europeu define alimento funcional como aquele que tem “propriedades satisfatoriamente demonstradas de afetar uma ou mais funções-alvo no corpo, através de efeitos nutricionais adequados, no sentido de melhorar o estado de saúde e bem-estar, e/ou reduzir riscos de doenças”. Deste conceito deriva o da ciência dos alimentos funcionais: “estudo de novos conceitos em nutrição que lida com pesquisa e desenvolvimento de alimentos funcionais” (ASHWELL, 2002, p. 5).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) segue a mesma linha de definição ao caracterizar uma alegação de propriedade funcional para um alimento, para fins de registro e rotulagem, como “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c). Tal definição provém da Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos criada com a atribuição de, entre outras, assessorar a ANVISA em assuntos científicos relacionados à área de alimentos funcionais (BRASIL, 1999a).

A Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos da ANVISA define como parâmetro para o registro e rotulagem de um alimento funcional a comprovação de suas propriedades. Tal comprovação deve ser feita, de acordo com esta comissão, através de evidências científicas. A comissão define como evidências científicas aplicáveis, dentre outras, ensaios nutricionais ou fisiológicos em animais de experimentação, e evidências abrangentes da literatura científica sobre as propriedades e características do produto (BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c).

Roberfroid (1998) preconiza que os efeitos benéficos de alimentos funcionais à saúde humana, especialmente probióticos e prebióticos, requer uma abordagem estritamente científica. Sua proposta estratégica engloba três etapas: investigação básica, etapa experimental e estudos sobre nutrição humana. Relacionando-se tal estratégia à ciência dos alimentos funcionais, poder-se-ia garantir seu significado para a saúde pública.

Embora ainda existam muitas controvérsias acerca das definições na ciência dos alimentos funcionais, o ILSI da Europa admite que probióticos são “microorganismos vivos ingredientes de alimentos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, exercem benefícios à saúde do consumidor”. Prebióticos seriam “ingredientes não digeríveis de alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro, simulando seletivamente o crescimento e/ou a modificação da atividade metabólica de uma ou um limitado número de cepas bacterianas no cólon com potencial de melhorar a saúde do hospedeiro”. Por fim, simbióticos seriam “uma mistura de probióticos e prebióticos com o objetivo de aumentar a sobrevivência da bactéria com capacidade de promover saúde, com a meta final de modificar a flora intestinal e seu metabolismo” (ASHWELL, 2002).

Dentre os efeitos positivos dos probióticos, Rossi (2001) destaca a diminuição dos sintomas da má absorção da lactose, prevenção de diarreias, redução dos níveis de colesterol sérico, estimulação da resposta imune e a redução da incidência de tumores.

O quefir é comumente classificado como um probiótico. No entanto, evidências da presença de polissacarídeos hidrossolúveis não digeríveis em seus grãos (KOOIMAN, 1968) sugerem sua classificação como um simbiótico. Dentre vários efeitos, sugere-se que ele tenha ação sobre a colesterolemia (ROSSI, 2001). No entanto, a literatura científica disponível sobre o quefir ainda é escassa tanto no âmbito nacional quanto no internacional.

A carne de coelho é considerada um alimento para o ser humano. Por ser um alimento de origem animal, classifica-se como uma proteína de alto valor biológico. Pelo mesmo motivo, é fonte de micronutrientes importantes e críticos para a saúde coletiva, tal como o ferro. Por ser ingerido quase sempre em preparações salgadas, oferece indiretamente aporte de iodo, elemento de alta relevância por prevenir os distúrbios por deficiência de iodo, conhecidos em fase clínica por bócio. Além disso, é uma fonte protéica de baixo teor de lipídios totais e colesterol (FRANCO, 1999). Isto significa que um aumento de seu consumo seria relevante na prevenção de doenças cardiovasculares, causa de mortalidade alta no Brasil.

Sob o ponto de vista experimental, coelhos são considerados boas cobaias por apresentarem semelhanças fisiológicas com humanos. Outrossim, sua reprodução facilita a obtenção de grandes quantidades de material de estudo em pequenos espaços de tempo.

Do exposto, surge a necessidade de esclarecer algumas questões relacionadas à experimentação do quefir. Inicialmente, justifica-se a confirmação do poder hipocolesterolêmico e hipolipidêmico do quefir. Mais que isso, faz-se necessário definir que dosagem seria mais eficiente para atingir estes resultados na cunicultura. A forma de administração do simbiótico também deve atender à realidade da cunicultura, demandando um processamento tecnológico que não interfira na sua capacidade funcional e, ao mesmo tempo, possibilite seu uso na alimentação animal.

Uma abordagem ousada pode ser aplicada observando-se coelhos como alimento. Se já é especulado que o quefir diminui a colesterolemia em coelhos, seria uma consequência natural uma carne de coelho com menores teores de colesterol? Minimamente, obteríamos um alimento com menores teores de lipídios totais? Levando em consideração o fato de que a carne de coelho é seu músculo, que por sua vez é vascularizado, poderíamos pressupor que o produto final destinado ao consumidor também apresentaria menores concentrações dos nutrientes em questão.

A análise fisiológica é justificável pela necessidade de se obterem maiores evidências experimentais do simbiótico no que tange os benefícios à saúde humana. Além disso, uma boa saúde animal representa boas perspectivas econômicas para produtores.

O objetivo deste trabalho foi avaliar respostas fisiológicas em coelhos alimentados com quefir.

Dentre os objetivos específicos, destacam-se:

- analisar a evolução lipídêmica dos animais, a partir da dosagem de colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL-c), lipoproteína de baixa densidade (LDL-c), lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL-c), e triglicerídeos séricos;
- avaliar o desempenho (ganho de peso) dos animais à suplementação de quefir.

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Alimentos funcionais

#### 2.1.1 Histórico e definição

“Alimento funcional” é um conceito recente, que tem sua origem no Japão. Na década de 80, o governo japonês lançou três programas de pesquisa de propriedades funcionais de alimentos que trariam benefícios à saúde. Assim, em 1991, uma nova categoria de alimentos foi definida: Alimentos para Uso Específico em Saúde (*Food for Specific Health Use* — FOSHU). Com resultados promissores, tanto sob o ponto de vista da melhoria da qualidade de vida quanto do ponto de vista econômico-financeiro. Logo, os Estados Unidos e a Europa lançaram-se nestas investigações (ASHWELL, 2002).

Na década de 90, uma ação conjunta foi instaurada pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI), sendo denominada Ciência dos Alimentos Funcionais Européia (*Functional Food Science in Europe* — FUFOSSE). Os trabalhos da FUFOSSE iniciaram-se em 1995, e contaram com a participação de cerca de 100 *experts* europeus em nutrição e medicina (Ibid).

O ILSI reconhece um alimento como funcional se o mesmo apresenta “propriedades satisfatoriamente demonstradas de afetar uma ou mais funções-alvo no corpo, através de efeitos nutricionais adequados, no sentido de melhorar o estado de saúde e bem-estar, e/ou reduzir riscos de doenças”. A entidade deixa bem claro que o campo de estudo da FUFOSSE é alimentos, e que não passa pela farmacologia. Outrossim, deixa bem claro que a natureza de um alimento funcional “não é uma pílula, uma cápsula ou qualquer forma de suplemento dietético”. Finalmente, a entidade reconhece que o termo ainda não está consensualmente definido, além de que diversos alimentos são funcionais ou um dia ainda serão reconhecidos como tal (Ibid).

Outros autores optam por definições mais simples. É o caso de Roberfroid (1998) propondo “uma definição simples e prática” afirmando ser o alimento funcional “um alimento que detém um atributo passível de ser declarado”.

No Brasil, a ANVISA assumiu a responsabilidade de legislar nesta área. Segundo a entidade, propriedade funcional para um alimento, para fins de registro e rotulagem, é “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano” (BRASIL, 1999b; BRASIL, 1999c). Tal definição provém da Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos criada com a atribuição de, entre outras, assessorar a ANVISA em assuntos científicos relacionados à área de alimentos funcionais (BRASIL, 1999a).

As incertezas sobre o assunto passam também por seu nome. Embora o termo “alimentos funcionais” seja o mais utilizado mundialmente, outros são encontrados: nutracêuticos, nutragênicos, biocêuticos, *pharmafood*, *medical food*, *nutritional food*, *therapeutic food*, *fitness food*, dentre outros. Outros termos mais tradicionais eventualmente referem-se a alimentos com propriedades funcionais, tais como “suplementos dietéticos” e “alimentos fortificados” (ROSSI, 2001; ASHWELL, 2002; TAIPINA et al., 2002).

Dois subgrupos dos alimentos funcionais merecem destaque: esteróis vegetais, e um segundo composto por pré e probióticos. Eles estão relacionados a áreas fisiológicas bastante diferentes dos alimentos funcionais usuais (ricos em micronutrientes) e caracterizam uma amplitude de possibilidades de desenvolvimento dos mesmos (ASHWELL, 2002). Na concepção de Rossi (2001), os probióticos representam uma classe de alimentos funcionais bastante significativa, podendo ser considerados seus precursores.

## 2.1.2 Probióticos, prebióticos e simbióticos

### 2.1.2.1 Histórico e conceitos

Flandrin & Montanari (1998) concordam que procedimentos de fermentação controlada datam de épocas aparentemente posteriores ao paleolítico superior. Segundo os autores, tais procedimentos fariam parte da cozinha pré-histórica, com objetivos de tornar os alimentos comestíveis ou conservá-los. Tal fato sugere que, já na pré-história, o homem consumia probióticos e prebióticos.

Está comprovado que a coalhada era vendida nas ruas de Constantinopla desde o século XII. Há registros de viajantes franceses que teriam recebido a oferta de “um grande bolo de leite coalhado que chamam de iogurte” por parte dos turcomanos, em 1432 (KISLINGER, 1998). O fato de já haver comércio de produtos laticínios fermentados no século XII enfatiza a especulação do consumo secular de microorganismos vivos benéficos à saúde humana muito antes disso. Fuller (1998) também concorda que o consumo de leites fermentados tem uma longa história.

Considera-se que o passo inicial nas investigações científicas acerca dos probióticos foi dado por E. Metchnikoff. Percebendo que populações caucasianas apresentavam grande longevidade e alta ingestão de leites fermentados, este microbiologista publicou o tratado “O prolongamento da vida” (*The prolongation of life*) em 1908, registrando suas observações de que bacilos presentes nestes alimentos impediam a proliferação de outros microorganismos patogênicos (FULLER, 1998; HELLER, 2001; ROSSI, 2001; RAMOS et al., 2003). Já na década de 40, indústrias passariam a produzir leites fermentados, em virtude de diversos trabalhos científicos que demonstravam os benefícios dos probióticos (ROSSI, 2001).

O ILSI admite que existem muitas controvérsias sobre as definições dos termos probiótico, prebiótico e simbiótico. Este órgão sugere que probióticos são “microorganismos vivos ingredientes de alimentos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, exercem benefícios à saúde do consumidor”. Prebióticos seriam “ingredientes não digeríveis de alimentos que afetam benéficamente o hospedeiro, simulando seletivamente o crescimento e/ou a modificação da atividade metabólica de uma ou um limitado número de cepas bacterianas no cólon com potencial de melhorar a saúde do hospedeiro”. Por fim, simbióticos seriam “uma mistura de probióticos e prebióticos com o objetivo de aumentar a sobrevivência da bactéria com capacidade de promover saúde, com a meta final de modificar a flora intestinal e seu metabolismo” (ASHWELL, 2002, p.13). Particularmente no que diz respeito aos probióticos, outros autores adotam este conceito (MARTEAU & SALMINEN, 1998; TAIPINA et al., 2002; DINIZ et al., 2003). No que tange os prebióticos, as definições do ILSI estão de acordo com Gibson & Collins (1998), Sako et al. (1999), Fernandes et al. (2000), e Maiorka et al. (2001). Simbióticos são semelhantemente definidos por Gibson & Collins (1998), Fernandes et al. (2000), Maiorka et al. (2001), e Rossi (2001).

Fuller (1998) admite que probiótico é “um suplemento alimentar microbiano vivo que afeta de forma benéfica o animal hospedeiro através da melhoria do balanço microbiano intestinal”. Esta definição difere da proposta pelo ILSI, restringindo os efeitos do alimento à ação sobre a população das bactérias que naturalmente habitam o aparelho digestório. Rossi (2001) e Michelin et al. (2002) adotam definição do mesmo autor ao conceituar probióticos. Conceitos semelhantes são adotados por Bertechini (1998), Gil-Turnes et al. (1999), Alves et al. (2000), Fernandes et al. (2000), Blackburn (2001), Maiorka et al. (2001), Jones (2002), e Lanzillotti (2002). Mais adiante, serão descritos estudos que sugerem efeitos que vão além da colonização intestinal, discordando deste conceito.

Rossi (2001) restringe o conceito de prebióticos apenas a carboidratos, embora concorde que estes não devem ser digeríveis por parte do hospedeiro.

Um conceito pouco utilizado atualmente é o de biobióticos. Este determinaria o conjunto dos conceitos de pré, pró e simbióticos. Dentro desta linha, o vocábulo simbiótico seria substituído pelo termo pré-probiótico (EL-HINDAWY et al., 1994). Atualmente, não existe uma palavra que substitua o antigo termo biobiótico.

#### 2.1.2.2 Probióticos

Rossi (2001) afirma que as bactérias lácticas têm efeito probiótico desde que sobrevivam às condições do aparelho digestório humano, e se estabeleçam no intestino, onde desempenhariam suas funções de promoção à saúde. O autor lista cepas que tenham possíveis ações probióticas: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus GG*, *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus reuteri*, *Enterococcus faecium* e *Propionibacterium fredenrichi*. Algumas são de uso exclusivo de determinadas empresas, ou seja, são patenteadas, como *Lactobacillus casei* var. *shirota*, *Lactobacillus rhamnosus* var. *GG*, e *Lactobacillus johnsonii*.

Diversos estudos vêm sendo realizados no sentido de avaliar efeitos probióticos de outros microorganismos. Rossi et al. (2000) apontaram eficácia do *Lactobacillus jugurti* na redução de níveis hipercolesterolêmicos em coelhos. Vassalo (1995) obteve resultados positivos em desempenho no tratamento de suínos com

ração adicionada de *Streptococcus faecium*, *Sacharomyces cerevisiae*, e *Bacillus toyoi*. Em estudo com frangos de corte, Frizzas (1996) encontrou tímidos resultados positivos no desempenho, utilizando *Bacillus subtilis*. Ávila (2000) teve sucesso na diminuição da incidência de diarreia em bezerros, utilizando, dentre outros microorganismos probióticos mais conhecidos, *Ruminobacter amylophilum*, *Ruminobacter succinogenes*, *Succinovibrio dextrinosolvens*, e *Bacillus cereus*. Bertechini (1998) lista diversos microorganismos, ainda não citados no presente estudo, que vêm sendo testados como probióticos para aves e suínos: *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus lactius*, *Streptococcus diacetylactus*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*, *Torulopsis*, e *Bifidobacterium bifidum*. De interesse maior para uso em cães ou humanos, Fernandes et al. (2000) referem-se a *Bifidobacterium pseudolongum*, *Lactobacillus lactis*, *Enterococcus faecius*, *Bifidobacterium thermophilum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus reuteri*, *Streptococcus cremoris*, *Streptococcus intermedius*. Reque et al. (2000) obtiveram resultados similares a de tratamentos com antibióticos para frangos, administrando *Lactobacillus fermentum* LPB.

A quantidade de probiótico necessária para se obter benefícios à saúde não é clara. Rossi (2001) defende que os benefícios de um probiótico somente seriam alcançados com uma dosagem diária de  $10^9$  UFC/mL. Sua revisão está voltada para a saúde humana. Fernandes et al. (2000), em contrapartida, estimam que uma dosagem de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/mL seriam suficientes, revisando principalmente os benefícios para cães.

Os efeitos de produtos fermentados são variados. Já foram demonstradas diminuição dos sintomas da má absorção da lactose, prevenção de diarreias, estimulação da resposta imune e redução da incidência de tumores (ROSSI, 2001). Neste estudo, torna-se de maior relevância revisar os efeitos dos probióticos sobre a lipídemia.

#### 2.1.2.2.1 Efeitos dos probióticos sobre a lipídemia e composição corporal

Diversos estudos têm investigado os efeitos de probióticos sobre os níveis sanguíneos de lipídios, mais particularmente o colesterol. Tanto estudos *in vitro*

quanto *in vivo* vêm sendo realizados, chegando a conclusões conflitantes. Há diferenças importantes nas pesquisas no que diz respeito ao delineamento experimental, características dos indivíduos, cepas utilizadas e doses empregadas. Os mecanismos pelos quais os microorganismos geram tais efeitos não estão totalmente esclarecidos (ROSSI, 2001).

Em estudo com 200 poedeiras, Oba (2000) administrou probiótico durante 56 dias visando avaliar efeitos lipídêmicos e de melhora nas características produtivas. Os resultados apontaram redução significativa dos níveis de colesterol total e triglicérides no soro em 44,35 e 55,67% respectivamente. No entanto, estas reduções não afetaram a qualidade dos ovos. Tais resultados confirmam as possibilidades de benefícios de probióticos na indução de um melhor perfil lipídêmico. No entanto, deixa em dúvida se estas transformações atingem ou não um nível tissular do hospedeiro.

. Embora não significativos estatisticamente, os resultados de investigações de diversos efeitos provenientes da administração de probiótico (*Bacillus subtilis*) em 360 frangos apontaram uma tendência em aumentar a atividade das enzimas digestivas. Embora este pareça ser um bom resultado sob o ponto de vista produtivo, uma vez que o aproveitamento de nutrientes tornar-se-ia otimizado, é relevante atentar para o relato da atividade da lipase pancreática também ter sido aumentada (FRIZZAS, 1996). Assim, uma quantidade maior de lipídios da dieta seria digerida e absorvida, podendo levar a uma maior predisposição dos animais à hiperlipidemia.

Os efeitos da administração de probióticos para frangos de corte também foram estudados por Silva (1999). A conversão alimentar foi melhorada, mas não foram encontradas vantagens no ganho de peso e consumo de ração em relação ao controle. Resultados semelhantes foram obtidos por Cavalcanti (1995) em uma amostra de 576 animais. Já Laurentiz (2000) concluiu em seus estudos que os probióticos não melhoraram a conversão alimentar, mas levou a um maior ganho de peso e consumo de ração por parte de frangos de corte. Estes achados levam à mesma reflexão do parágrafo anterior, uma vez que ganho de peso está invariavelmente relacionado a um aumento absoluto de gordura corporal de uma forma geral (SHILLS et al, 2003).

Toit et al. (1998) administraram *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus reuteri* a seis suínos em estágio de creche mantidos em dietas hiperlipídicas com alto teor

de colesterol por 17 semanas, caracterizando-os como hipertrigliceridêmicos e hipercolesterolêmicos. A “mistura de probióticos” foi administrada liofilizada numa dosagem de  $2 \times 10^{12}$  CFU para cada suíno por dia. Comparados com o grupo controle, estes animais tiveram significativa redução nos níveis de colesterol sérico, mas não nos de triglicerídios. O autor sugere ainda que o mecanismo de redução de colesterol esteve envolvido com o metabolismo dos sais biliares.

Em estudo semelhante, Rossi et al. (2000) encontraram efeitos positivos no uso de *Lactobacillus jugurti* e *Enterococcus faecium* em 32 coelhos hipercolesterolêmicos. Os resultados apontaram uma redução de 18,4% no colesterol sérico e aumento na ordem de 17,8% da fração HDL. Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de triglicerídios entre os grupos estudados.

El-Hindawy et al. (1994) experimentaram o uso de dois probióticos comerciais na alimentação de 126 coelhos. Os resultados obtidos nos grupos que receberam os produtos foram significativamente positivos em relação ao controle no que diz respeito ao ganho de peso diário e conversão alimentar. Os autores também estudaram a carcaça, observando que aquelas provenientes de animais tratados com os probióticos tiveram um maior peso total, eviscerado e de carne limpa comestível (sem ossos). Por fim, os autores concluem que a administração dos probióticos estudados seriam de alto valor econômico, uma vez que estudos financeiros também foram realizados. Michelan et al. (2002), experimentando *Bacillus subtilis* em 176 coelhos, por sua vez, não observaram vantagens no que tange o desempenho, ganho de peso e rendimento da carcaça. Mais uma vez, o enfoque de interesse restritamente financeiro nos estudos de produção animal deixa dúvidas quanto à qualidade do alimento sob o ponto de vista da promoção à saúde humana.

### 2.1.2.3 Prebióticos

Os critérios adotados para classificar uma substância como um prebiótico são: resultar em quantidade significativa no cólon, não ser digerido nas partes mais altas do aparelho digestório, ser um substrato seletivo de microorganismos benéficos à saúde, e resultar em benefícios colônicos ou sistêmicos ao hospedeiro (FERNANDES, 2000; ROSSI, 2001; ASHWELL, 2002; LANZILLOTTI, 2002). Os

exemplos mais conhecidos de prebióticos são os oligossacarídeos e a inulina. Entre os oligossacarídeos, são citados os frutoligosacarídeos (FOS), galactoligosacarídeos, xiloligosacarídeos, lactossacarose, rafinose, estaquiose, lactulose, isomaltoligosacarídeos, *neosugars*, lactitol, transgalactosídeos (SAKO, 1999; FERNANDES, 2000; ROSSI, 2001; LANZILLOTTI, 2002; PASSOS & PARK, 2003). Os prebióticos são encontrados na natureza em pinhas, mel, cebola, aspargo, gramíneas, banana, centeio, aveia, alcachofras, beterraba, chicória, alho, bulbo de lírio vermelho, trigo, e tomate (FERNANDES, 2000; PASSOS & PARK, 2003). Alimentos processados também são fontes de prebióticos, como geléia, açúcar mascavo, produtos de padaria, molhos para salada, produtos cárneos e confeitaria em geral (ASHWELL, 2002; PASSOS & PARK, 2003).

Dentre os benefícios dos prebióticos à saúde, têm sido comprovados a melhora do trânsito intestinal; a potencialização dos efeitos benéficos da flora microbiana do hospedeiro; a ativação do sistema imune; o aumento da biodisponibilidade de micronutrientes, como cálcio, magnésio e fósforo; a inibição de lesões precursoras de adenomas e carcinomas; a redução do risco de doenças colorretais; a prevenção de cáries dentárias; a redução dos níveis séricos de colesterol, triglicerídios e lipídios totais; a destruição de bactérias putrefativas; a redução de inflamação decorrente da deficiência de magnésio; a redução de pressão arterial em hipertensos; a redução na absorção de carboidratos e lipídios; a melhoria do metabolismo de diabéticos; o aumento da digestão e metabolismo da lactose; o aumento da reciclagem de compostos como o estrógeno; o aumento da síntese de vitaminas, principalmente as do complexo B; o auxílio na restauração da flora microbiana normal durante antibioticoterapia; a redução da potencialidade da acne, cirrose hepática, intoxicação alimentar, alergias e flatulência; a recuperação da anemia decorrente de gastrectomia; o aumento do tempo de sobrevivência à infecção por *Clostridium difficile*; a redução dos níveis de uréia sanguínea e renal; a redução da excreção de nitrogênio renal; a redução dos teores fecais de amônia e outros produtos putrefativos intestinais do metabolismo de aminoácidos (SAKO, 1999; FERNANDES, 2000; ROSSI, 2001; LANZILLOTTI, 2002; PASSOS & PARK, 2003). É inevitável a observação de que alguns dos benefícios relacionados a prebióticos são os mesmos declarados para probióticos. Tal fato coloca em dúvida se os efeitos aqui relatados são desencadeados diretamente pelos prebióticos ou indiretamente através da maior proliferação de microorganismos da flora normal.

Vale alertar que desconfortos intestinais podem ser ocasionados pelos prebióticos. Portanto, Passos & Park (2003) alertam que a dosagem diária de ingestão deve ser bem observada. Não foram encontradas na literatura recomendações quantitativas para o uso de prebióticos.

Os oligossacarídeos vêm sendo utilizados pela indústria alimentícia, não somente por suas características prebióticas. Estes compostos têm um razoável poder adoçante sem levar à cariogênese. Apresentam baixos teores calóricos com sabor muito semelhante ao da sacarose, tendo sido aplicados em produtos dietéticos para controle de peso e diabetes. Além disso, tem sido explorada sua capacidade de melhorar as características físicas de produtos alimentícios industrializados (SAKO, 1999; PASSOS & PARK, 2003).

Sako (1999) afirma que, embora existam algumas evidências positivas, ainda é um desafio provar a eficácia dos prebióticos em produzir efeitos no metabolismo de lipídios e colesterol. Há controvérsias se este efeito seria produzido pela diminuição da síntese hepática ou pela redução da absorção intestinal. A maior parte dos estudos neste sentido têm sido efetuados em animais de laboratório. Em humanos, foram encontrados resultados em pacientes diabéticos, uma vez que representam um grupo naturalmente maior de consumidores de prebióticos em forma de adoçantes.

#### 2.1.2.4 Quefir

##### 2.1.2.4.1 Histórico e conceitos

Também conhecido por *kefir*, *kafir*, *kipp*, e *kefhir*, possivelmente a palavra origina-se do vocábulo turco *kef*, que significa “estar bem”; ou *keiph*, do eslavo. Há controvérsias em relação a que se refere propriamente o termo. Historicamente, parece que o quefir seria um leite fermentado pelos chamados grãos ou grumos de quefir. O quefir seria fabricado predominantemente a partir do leite de cabra ou ovelha, desde tempos remotos, pelos tártaros e povos caucasianos. Tornou-se popular em vários países da Europa e é comercializado em algumas regiões da América do Norte. Na Argentina, é importante a produção doméstica. No Brasil, a produção é feita essencialmente em leite de vaca (GARROTE et al., 1997).

Zubillaga et al. (2001) definem o quefir como um probiótico e descrevem os grãos de quefir como “uma associação simbiótica entre bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras”. Neste ponto, vale ressaltar que a tradução do termo simbiótico refere-se a dois vocábulos, no idioma inglês, de diferentes significados. O termo “synbiotic” é utilizado pelo ILSI para caracterizar a associação de probióticos com prebióticos. Sua tradução seria simbiótico (ASHWELL, 2002). Já a palavra “symbiotic”, tal como usada por Zubillaga et al. (2001), refere-se a uma simbiose entre vários organismos vivos de diferentes espécies. Mais adiante, serão revisados alguns trabalhos que levam a crer que quefir e grãos de quefir possam ser caracterizados como um simbiótico. Duas evidências serão expostas: a presença de polissacarídeos no quefir que não são digeríveis por mamíferos e que têm alguma ação funcional; e a presença de frutooligosacarídeos (FOS), um prebiótico do açúcar mascavo, que é utilizado como substrato para fermentação por grãos de quefir em algumas regiões, inclusive neste estudo. Para uma elucidação da primeira afirmativa, restaria-nos saber se os exopolissacarídeos do quefir são capazes de servir de substrato para microorganismos no intestino de hospedeiros, o que nos daria condições de concretamente caracterizá-los como prebióticos de acordo com o preconizado por Ashwell (2002). Quanto à presença de FOS no açúcar mascavo, seria necessário investigar se estes são utilizados como substratos para processos fermentativos dos grãos ainda *in vitro*, e se chegariam em quantidade suficiente, sem nenhum processo de digestão, ao interior do aparelho digestório.

Neste trabalho, será objeto de estudo o grão ou grumo de quefir, *in natura* e liofilizado, e seus precipitados. Objetivando a padronização de termos, quefir se referirá ao produto fermentado pelos grãos de quefir (suspensão). Vale ressaltar que os grãos de quefir são capazes de fermentar outros alimentos, como açúcar mascavo, refresco adoçado de frutas (RABL et al., 1994), leite de cabra ou ovelha (HAENLEIN, 2001), e soja (ABRAHAM & ANTONI, 1999; LIU & LIN, 2000, LIU et al., 2002).

#### 2.1.2.4.2 Composição do quefir

Os grãos de quefir e seus sobrenadantes são compostos de microorganismos, polissacarídeos, proteínas, álcool e substâncias voláteis. Sua composição microbiológica é bastante variável, dependendo de sua origem. Os

fatores que interferem nesta natureza parecem ser, principalmente, de ordem geográfica e do substrato utilizado para proliferação dos grãos. Wszolek et al. (2001) discordam, afirmando que apenas o substrato diferencia a composição do fermentado de quefir, ao analisar leite de ovinos, caprinos e bovinos provenientes da Polônia e Escócia. Vale ressaltar que, além deste estudo ter investigado apenas quefir de leites, os autores reconhecem que pode ter havido diferenças de análise, uma vez que foi desenvolvido por um laboratório em cada país.

Pidoux et al (1990) isolaram microorganismos até então desconhecidos como componentes do quefir, identificando cada uma de suas funções. As bactérias encontradas foram *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus paracasei*, altamente envolvidas com a produção de lactato; e *Lactobacillus hilgardii*, envolvida na produção de arabinose e polissacarídeos a partir de sacarose. Seus estudos utilizaram fermentados de açúcar.

Kuo & Lin (1999) encontraram diferenças microbiológicas e químicas entre grãos de quefir obtidos de três diferentes lares de Taiwan. Ainda estudando quefir proveniente de Taiwan, Lin et al. (1999) identificaram bactérias e leveduras bastante incomuns em relação a outros estudos: *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyveromyces marxianus*, e *Pichia fermentans*.

Leroi & Courcoux (1996) também isolaram cepas menos comuns do quefir de açúcar: *Lactobacillus hilgardii* e *Saccharomyces florentinus*.

Marshall, et al. (1984) isolaram dos grãos de kefir a bactéria *Lactobacillus desidiosus*. Esta bactéria fermenta especificamente L-arabinose e gluconato. Marquina et al. (2002), além dos posteriormente descritos, isolaram as bactérias *Lactococcus brevis* e *Lactobacillus paracasei*.

Takizawa et al. (1998) isolaram 120 cepas do gênero *Lactobacillus* de grãos de quefir. Os autores agruparam-nas em quatro grupos, sendo *Lactobacillus kefirgranum* — que representou 49% das cepas —, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, e *Lactobacillus parakefir*.

Angulo et al. (1993) estudaram quefir obtido de produtos de laticínio de oito fontes domésticas da região da Galícia, noroeste da Espanha. As bactérias encontradas foram *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus fermentus*, *Lactobacillus casei* spp. *ramnosus*, *Lactobacillus casei* spp. *tolerans*, *Lactobacillus casei* spp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis* spp *lactis*, *Leuconostoc* spp., *Streptococcus*

*salivarius* spp. *thermophilus*. Dentre as leveduras, foram identificadas *Torulaspora delbrueckii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir*, *Candida friedrichii*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia fermentans*. Outrossim, os autores relatam que houve diferenças importantes na composição dos grãos entre cada uma das oito fontes, e atribuem o fato à diversidade da localidade.

Sotelo et al. (2002) estudaram, na Espanha, quefir proveniente do Canadá. Dentre as bactérias isoladas, 89,66% eram do gênero *Lactobacillus*, 6,10% eram *Lactococcus*, e 3,39% *Enterococcus*. Os autores atribuem a presença de bactérias enterocócicas a uma provável contaminação dos grãos. Não foram identificadas bactérias do gênero *Leuconostoc*.

Simova et al. (2002) isolaram de grãos de quefir e de quefir de leite, obtidos na Bulgária, uma série de espécies de microorganismos. Dentre as bactérias, encontraram *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei* spp. *pseudopantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus lactis* spp. *lactis*, e *Streptococcus thermophilus*. Além de uma colônia de levedura de espécie não identificada, foram encontradas *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida inconspicua*, e *Candida maris*. As bactérias do gênero *Lactobacillus* foram quantificadas nos grãos: em 28,7%, em média. Comparando as quantidades entre os grãos e o quefir de leite, os autores constataram que, dentre as bactérias, há uma redução de *Lactobacilli* e um aumento de *Streptococci*. No que tange as leveduras, existe, em geral, uma diminuição das quantidades no sobrenadante. Entretanto, concluem que são bastante semelhantes os grãos de quefir e o quefir. Estas conclusões são semelhantes às do estudo de Garrote et al. (1997), posteriormente descrito.

Garrote et al. (1997) encontraram, em grãos obtidos em ambientes domésticos argentinos, bactérias, leveduras e fungos. As bactérias encontradas, em número de quatro, foram *Lactococcus lactis* spp. *lactis*; *Lactococcus lactis* spp. *diacetylactis*; um bacilo homofermentativo, podendo ser *Lactobacillus kefiranoferens* — também isolado por Arihara et al (1990) — ou *Lactobacillus kefirgranum*; e um bacilo heterofermentativo, que poderia ser *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* — também isolado por Arihara et al (1990) —, ou *Lactobacillus parakefir*. As leveduras encontradas foram as não fermentadoras de lactose: *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces lipolytic*. O fungo foi caracterizado como *Geotrichum candidum*. Os resultados indicaram uma composição centesimal dos grãos de quefir de 0,9% (1,64

$\times 10^{-7}$  UFC/g) de *Lactococci*, 78,3% ( $159,00 \times 10^{-7}$  UFC/g) de *Lactobacilli*, e 20,8% ( $42,30 \times 10^{-7}$  UFC/g) de leveduras. Estas bactérias tiveram suas quantidades ligeiramente aumentadas no leite fermentado, enquanto a quantidade de leveduras diminuiu. Os autores concluíram que a composição microbiológica do leite fermentado com grão de quefir é a mesma dos grãos propriamente ditos, exceto pelo *Lactobacillus kefir*, que não foi detectado após a fermentação. Posteriormente, os mesmos autores (GARROTE et al., 2001) isolaram *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus plantarum*, *Acetobacter* and *Saccharomyces*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* spp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lactobacillus parakefir*, *Kluyveromyces marxianus*. No entanto, houve diferenças qualitativas entre as quatro fontes de amostra estudadas, todas argentinas.

Utilizando a mesma fonte de grãos de quefir — casas de famílias argentinas — Abraham & Antoni (1999) compararam a composição de grãos de quefir de fermentados de leite de vaca e de soja. O quantitativo de microorganismos foi estatisticamente igual em ambos. Os grãos de leite de vaca apresentaram quantidade significativamente maior de polissacarídeos, enquanto nos de leite de soja observou-se uma predominância de proteínas. A conclusão importante se chegou no que diz respeito à adaptabilidade dos grãos a diferentes meios de cultura, uma vez que os grãos de leite de vaca também produziram fermentação em leite de soja. No entanto, o crescimento da biomassa foi maior no leite de vaca. Por fim, foi observado que as proteínas produzidas pelo grão são exportadas para o meio sobrenadante. Liu et al. (2002), em Taiwan, encontraram os mesmos resultados no que diz respeito às diferenças nas proporções de carboidratos e proteínas. Estes autores observaram, ainda, que no fermentado de soja a quantidade de acetaldeído foi maior, enquanto no fermentado de leite as quantidades dos outros componentes voláteis superaram o de soja.

Franzetti et al. (1998) estudaram bebidas açucaradas fermentadas com grãos de quefir. Os autores encontraram principalmente subspécies de *Lactobacillus casei*, e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Hansenula yebransis*.

A fermentação do leite pelas bactérias e leveduras dos grãos de quefir produz etanol a partir da lactose (GURR, 1987; RABL et al., 1994). As atividades máximas de lactase foram identificadas nas leveduras *Candida kefir* e *Kluyver marxianus* (BERRUGA et al., 1997).

O quefirano é um polissacarídeo que faz parte da estrutura dos grãos de quefir. Ele é solúvel em água, composto por proporções iguais de glicose e galactose. Sua lise, mesmo enzimática, é um processo que requer meio ácido (KOOIMAN, 1967). O *Lactobacillus kefiranofaciens* é o microorganismo responsável por sua produção (YOKOI et al., 1991; MITSUE et al., 1998). Yokoi et al. (1991) alertaram que *Lactobacillus kefiranofaciens* só está presente em soro de leite. O *Streptococcus thermophilus* produz exopolissacarídeos compostos por galactose, glicose, ramnose, N-acetil-galactosamina, fucose, e galactose acetilada. Estes carboidratos não têm funções prebióticas comprovadas, mas têm alto valor para a tecnologia dos alimentos por aumentarem a textura e viscosidade de produtos. Aparentemente, a textura do quefir de leite é devida à presença destes compostos (BROADBENT et al., 2003). Os exopolissacarídeos estão presentes em sobrenadantes e fazem parte da estrutura dos grãos. Sua produção é aumentada conforme eleva-se a temperatura de fermentação (RIMADA & ABRAHAM, 2001). Frengova et al. (2002) identificaram que a presença de leveduras aumenta em quase duas vezes a produção de quefirano pelas bactérias.

A microscopia eletrônica dos grãos de quefir sugere uma maneira de esquematizá-lo didaticamente através de uma cebola, pois suas células dispõem-se em camadas, podendo-se caracterizá-las como mais externas ou mais internas. Toba et al. (1990) compararam grãos de quefir capazes de se propagar com grãos incapazes de se propagar, obtidos na Dinamarca e cultivados no Japão. Em ambos os casos, é perceptível que as colônias de leveduras são separadas das colônias de bactérias. A quantidade de cocos observados foi ínfima, predominando as bactérias bastonizadas. Ainda, é notável que, mesmo entre as bactérias, as colônias são agrupadas em função de seus tamanhos. Comparando-se a superfície e o interior do grão, observa-se que somente as bactérias internas e mais longas apresentam filamentos de polissacarídeos. Isto significa que apenas as bactérias do interior são encapsuladas, o mesmo não ocorrendo para leveduras nem para as bactérias de superfície dos grãos. Nos grãos que não se multiplicavam, não foram encontradas bactérias longas, nem filamentos, mas as leveduras estavam embebidas em material fibroso. O mesmo grupo de pesquisadores (ARIHARA et al., 1990) observou posteriormente, através de imfluorescência, que *Lactobacillus kefiranofaciens* encontra-se em todas as partes do grão, enquanto o *Lactobacillus kefir* posiciona-se apenas em uma parte da camada superficial. Assim, conclui-se que as bactérias

longas produtoras de polissacarídeos são *Lactobacillus kefiranofaciens*, que precisam de um ambiente anaeróbio para produzir polissacarídeos. Estes achados também levam a crer que as bactérias *Lactobacillus kefir* serão mais comuns nos precipitados dos produtos fermentados, onde, conseqüentemente, a produção de polissacarídeo será menor. Por fim, estes autores concluem que a capacidade de multiplicação dos grãos está relacionada às relações estruturais entre as suas células.

Observações em microscopia eletrônica do quefir de Taiwan permitiram a Lin et al. (1999) afirmar que as bactérias lácticas encontram-se na superfície dos grãos, enquanto as leveduras tendem ao centro. Estes autores também chegaram a conclusões quanto às funções e propriedades de cada microorganismo observado. *Lactobacillus helveticus* foi aquele que apresentou maior poder de crescimento; *Kluyveromyces marxianus* exibiu a maior capacidade de produção de L-ácido láctico e etanol; *Leuconostoc mesenteroides* produziu a maior parte de D-ácido láctico, e *Pichia fermentans* não apresentou capacidade fermentativa.

Elferink et al. (2001) demonstraram que o *Lactobacillus kefir* está envolvido na conversão de ácido láctico em ácido acético, mas não é capaz de agir sobre a glicose. No entanto, Oude et al. (2001) demonstraram que tal capacidade do *Lactobacillus kefir* não é observada em condições anaeróbicas. Estes autores afirmam que tal capacidade parece estar relacionada à viabilidade de manutenção das células.

#### 2.1.2.4.3 Propriedades simbióticas

Tamai et al. (1996) demonstraram que ratos que receberam leite fermentado com quefir e dieta hipercolesterolêmica tiveram seus níveis séricos e hepáticos de colesterol reduzidos. No entanto, não foram identificados resultados na HDL-colesterol e nos triglicerídios. Ainda, as fezes e o soro revelaram um menor índice de ácidos biliares, sugerindo que este composto esteja relacionado aos efeitos hipocolesterolêmicos do quefir. Moser & Savage (2001) indicaram que o *Lactobacillus kefir* tem capacidade de hidrólise de determinados sais biliares. Em vasta revisão, St-Onge (2000) conclui que o kefir, assim como diversas bebidas fermentadas, são classificadas como agentes redutores de colesterol. No entanto, este autor alerta para o fato de um número dos microorganismos componentes

destes produtos não serem colonizadores naturais do aparelho digestório de humanos, acarretando a necessidade de ingestão diária para se alcançar os efeitos. Contrariando os resultados acima, St-Onge et al. (2002), em estudos com humanos recebendo o fermentado por quatro semanas, concluíram que o quefir não teve efeito no colesterol total, LDL-colesterol, HDL-colesterol ou concentrações de triglicerídeos.

O quefir tem uma ação marcante sobre a composição da flora microbiana intestinal. Marquina et al. (2002) concluíram, com experimento realizado em camundongos, que, através da ingestão do simbiótico, há aumento da colonização por bactérias produtoras de ácido lático e enterocócicas. Por outro lado, seus achados indicaram uma diminuição de *Escherichia coli* e *Listeria*, bactérias patogênicas ao aparelho digestório. Ota (1999), Garrote et al. (2000) e Garrote et al. (2002) também deduziram capacidade antimicrobiana para *Escherichia coli*. A colonização de hospedeiros por microorganismos benéficos também foi descrita por ampla revisão de Ottogalli & Galli (1997) sobre produtos fermentados de consumo no mediterrâneo, incluindo o quefir. Estes autores ainda caracterizam estes produtos como uma boa alternativa para países em desenvolvimento que sofrem de subnutrição por deficiência de vitaminas. Em uma outra revisão, Yother et al. (2002) destacam o poder antimicrobiano contra gram-positivos de bacteriocininas produzidas por *Lactobacillus lactis* isolado do quefir, relatando seu atual uso comercial em alimentos infantis e produtos veterinários. Zubillaga et al. (2001) também revisaram benefícios para crianças, para fortalecimento do sistema imune, melhora da digestão e absorção da lactose, controle de infecções intestinais, e para pacientes com cirurgias gástricas ou infectados por *Helicobacter pylori*. Vale ressaltar que, aparentemente, os efeitos da ingestão oral do quefir sobre intestinos e resposta imune são encontrados em animais jovens, mas não em idosos (THOREUX & SCHMUCKER, 2001).

Vrese et al. (1992) evidenciaram que o quefir tem efeito benéfico na digestão e absorção de lactose. Os autores atribuem este efeito à ação da enzima microbiana beta-galactosidase. Posteriormente, os mesmos autores (VRESE et al., 2001) confirmaram os achados. Em pesquisa realizada com humanos, Hertzler & Clancy (2003) chegaram à mesma conclusão, acrescentando que os efeitos foram estatisticamente iguais aos do iogurte.

Polissacarídeos do quefir têm atividade anti-tumoral, tanto administrados oralmente quanto em região intra-peritoneal (ZUBILLAGA et al., 2001). Os resultados obtidos com camundongos chegaram a diminuir em até 59% o crescimento de tumores induzidos (SHIOMI et al., 1982). Resultados *in vitro* também foram encontrados (MUROFUSHI et al., 1983; KUBO et al., 1992). Murofushi et al. (1986) também encontraram resultados semelhantes, acrescentando que a dose ideal seria a de 100 mg de quefirano por quilograma de peso corporal do indivíduo. Yoon et al. (1999) encontraram resultados que demonstram uma resposta antitumoral diferente para cada microorganismo de quefir europeu. *Lactobacillus plantarum* apresentou a atividade antimutagênica mais forte, atingindo 50,34%. Resultados satisfatórios também foram encontrados com outras bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Contrariando estes achados, Wollowski et al. (2001) e Zubillaga et al. (2001) revisaram alguns resultados negativos.

Uma outra aplicação clínica importante do quefir pode ser sua administração conjunta com antibióticos. Oleinichenko et al. (1999) realizaram um estudo com 120 pacientes russos recebendo antibioticoterapia para pneumonia aguda e bronquite crônica. Os pacientes que receberam uma mistura comercial de quefir com alto teor de *Lactobacillus acidophilus* tiveram uma melhor resposta para o funcionamento intestinal normal, evitando as disbacterioses. Nuruzova et al. (2000) também descreveram resultados positivos obtidos pela administração conjunta de quefir em pacientes recebendo antibioticoterapia.

El-Kassaby et al. (1997) demonstraram que bebidas lácticas fermentadas, inclusive quefir, têm efeito benéfico na regeneração hepática. O estudo foi feito com ratos hepatectomizados cirurgicamente. Importante ressaltar que a composição histoquímica qualitativa dos grupos tratados com leites fermentados e controle foi idêntica.

Métodos de produção de fármacos também vêm sendo propostos utilizando-se microorganismos isolados do quefir. Shimizu et al. (1999) utilizaram uma cultura mista de *Lactococcus lactis* spp. *lactis* e *Kluyveromyces marxianus* para controlar o pH durante a produção de peptídeo antimicrobiano. Rodrigues et al. (2003) vêm propondo a formulação de pomada para uso tópico em inflamações.

#### 2.1.2.4.4 Inocuidade do quefir

Marteau & Salminen (1998) alertam para a possibilidade de riscos na ingestão de probióticos, uma vez que estes são microorganismos. Respalhando-se em teorias consensuais da fisiologia, bioquímica e imunologia, destacam para quatro possíveis riscos. O primeiro deles estaria relacionado à possibilidade de infecção. O próprio autor reconhece que não há relatos a respeito, embora casos excepcionais de fungemia tenham sido identificados em tratamento oral com a levedura *Saccharomyces boulardii*. Um segundo risco seriam os efeitos metabólicos e enzimáticos, que não apresentam nenhuma observação relatada. Os efeitos imunológicos seriam um terceiro fator de risco, e o autor cita um caso de um paciente que sofrera recaída de hepatite auto-imune, possivelmente induzida por ingestão de grande quantidade de iogurte. Por último, há que se observar a possibilidade de transferência de genes entre probióticos e flora endógena.

Angulo et al. (1993) identificaram alguns microorganismos patógenos nos grãos de quefir. Com grandes variedades quantitativas nas diferentes fontes dos grãos obtidos, identificaram-se *Pediococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp., *Acetobacter* spp. e *Escherichia coli*. Em uma das fontes, o número de microorganismos contaminantes chegou a um terço do total. A média quantitativa de contaminantes ficou em 16%.

Quefir obtido de seis domicílios em Porto Alegre, RS, foi analisado sob o ponto de vista higiênico-sanitário por Shama (1998). Os resultados apontaram que existiam coliformes totais, mesófilos aeróbios. Coliformes fecais e enterococos não foram identificados. A fermentação por dez dias foi suficiente para não ser mais encontrado nenhum dos microorganismos acima descritos. A autora concluiu que a descontaminação observada torna o quefir um suplemento seguro sob o ponto de vista da epidemiologia e da vigilância sanitária.

Rabl et al. (1994) fermentaram com grãos de quefir um refresco de limões e figos adoçados com sacarose. Após dois dias, foi identificada uma dose de 16 g/L de etanol. Com sete a dez dias de fermentação, essa dosagem aumentou para 38 g/L. Os autores concluem que poderia haver riscos ao indivíduo que ingerisse tal refresco e imediatamente passasse a conduzir um veículo automotor. Este estudo foi requerido por especialistas em criminologia para avaliação de culpabilidade de um réu.

### 2.3 Metabolismo de lipídios

O transporte e manutenção de lipídios solúveis no plasma, como triglicerídeos e colesterol, é realizado por albumina sérica e por lipoproteínas. Lipoproteínas plasmáticas são complexos que possuem um cerne lipídico, formado por triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol, e uma superfície polar de proteínas, as apolipoproteínas, que se apresentam combinadas com colesterol esterificado. Dependendo das densidades e composição lipídica, as lipoproteínas são denominadas quilomícron, VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*), IDL (*Intermediary Density Lipoprotein*), LDL (*Low Density Lipoprotein*), o vulgarmente conhecido “mal-colesterol”, e HDL (*High Density Lipoprotein*), o “bom colesterol”. As funções destas lipoproteínas abrangem composição estrutural das partículas, fornecimento de sítios de reconhecimento para receptores da superfície celular, e ativação e auxílio como coenzimas, para as enzimas envolvidas no metabolismo das lipoproteínas (SILVA, 2005).

O metabolismo dos quilimícrons se inicia no retículo endoplasmático da mucosa intestinal, onde são embalados juntamente com o triglicerídeo dietético, colesterol, fosfolipídios e apolipoproteínas. O produto final é secretado pelo complexo de Golgi (SILVA, 2005).

O metabolismo do VLDL se inicia no fígado. O VLDL compõe-se predominantemente de triglicerídeos, sendo transportado para os tecidos. À medida que circulam, reduzem o seu tamanho por ação da lipase lipoprotéica, e aumentam de densidade. Ocorre então uma transferência de ésteres de colesterila do HDL para o VLDL, com troca concomitante de fosfolipídios e triglicerídeos do VLDL ao HDL. No plasma, ocorre a conversão para LDL, com a formação de uma lipoproteína intermediária, o IDL. O LDL, com menor teor de apolipoproteínas e de triglicerídeos, possui alto teor de colesterol e ésteres de colesterila, e sua função principal é transferi-los aos tecidos. Essa operação é realizada através da deposição daqueles nas membranas das células com que entram em contato (SILVA, 2005).

O metabolismo do HDL se inicia na sua síntese hepática. O HDL remove e esterifica, por intermédio da LCAT, lecitina acil-transferase, o colesterol livre de

tecidos extra-hepáticos, fornecem apo C-II (reservatório de apolipoproteínas), transportam ésteres de colesterol ao fígado e transferem ésteres de colesterol ao VLDL e LDL. Captadas por endocitose hepática, têm seus ésteres de colesterol degradados, com o colesterol livre podendo ser reembalado em outras lipoproteínas, convertido em ácidos biliares, ou excretado através da bile (SILVA, 2005).

A aterosclerose é uma doença típica do transporte lipídico. Ocorre por migração e modificação de monócitos em macrófagos no endotélio, tornando-os espumosos por captação e oxidação de LDL. Esta modificação celular resulta em acúmulo local de macrófagos e permite uma liberação de fatores de crescimento de células musculares lisas e de cálcio, gerando uma calcificação local e produzindo a placa ateromatosa. Outras doenças, mais propriamente de origem genética, incluem as hiperlipidemias tipo I e II. A primeira refere-se ao acúmulo de lipoproteínas ricas em triglicérides no plasma. A segunda hiperlipidemia ao acúmulo de LDL e colesterol plasmáticos (SILVA, 2005).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Cultura de quefir

As amostras de grãos de quefir utilizadas foram obtidas no Laboratório de Fitofármacos da Universidade José do Rosário Vellano (Unifenas). Foram utilizados 200 g de grãos iniciadores de quefir em 400 mL de solução nutriente. Essa solução foi produzida com a adição de 40 g de açúcar mascavo orgânico comercial a 400 mL de água destilada. A solução nutriente foi substituída a cada 48 horas. A cada troca, os grãos foram delicadamente lavados em água corrente, com o auxílio de uma peneira. O sobrenadante fermentado foi denominado “suspensão”, codificado nos resultados com a sigla Susp. Os grãos retidos na peneira foram denominados “quefir in natura”, identificados pela sigla QIN. Parte dos grãos foi submetida à liofilização no Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). O produto fora denominado “quefir liofilizado”, abreviado para QL. Dessa forma os experimentos contaram com três formulações de quefir: *in natura*, fermentado, e liofilizado.

### 3.2 Animais

Foram utilizados 40 coelhos da raça Nova Zelândia Branco, sendo 20 machos e 20 fêmeas. O desmame fora realizado aos 30 dias de idade. Os coelhos foram alojados por grupos experimentais e por sexo, em gaiolas de arame galvanizado, providas de bebedouro automático e comedouro semi-automático, sendo cinco coelhos por gaiola. Os animais foram gentilmente cedidos pelo Setor de Cunicultura da Faculdade de Ciências Agrárias da Unifenas. Foram reservados 10 dias aos animais para adaptação à ração e às gaiolas, antes do início dos tratamentos.

Os coelhos foram alimentados com ração comercial reprocessada artesanalmente. As quantidades de ração e água oferecidas foram aquelas recomendadas por Andriquetto et al. (1992).

Os animais foram sacrificados um dia após o término do 30º dia de tratamento, após jejum de 24 horas, recebendo apenas água. O sacrifício e o preparo para consumo seguiram o preconizado por Medina (1981).

### 3.3 Delineamento experimental

O modelo experimental foi o delineamento em blocos casualizados com quatro tratamentos. A unidade experimental foi um animal. Foram utilizados coelhos machos e fêmeas, sendo distribuídos cinco de cada sexo por tratamento. Para destinar os animais a cada grupo no dia 0 do experimento, foi realizada análise de variância (ANAVA) das médias de peso dos animais. Sorteios consecutivos foram realizados até que não existissem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os grupos.

As rações modificadas foram artesanalmente manufaturadas diariamente a partir da moagem de ração comercial própria aos animais. Após a moagem, foram adicionados os demais ingredientes particulares a cada tratamento, seguindo-se de homogeneização com água destilada. Todas as rações receberam 0,9 % de cloreto de sódio para controle da osmolaridade alterada pelo uso de água destilada. Após a homogeneização, as diferentes rações passaram por processo de peletização e secagem em estufa à temperatura de 35 °C por 24 horas.

O grupo controle recebeu ração adicionada de cloreto de sódio. O grupo QL recebeu ração adicionada de cloreto de sódio e 0,5 % de quefir liofilizado. O grupo Susp recebeu ração adicionada de cloreto de sódio e 4 % de suspensão de quefir. Finalmente, o grupo QIN recebeu ração adicionada de cloreto de sódio e 4 % de quefir *in natura*.

### 3.4 Análise do crescimento

Foram coletados os pesos dos animais ao dia 0 e ao 30º dia de experimento. A diferença entre ambos determinou o crescimento.

Para fins de interesse à produção animal, fora calculado um índice semelhante ao de conversão alimentar. Por terem sido alocados em grupos de cinco animais por gaiola, tornou-se impossível conhecer o consumo de ração individual. Assim, considerou-se a média de consumo da gaiola por animal. Esse valor foi dividido pelo crescimento de cada animal para cálculo do índice.

### 3.5 Análise da resposta lipidêmica

Foram coletadas amostras de cerca de três mL de sangue da veia auricular da orelha esquerda de cada animal no início do experimento, ao 15<sup>o</sup> e 30<sup>o</sup> dias. Todos os animais foram submetidos a jejum de 24 horas antes de cada coleta. Um animal de cada tratamento por vez, e de todos os tratamentos, foi encaminhado para a coleta de sangue, garantindo-se que o tempo de jejum não interferisse nos resultados. As amostras foram mantidas em refrigeração em frasco âmbar para análise em 48 horas.

Os componentes sanguíneos foram avaliados por reação enzimática para análise fotométrica. Foram analisados triglicérides, colesterol total, e a fração de HDL (Laborlab, São Paulo). Formalismo matemático apropriado foi aplicado para se chegar aos resultados de concentração plasmática dos metabólitos mencionados, conjuntamente com as frações LDL e VLDL (CISTERNAS et al., 1999).

Foi aplicado o índice II de Castelli, onde o LDL é dividido pelo HDL para elucidar possíveis razões de aumento do colesterol total. Este índice aplica-se a indivíduos com aumento de colesterol total e de HDL. Um índice II de Castelli baixo indica que o aumento do colesterol total é devido ao aumento de HDL, sendo positivo à promoção de saúde (CASTELLI et al., 1986).

### 3.6 Análise estatística

Os resultados de absorvância obtidos a partir da triplicada de amostras de plasma foram submetidos à análise estatística descritiva. Foram utilizados apenas os dados encontrados dentro do intervalo de uma unidade de desvio-padrão. Uma média desses valores fora calculada e considerada como o valor final de absorvância do teste. Foram realizadas ANAVA de todos os resultados, admitindo-se como significativos os resultados obtidos com p-valor inferior a 0,05. Onde a ANAVA não pode ser viabilizada, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ), ou seja, para a análise dos dados de desempenho e conversão alimentar. A variância e o número de tratamentos determinou o teste de Duncan como o mais apropriado para análise de diferenças entre médias. Não foram encontradas diferenças significativas nas médias entre os sexos, justificando a análise, e desconsiderando-os como fonte de variação (VIEIRA & HOFFMANN, 1989; SAMPAIO, 1998).

Os dados de concentração lipídica plasmática foram submetidos a ajuste linear em função do dia de colheita de sangue. Para análise da diferença de resposta entre os tratamentos, foram comparadas as taxas obtidas de cada equação de regressão. Para gerenciamento de banco de dados, tratamento e análise estatística, foram utilizados os softwares MS-Excel 2000 (MICROSOFT, 1999) e XLStatistics versão 5,75 (XLSTATISTICS, 2005).

## 4 RESULTADOS

Na análise de crescimento dos animais durante o experimento, o teste de homogeneidade de variâncias (F de Hartley) indicou que as mesmas não foram iguais ( $P < 0,05$ ), o que não se coaduna com uma das premissas da ANAVA. Assim, foi realizado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para análise da diferença entre os índices dos grupos ( $P < 0,05$ ). O teste de Mann-Whitney indicou que apenas o grupo que recebeu ração suplementada com quefir *in natura* teve um crescimento menor em relação aos demais.

A Tabela 2 apresenta os valores ajustados da fração de triglicerídeos obtida por punção auricular nos láparos alimentados com formulações distintas de quefir adicionado à ração comercial ao longo dos 30 dias.

A Tabela 2 indica que, no geral, nenhum dos tratamentos seguiu um padrão de evolução da concentração de triglicerídeos ao longo do tempo. Mesmo o maior coeficiente de determinação encontrado apresenta apenas pouco mais de 5% dos pontos incluídos na reta ajustada aos dados.

Essa baixa correlação pode indicar que a amostra foi muito heterogênea, sugerindo a necessidade de um aumento no número de unidades amostrais. Os valores das taxas diárias de triglicerídeos também não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 1). Portanto, não se pode inferir que os diferentes tratamentos influenciaram na resposta sangüínea de triglicerídeos. Uma representação gráfica das taxas globais obtidas (*slope*) é apresentada na Figura 1.

Os resultados da variação diária de colesterol total obtidos após os tratamentos estão representados na Tabela 2. O coeficiente de determinação para a regressão de quefir *in natura* foi significativamente maior que para os demais tratamentos. Cerca de 33 % dos pontos experimentais são compatíveis com a equação de reta, levando a uma maior confiabilidade dos resultados em relação a esse tratamento. Os demais tratamentos apresentam coeficientes de determinação baixos, novamente levando a crer que há alta variabilidade nas respostas das unidades amostrais aos tratamentos (Tabelas 1 e 2).

Tabela 1. Diferenças entre as taxas diárias de HDL, VLDL, colesterol, LDL, triglicerídeos e índice II de Castelli obtidas por ajuste linear dos dados de tratamento de láparos com ração comercial modificada com quefir (valor-p).

<b>Variáveis</b>	<b>Valor-p</b>
<b>HDL</b>	<0,05
Controle x QL	0,68183
Controle x Susp	0,38435
Controle x QIN	<0,05
QL x Susp	0,70586
QL x QIN	<0,05
Susp x QIN	<0,01
<b>VLDL</b>	0,62697
Controle x QL	0,92463
Controle x Susp	0,20833
Controle x QIN	0,75577
QL x Susp	0,21625
QL x QIN	0,70404
Susp x QIN	0,39076
<b>Colesterol</b>	<0,001
Controle x QL	0,57568
Controle x Susp	0,18342
Controle x QIN	<0,01
QL x Susp	0,10169
QL x QIN	<0,001
Susp x QIN	<0,05
<b>LDL</b>	0,55397
Controle x QL	0,58929
Controle x Susp	0,28577
Controle x QIN	0,69529
QL x Susp	0,17329
QL x QIN	0,97122
Susp x QIN	0,34184
<b>Triglicerídeos</b>	0,64468
Controle x QL	0,95576
Controle x Susp	0,22330
Controle x QIN	0,93836
QL x Susp	0,24905
QL x QIN	0,90030
Susp x QIN	0,28352
<b>Índice II de Castelli</b>	0,48301
Controle x QL	0,91685
Controle x Susp	0,42028
Controle x QIN	0,31637
QL x Susp	0,44805
QL x QIN	0,39515
Susp x QIN	0,18706

Tabela 2. Taxas diárias de HDL, VLDL, colesterol, LDL, triglicerídeos e índice II de Castelli e coeficientes de determinação (R2) obtidos do sangue de coelhos alimentados com ração modificada com quefir durante 30 dias.

Variáveis	Todos	Controle	QL	Susp	QIN
<b>HDL</b>					
Taxas	0,04	0,04	0,10	0,15	0,34
R2	0,005	0,006	0,025	0,086	0,214
<b>VLDL</b>					
Taxas	0,09	0,14	0,16	0,03	0,09
R2	0,020	0,220	0,220	0,077	0,140
<b>Colesterol</b>					
Taxas	0,48	-0,08	-0,35	0,52	1,84
R2	0,045	0,003	0,028	0,072	0,336
<b>LDL</b>					
Taxas	0,11	0,19	0,42	0,26	0,44
R2	0,003	0,022	0,051	0,021	0,019
<b>Triglicerídeos</b>					
Taxas	0,52	0,74	0,82	-0,15	0,67
R2	0,027	0,052	0,047	0,006	0,040
<b>Índice II de Castelli</b>					
Taxas	-0,002	-0,005	-0,007	0,010	-0,04
R2	0,001	0,006	0,006	0,019	0,049

Os valores de inclinação (Tabela 2) apresentam diferenças altamente significativas entre si ( $p < 0,001$ ), excetuando-se a análise entre as respostas de quefir *in natura* e suspensão, que resultaram em diferença significativa ( $p < 0,05$ , Tabela 1). Assim, pode-se notar que o colesterol total dos animais tratados com quefir *in natura* aumentou significativamente em relação aos demais. A Figura 1 apresenta uma representação gráfica desses resultados.

Os coeficientes de determinação (Tabela 2) para as retas de regressão do grupo controle e dos tratados com quefir liofilizado e *in natura* apresentam valores similares. Uma variabilidade maior de resposta entre os animais é notada apenas nos tratados com suspensão de quefir, onde se pode observar um valor negativo para a taxa diária de VLDL para o tratamento com suspensão do probiótico, indicando uma diminuição dos níveis de VLDL nestes animais (Tabela 2). No entanto, não foi encontrada significância estatística para nenhuma diferença de inclinação de reta, donde se conclui que nenhuma forma de quefir teve influência nos níveis de VLDL (Tabela 1). A Figura 1 ilustra tais resultados.

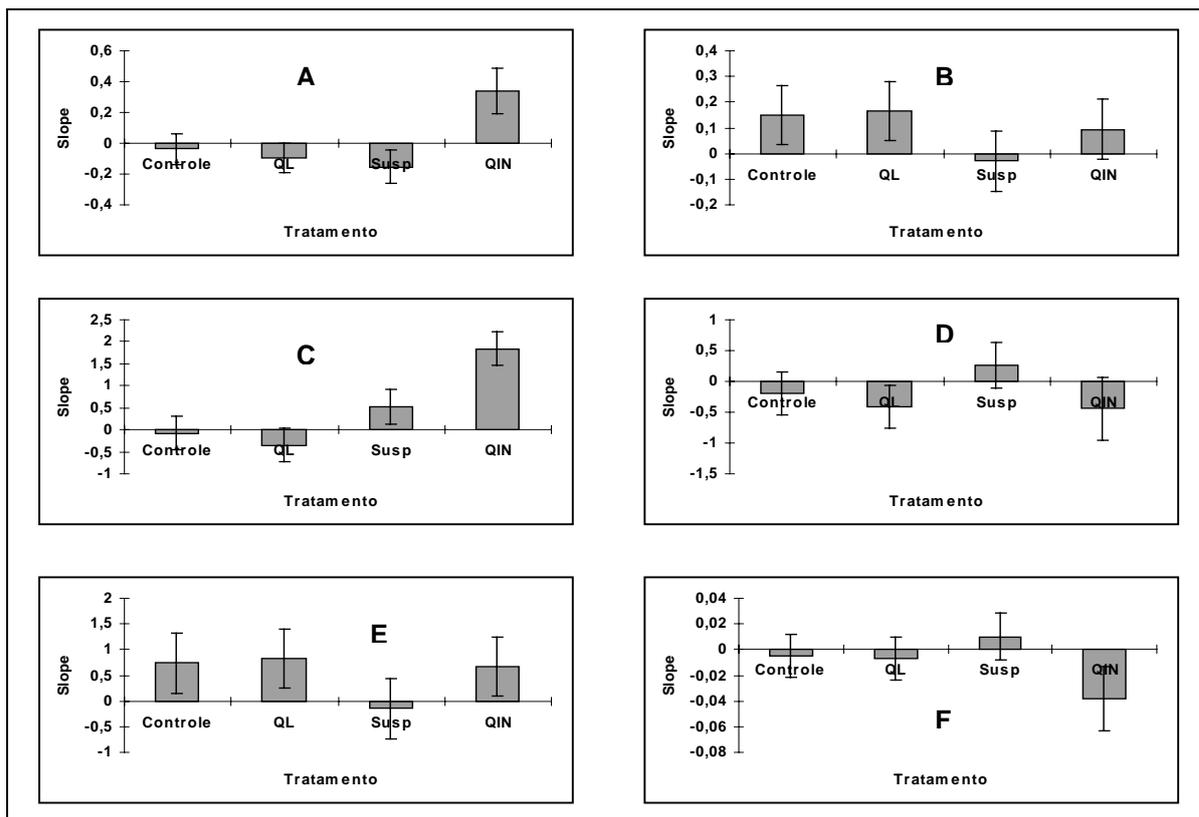


Figura 1. Valores de taxas diárias de HDL (A), VLDL (B), colesterol (C), LDL (D), triglicédeos (E) e índice II de Castelli (F) (*slope*) obtidos para os quatro tratamentos com ração modificada com quefir. As barras verticais representam uma unidade de erro padrão dos dados.

Os resultados de LDL foram bastante semelhantes aos de VLDL. No entanto os coeficientes de determinação das retas de regressão foram todos baixos, indicando, no geral, que houve muita heterogeneidade da amostra nas respostas de concentrações plasmáticas de LDL (Tabela 2).

Da mesma forma, os valores de taxas diárias dos teores de LDL (Tabela 2) não foram significativamente diferentes entre si (Tabela 1). Assim, podemos dizer que nenhuma formulação de quefir alterou os níveis sanguíneos de LDL nos animais estudados. Estes resultados são também visualizados na Figura 1.

Os resultados de HDL foram semelhantes aos encontrados para colesterol total, com os coeficientes de determinação reduzidos, excetuando-se o obtido para o QIN. Nesse caso, os pontos adequaram-se à equação de reta em mais de 21% (Tabela 2), concluindo-se ter havido um melhor ajuste dos dados para este grupo. Os valores das taxas diárias de HDL (Tabela 2) foram significativamente diferentes apenas quando os tratamentos foram comparados com o tratamento por quefir *in natura* (Tabela 1). Assim, o valor de *slope* positivo apenas para quefir *in natura*

indica que apenas este tratamento promoveu aumento dos níveis sanguíneos de HDL nos animais. A Figura 1 ilustra os valores apresentados.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que o arraçoamento suplementado com formulações distintas de quefir não influenciou o crescimento dos animais (Kruskall-Wallis,  $P=0,064$ ). Não obstante, uma comparação entre o grupo de animais que recebeu quefir em grãos (QIN) com o grupo controle indicou uma diferença significativa, com um maior consumo de ração para os primeiros, por ganho de peso (Mann-Whitney,  $P<0,05$ ). Sob o ponto de vista da produção animal, esse resultado é indesejável. No entanto, para o interesse da saúde humana, um ganho menor de peso corporal à ingestão pode ser de interesse em propostas terapêuticas para a obesidade. Os estudos de melhora de desempenho na criação produtiva com administração de probióticos, de fato, ainda não podem ser considerados suficientes para justificar tal investimento. Frizzas (1996) concluiu que os benefícios do *Bacillus subtilis* para frangos de corte são muito poucos. Ávila (2000) teve sucesso na diminuição da incidência de diarreia em bezerros, mas não apresentou resultados finais de desempenho relevantes. Reque et al. (2000) obtiveram resultados similares a de tratamentos com antibióticos para frangos administrando *Lactobacillus fermentum* LPB.

Rossi (2001) chama a atenção para o fato de que a dosagem de microrganismos vivos a ser administrada para alcançar resultados satisfatórios deve ser ainda esclarecida. Portanto, resta ainda analisar se a ausência de resultados neste sentido é devida a esta questão.

Os resultados da suplementação dietética de quefir nas rações preparadas para os animais sugerem alguma influência, particularmente para a formulação de quefir *in natura*, nas concentrações séricas de colesterol e HDL. Por outro lado, observou-se que não houve alteração significativa dos níveis de triglicerídeos, VLDL e LDL.

A princípio, nota-se uma controvérsia nos resultados observados para colesterol total e HDL, uma vez que o aumento do último estaria clinicamente relacionado à diminuição do primeiro (SIMÕES & LODI, 2003). Deve-se considerar que os valores dos coeficientes de determinação foram mais altos para as análises de colesterol, sugerindo que os resultados deste estejam melhor ajustados à função

linear que os de HDL. No entanto, o fato é que existiu uma resposta significativa de aumento para ambos, colocando em dúvida a afirmativa de que o quefir seria benéfico para a prevenção de dislipidemias e, conseqüentemente, para doenças cardiovasculares.

A Figura 2 apresenta dados importantes para a discussão do comportamento da concentração do colesterol total. Segundo Harris (1994), o nível de colesterol normal em coelhos oscila entre 10 e 80 mg/dL, a média variando entre 35 e 55 mg/dL. Visualizando-se as retas, observa-se que os animais nasceram com uma grande variação nos teores de colesterol entre si. Além disso, há uma tendência geral de todos convergirem para valores próximos ao máximo esperado (80 mg/dL) ao 30º dia do experimento. Nota-se, ainda, que a reta de regressão do grupo que foi tratado com quefir *in natura* inicia-se num ponto bem abaixo daqueles dos demais animais. Assim, poderia ser especulada uma tendência geral dos níveis colesterolêmicos se igualarem conforme as condições ambientais do experimento. Assim sendo, como os animais tratados com ração suplementada com quefir *in natura* estavam bem abaixo dos demais, o incremento no aumento acabou resultando em uma concentração mais elevada ao 30º dia e, obviamente, um valor de taxa diária bem mais alto à análise estatística. Esta observação poderia amenizar o efeito adverso observado pelo quefir no que diz respeito ao colesterol total. Para testar a validade dessa assertiva, um experimento similar com períodos maiores de observação poderia ser conduzido a fim de se identificar um perfil quadrático na distribuição dos dados de taxas diárias de colesterol total, o que corroboraria a hipótese em questão. Há ainda que se considerar que todos os animais envolvidos no experimento tenderam a apresentar níveis de colesterol acima da média esperada, inclusive o grupo controle (SIMÕES & LODI, 2003).

Se as premissas anteriores forem verdadeiras, há que se analisar, de maneira análoga, se o aumento de HDL não fora uma tentativa de defesa orgânica para o aumento do colesterol. Assim, os maiores níveis de HDL, encontrados nos animais tratados com quefir *in natura*, não seriam conseqüência da dieta administrada, mas sim do sistema de homeostasia e imunomodulação dos animais participantes do grupo. Corroborar esse sentido o fato de a elevação de HDL não estar estatisticamente relacionada com o aumento do colesterol (Figura 7,  $P=0,14$ ). Isto sugere um papel secundário para a HDL não propriamente correlacionado com a esterificação e o transporte de colesterol para o parênquima hepático.

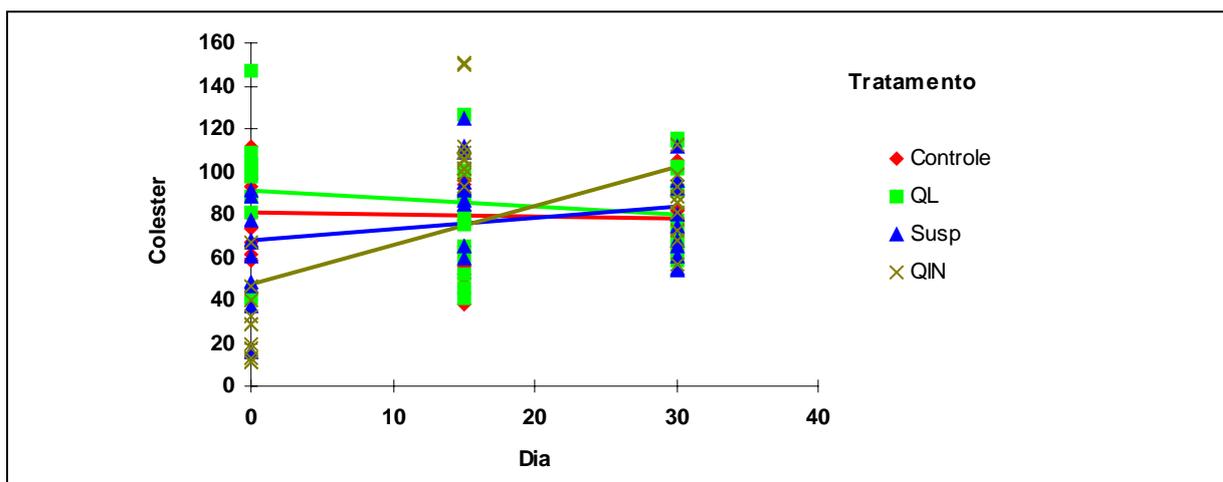


Figura 2. Evolução da concentração plasmática de colesterol total nos diferentes tratamentos.

É passível de discussão importante a forma de administração do quefir. Na formulação das rações, buscaram-se preparações que conteriam biomassa de grãos proporcionalmente semelhantes nos tratamentos. No entanto, apenas o quefir *in natura* induziu algum resultado. Sendo assim, tal fato parece indicar que qualquer modificação biotecnológica (seja por resfriamento ou por separação de fases) no probiótico o tornaria inativo. Outrossim, há que se considerar que qualquer estudo experimental com o quefir deverá ser realizado com esta apresentação e, conseqüentemente, qualquer aplicação de ordem clínica. De qualquer forma, todas as rações foram preparadas de maneira artesanal em laboratório, sofrendo efeitos térmicos controlados para secagem. Há que se considerar, portanto, um possível efeito deletério da temperatura empregada sobre as cepas microbianas constituintes de quefir. Nesse caso, pode-se formular hipóteses sobre possíveis efeitos prebióticos da ração modificada.

Limitações dos métodos empregados e seleção das amostras também devem ser consideradas. Os baixos coeficientes de determinação nas análises de regressão de todas as variáveis indicam que as unidades amostrais estudadas responderam aos tratamentos de forma bastante diferente. Apenas foram considerados razoáveis os coeficientes de determinação das variáveis que apresentaram testes de *slope* significativos. É possível, portanto, que esta não seja uma coincidência, e que, na verdade, a amostra para o experimento fora insuficiente em número, principalmente para uma análise conclusiva do efeito do probiótico sobre triglicerídeos, LDL e VLDL.

Outra fonte de variação dos dados obtidos pode ser também explorada. Os métodos bioquímicos de determinação das variáveis estudadas limitaram-se a apontar diretamente apenas HDL, triglicérides e colesterol total. Os valores de VLDL e LDL foram obtidos a partir de equações onde se tomavam os valores dos três primeiros para a estimativa dos dois últimos. Assim, é possível que alterações em concentrações de lipoproteínas estimadas não tenham sido identificadas devido à utilização de tais equações.

Ainda em relação ao método de estudo empregado, deve-se levar em conta que todos os animais utilizados eram, a princípio, saudáveis. Nenhuma indução de dislipidemia fora provocada. Portanto, os resultados desta dissertação somente devem ser considerados ao se discutirem medidas de prevenção, colocando em dúvida seu valor para análise de potenciais terapêuticos.

Uma tentativa clínica de explicar o aumento de HDL e colesterol total é a aplicação do índice II de Castelli. Os resultados apontaram que não houve diferenças significativas entre os grupos nestes índices. A taxa de inclinação para o grupo que recebeu quefir *in natura* foi negativa, indicando um aumento do HDL ou diminuição do LDL. Por si só, uma redução dos valores do índice já indica uma melhora no estado geral de saúde do indivíduo. Assim, pode-se deduzir que o aumento do colesterol total ocorreu devido ao aumento do HDL.

Finalmente, devemos observar que os resultados da análise estatística são incompatíveis com quaisquer achados na literatura, no que diz respeito ao colesterol total e ao HDL. Os achados de Oba (2000) mostraram que houve uma diminuição de colesterol e triglicérides em poedeiras com suplementação de probióticos. Outrossim, Frizzas (1996) encontrou um aumento da lipase pancreática em frangos recebendo probióticos, otimizando a digestão. No entanto, se tal fato tivesse ocorrido no presente experimento, esperava-se que os triglicéridios também respondessem de maneira análoga, o que não foi observado. Rossi et al (2000) também encontraram aumento de HDL ao estudar coelhos.

Rossi (2001), em sua revisão sobre alimentos funcionais, afirma que os resultados de probióticos de uma maneira geral sobre a colesterolemia são conflitantes e ainda não conclusivos. O autor enfatiza, ainda, que não há uma padronização de métodos para os estudos neste campo e que não há nenhuma evidência sobre um possível mecanismo de ação. Rossi et al. (2000) observaram redução de colesterol em coelhos ao administrarem probióticos. Toit et al. (1998)

observaram resultado semelhante em suínos. Em ambos os estudos não foi identificada redução de triglicérides. Ainda, os dois grupos de autores induziram hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia nos animais, especulando sobre efeitos terapêuticos, diferentemente do presente trabalho.

## 6 CONCLUSÕES

Os teores lipídêmicos parecem ter oscilado a partir de variações ambientais e amostrais. Algumas críticas metodológicas podem ser consideradas nesse ponto. A análise estatística dos resultados permitiu tal inferência. No entanto, alguns procedimentos metodológicos podem ter influenciado nos resultados, tais como ambiente de alocação dos animais, tamanho de amostra, manufatura das rações e equações de estimativa de algumas variáveis estudadas.

O quefir *in natura* interferiu no crescimento dos animais. Sob o ponto de vista da produção animal, os menores índices de crescimento nos animais que receberam formulações à base de quefir *in natura* são indesejáveis. Porém, sob o olhar da promoção da saúde, a indicação do probiótico poderia significar uma alternativa nas terapias para redução de peso.

A falta de uma resposta no crescimento dos animais alerta para o fato de não se justificar um investimento de produtores neste sentido. No entanto, a revisão de literatura indica que ainda há controvérsias a este respeito. Outrossim, nenhum estudo fora encontrado utilizando-se particularmente o quefir. A resposta positiva de aves a probióticos, encontrada em alguns trabalhos, pode justificar estudos com o quefir nesses animais.

O crescimento dos animais, bem como os teores plasmáticos de triglicerídeos, LDL e VLDL, não variaram durante o experimento. Nenhuma influência estatisticamente significativa foi identificada no crescimento, LDL, VLDL e triglicerídeos.

Os teores plasmáticos de colesterol e HDL mostraram-se elevados com a suplementação de fermentado de quefir no arraçoamento. Dentre os resultados, destaca-se o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total e HDL. Ambos somente foram observados quando foi administrado quefir *in natura*. Assim, em relação à forma de administração do probiótico, pode-se especular sobre a inativação das propriedades probióticas do quefir quando submetidos a processos industriais, como separação de fases e liofilização.

O aumento nos teores de HDL não puderam ser mecanisticamente avaliados. O aumento do colesterol coloca uma maior dúvida sobre o uso do quefir em medidas

preventivas de doenças cardiovasculares. No entanto, esse efeito profilático poderia ser alcançado levando-se em conta o aumento do HDL. Neste estudo não fora induzido nenhum nível anormal na lipídemia dos animais para conclusão de efeitos terapêuticos. No entanto, a redução do índice II de Castelli indica que apenas o aumento do HDL deva ser considerado à conclusão do estudo, ignorando-se o aumento do colesterol. Assim, a redução do índice poderia servir como uma ratificação da indicação do quefir *in natura* em medidas de promoção da saúde e prevenção de doenças cardiovasculares.

Não há consenso na literatura científica sobre variações de colesterol e lipoproteínas plasmáticas em nutrição animal. A literatura revisada ainda não permite conclusões sobre os efeitos dos probióticos na lipídemia. Este estudo pode servir para ressaltar que ainda há muitas questões a serem esclarecidas neste âmbito, invocando resultados até então ainda não relatados, como o aumento do colesterol.

A falta de uma resposta no crescimento dos animais alerta para o fato de não se justificar um investimento de produtores neste sentido. No entanto, a revisão de literatura indica que ainda há controvérsias a este respeito. Outrossim, nenhum estudo fora encontrado utilizando-se particularmente o quefir. A resposta positiva de aves a probióticos encontradas em alguns trabalhos pode justificar estudos com o quefir nesses animais.

Finalmente, pode-se concluir que há necessidade de mais pesquisas para esclarecer diversos pontos no que diz respeito às respostas lipídicas ao uso de probióticos. Especial atenção deve ser dada ao estudo dos mecanismos possivelmente envolvidos que justifiquem mais pesquisas experimentais. À experimentação, recomenda-se que amostras maiores sejam utilizadas, dada a variação dos dados observados neste estudo e conseqüentes baixos valores de coeficientes de determinação à análise de regressão. Os resultados obtidos, principalmente relacionados ao colesterol, colocam em grande risco os estudos com seres humanos. O atual perfil epidemiológico mundial coloca as doenças cardiovasculares como a principal causa de morte. Há que se considerar que especial cautela deva ser tomada nos delineamentos de estudos epidemiológicos com humanos, nesse sentido.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. de; Characterization of kefir grains grown in cow's milk and in soya milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 2, p. 327-333, maio 1999.
- ALVES, P. A. de P. et al. Uso de probiótico composto por *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus faecium* e *Sacharomyces cerevisiae* na dieta de vitelos bovinos: efeitos sobre o desempenho e a qualidade da carne. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, 2000.
- ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Normas e padrões de nutrição e alimentação animal: revisão 92**. Curitiba: Nutrição Editora e Publicitária Ltda, 1992.
- ARIHARA, K.; TOBA, T.; ADACHI, S.. Immunofluorescence microscopic studies on distribution of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 127-134, out. 1990.
- ASHWELL, M. **Concepts of functional foods**. Washington: ILSI Press, 2002.
- BARBOSA, C. **A arte de se preparar a carne de coelho**. São Paulo: [s.n.], [19—?].
- BERRUGA, M. I.; JASPE, A.; SANJOSE, C. Selection of yeast strains for lactose hydrolysis in dairy effluents. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 40, n. 2-4, p. 119-123, 1997.
- BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998.
- BLACKBURN, G. L. Pasteur's Quadrant and malnutrition. **Nature**, v. 409, n. 6818, p. 397-401, jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 15, de 30 de abril de 1999. Institui a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mai. 1999a. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/15_99.htm)>. Acesso em: 11 mai. 2003a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 3 dez. 1999b. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/18\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/18_99.htm)>. Acesso em: 11 mai. 2003b.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.º 19, de 30 de abril de 1999. Regulamento de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 dez. 1999c. Disponível em <[http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/19_99.htm)>. Acesso em: 11 mai. 2003c.

BROADBENT, J. R. et al. Biochemistry, genetics, and applications of exopolysaccharides production in *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 86, 2003.

CASTELLI, W. P. et al. Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham study. **The Journal of the American Medical Association**, v. 256, n. 20, 1986.

CAVALCANTI, J. dos S. **Probióticos e farinhas de carne e ossos com diversos níveis de contaminação bacteriana para frangos de corte**. 1995. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Campinas: Unicamp, 2001.

CISTERNAS, J. R.; VARGA, J.; MONTE, O. **Fundamentos de bioquímica experimental**. São Paulo: Atheneu, 1999.

DINIZ, R. O. et al. Study of anti-inflammatory activity of Tibetan mushroom, a symbiotic culture of bacteria and fungi encapsuled into a polysaccharide matrix. **Pharmacological Research**, v. 47, n. 1, p. 49-52, jan. 2003.

DUARTE, A. T.; CARVALHO, J. M. **Cunicultura**. Lisboa: Clássica, 1979.

EL-HINDAWY, M. M. et al. Performance of weanling rabbits as affected by energy level and inclusion of biobiotics in the diet. In: BASELGA, M., MARAI, I. F. M. (Ed.). **Rabbit production in hot climates**. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 1994. p. 157-168.

EL-KASSABY, I.; SHARAF, Ola A.; BASHANDY, S. Comparative effects of milk and fermented milk diets on the regeneration of the rat liver. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4-6, p. 521-530, 1997.

FERNANDES, P. C. C. et al. Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de monogástricos. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, n. 31, p. 53-71, 2000.

FLANDRIN, J.-L.; MONTANARI, M. (Dir.). **História da alimentação**. São Paulo: Estação Liberdade, 1998.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1999.

FRANZETTI, L. et al. Microbiological and chemical investigations on "sugar kefir" drink. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 48, n. 1, p. 67-80, 1998.

FRENGOVA, G. I. et al. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. **Z Naturforsch**, v. 57, n. 9-10, p. 805-810, set./out. 2002.

FRIZZAS, A. C. **Efeito do uso de probiótico sobre o desempenho e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte**. 1996. 70 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1996.

FULLER, R. Modulação da microflora intestinal pelos probióticos. In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION, 46., 1997, Beijing. **Resumo...** Vevey: Nestec, 1998. p. 4-6.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. de. Inhibitory power of kefir: The role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 3, p. 364-369, mar. 2000.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONINI, G. L. de. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 4, p. 639-652, nov. 2001.

GIBSON, G. R.; COLLINS, M. D. O conceito da microbiota colônica equilibrada, os prebióticos e os simbióticos. In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION, 46., 1997, Beijing. **Resumo...** Vevey: Nestec, 1998. p. 18-21.

GIL-TURNES, C. et al. Propriedades da cepa de *Bacillus cereus* utilizada no probiótico CenBiot. **Revista de Microbiologia**, v. 30, n. 1, p.11-14, 1999.

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

HAENLEIN, G. F. W. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 9, p. 2097-2115, 2001.

HARRIS, Ivor. The laboratory rabbit. **ANZCCART News**, v. 7, n. 4, p. 1-7, 1994.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 374S-379S, fev. 2001.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 5, maio 2003.

XLSTATISTICS – Excel workbooks for statistical analysis, version 5,75: Rodney Carr, 2005.

JONES, P. J. Clinical nutrition: 7. functional foods — more than just nutrition. **Canadian Medical Association Journal**, jun. 2002.

KISLINGER, E. Os cristãos do Oriente: regras e realidades alimentares no mundo bizantino. In: FLANDRIN, J.-L.; MONTANARI, M. (Dir.). **História da alimentação**. São Paulo: Estação Liberdade, 1998. p. 318-337.

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

KUBO, M. et al. Pharmacological study on kefir—a fermented milk product in Caucasus. I. On antitumor activity (1). **Yakugaku Zasshi**, v. 112, n. 7, p. 489-495, jul. 1992.

LANDAETA, F. A. C. **Efeito de níveis de energia, proteína e forma física do concentrado sobre o desempenho de coelhos em crescimento**. 1996.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1996.

LANZILLOTTI, H. S. Aplicação da tecnologia de alimentos em alimentação coletiva. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 92, p. 16-25, jan./fev. 2002.

LARA, A. B. W. H. et al. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. In: \_\_\_\_\_ . **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. v. 1.

LAURENTIZ, A. C. de. **Efeito do probiótico e alturas de cama sobre o desempenho de frangos de corte submetidos a diferentes temperaturas**. 2000. 79 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

LEROI, F.; COURCOUX, P. Influence of pH, temperature and initial yeast:bacteria ratio on the stimulation of *Lactobacillus hilgardii* by *Saccharomyces florentinus* isolated from sugary kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 2, p. 138-146, fev. 1996.

LIN, C. W.; CHEN, H. L.; LIU, J. R. Identification and characterisation of lactic acid bacteria and yeasts isolated from kefir grains in Taiwan. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 54, n. 1, p. 14-18, abr. 1999.

LIU, J. R.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 1, p. 104-108, jan./fev. 2002.

LIU, J. R.; LIN, C. W. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose, or sucrose. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 4, p. 716-719, maio/jun. 2000.

MAIORKA, A. et al. Utilização de prebióticos, probióticos e simbióticos em dietas para frangos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 3, n. 1, p. 75-82, jan./abr. 2001.

MARQUINA, D, et al. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 2, ago. 2002.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; FARROW, J. A. A note on the heterofermentative *Lactobacillus* isolated from kefir grains. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 56, n. 3, p. 503-508, jun. 1984.

MARTEAU, P.; SALMINEN, S. A inocuidade dos probióticos. In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION, 46., 1997, Beijing. **Resumo...** Vevey: Nestec, 1998. p. 39-40.

MEDINA, J. G. **Cunicultura**: a arte de criar coelhos. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1981.

MICHELAN, A. C. et al. Utilização de probiótico, ácido orgânico e antibiótico em dietas para coelhos em crescimento: ensaio de digestibilidade, avaliação de morfometria intestinal e desempenho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2227-2237, nov./dez. 2002.

MICROSOFT Excel 2000, version 9.0.2812: Microsoft Corporation, 1999.

MITSUE, T. et al. Isolation of kefir-producing lactic acid bacteria from kefir grain and improvement of kefir productivity. **Seibutsu-kogaku Kaishi**, v. 76, n. 10-12, p. 487-493, 1998.

MOSER, S. A.; SAVAGE, D. C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in *Lactobacilli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 8, p. 3476-3480, ago. 2001.

MUROFUSHI, M. et al. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. **Immunopharmacology**, v. 12, p. 29-35, 1986.

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

NURUZOVA, Z. A. et al. Dysbacteriosis in gastrointestinal diseases and their biocorrection. **Uzbekiston Tibbiet Zhurnali**, n. 3, p. 25-28, maio/jun. 2000.

OBA, A.. **Características produtivas, conservação dos ovos e níveis de colesterol total no sangue e nos ovos de poedeiras comerciais alimentadas com dietas suplementadas com cinza vegetal, cobre, cromo e probiótico**. 2000. 90 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2000.

OLEINICHENKO, E. V.; MITROKHIN, S. D.; NONIKOV, V. E.; MINAEV, V. N. Acipole efficacy in prevention of enteric dysbacteriosis due to antibacterial therapy. **Antibiotiki i Khimioterapiya**, v. 44, n. 1, p. 23-25, 1999.

OTA, A. Protection against an infectious disease by enterohaemorrhagic *E. coli* 0-157. **Medical Hypotheses**, v. 53, n. 1, p. 87-88, jul. 1999.

OTTOGALLI, G.; GALLI, A. Fermented foods in the past and in the future. **Annali di Microbiologia ed Enzimologia**, v. 47, n. 2, p. 237-257, 1997.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K.. Frutooligossacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 2, p. 385-390, mar./abr. 2003.

RABL, W.; LINIGER, B.; SUTTER, K.; SIGRIST, T. Ethanol content of kefir water. **Blutalkohol**, v. 31, n. 2, p. 76-79, mar. 1994.

RAMOS, M. da P. P. et al. Viabilidade de *Bifidobacterium longum* em leite esterilizado e armazenado sob refrigeração. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 106, p. 85-88, mar. 2003.

REQUE, E. de F.; PANDEY, A.; FRANCO, S. G. Isolamento, identificação e estudos fisiológicos de *Lactobacillus fermentum* LPB para uso como probiótico em frangos de corte. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 303-307, out./dez. 2000.

ROBERFROID, M. Alimentos funcionais: o caso dos pro e prebióticos. In: SEMINÁRIO DE NESTLÉ NUTRITION, 46, 1997, Beijing. **Resumo...** Vevey: Nestec, 1998. p. 25-28.

RODRIGUES, N. et al. Produção de grãos de quefir a partir de isolados de microorganismos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 32, 2003, Caxambú. **Resumo...** Caxambú: SBBBM, 2003.

ROMEIRO, M. M. **Coelho**: tudo se aproveita. São Paulo: [s.n.], [19—?a].

ROMEIRO, M. M. **Valor nutritivo da carne de coelho**. São Paulo: [s.n.], [19—?b].

ROSSI, E. A. Alimentos funcionais. In: DÂMASO, A. (Coord.). **Nutrição e exercício na prevenção de doenças**. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p. 335-362.

ROSSI, E. A. et al. Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre os lípides séricos de coelhos hipercolesterolêmicos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 74, n. 3, p. 209-212, mar. 2000.

SAKO, T.; MATSUMOTO, K.; TANAKA, R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 9, n. 1, p. 69-80, jan. 1999.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte: UFMG, 1998.

SHAMA, S. de F. M. S. **Características higiênico-sanitárias e contaminação fecal-experimental de amostras de quefir tradicional**. 1998. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

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

SHIMIZU, H. et al. Nisin production by a mixed-culture system consisting of *Lactococcus lactis* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3134-3141, jul. 1999.

SHIOMI, M. et al. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. **Japan Journal of Medical Science Biology**, v. 35, n. 2, p. 75-80, abr. 1982.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos**: métodos químicos e biológicos. Viçosa: UFV, 1998.

SILVA, E. N. **Probióticos em rações para frangos de corte**. 1999. 66 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

SILVA, J. M. S. F. **Bioquímica em agropecuária**. Alfenas: Ciência Brasilis, 2005.

SIMÕES, A. A.; LODI, W. R. N. (org.). **Lehninger**: Princípios de bioquímica. São Paulo: Sarvier, 2003.

SIMOVA, E. et al. 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, jan. 2002.

SOTELO, B. et al. Estudio cuantitativo y cualitativo de la flora acidolactica a lo largo de la elaboracion industrial de kefir a partir de leche de vaca. **Alimentaria**, v. 38, n. 330, p. 111-119, mar. 2002.

St-ONGE, M.-P.; FARNWORTH, E. R.; JONES, P. J. H. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, n. 3, p. 674-681, mar. 2000.

St-ONGE, M. P. et al. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, jan. 2002.

TAIPINA, M. S.; FONTES, M. A. de S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais — nutracêuticos. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 100, p. 28-29, set. 2002.

TAKIZAWA, S. et al. The composition of the *Lactobacillus* flora in kefir grains. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 121-127, 1998.

TAMAI, Y. et al. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 181-182, 1996.

THOREUX, K.; SCHMUCKER, D. L. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. **Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. 807-812, mar. 2001.

TOBA, T.; ARIHARA, K.; ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, n. 3-4, p. 219-224, maio 1990.

TOIT, M. du et al. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 93-104, mar. 1998.

VASSALO, M. **Probióticos em rações para leitões dos 10 aos 30 kg de peso vivo**. 1995. 50 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

VIEIRA, S.; HOFFMANN, R. **Estatística Experimental**. São Paulo: Atlas, 1989.

VRESE, M. de; KELLER, B.; BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial beta-galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. **British Journal of Nutrition**, v. 67, n. 1, p. 67-75, jan. 1992.

VRESE, M. de et al. Probiotics — compensation for lactase insufficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 421S-429S, fev. 2001.

WOLLOWSKI, I.; RECHKEMMER, G.; POOL-ZOBEL, B. L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 451S-455S, fev. 2001.

WSZOLEK, M. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensmittel Wissenschaft and Technologie**, v. 34, n. 4, p. 251-261, 2001.

YOKOI, H. et al. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. **International Journal of Food Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 257-264, ago. 1991.

YOON, I. H. et al. Antimutagenic activity of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and yoghurt and non-starter strains. **Korean Journal of Animal Science**, v. 41, n. 1, p. 39-44, jan. 1999.

YOTHER, J. et al. Genetics of *Streptococci*, *Lactococci*, and *Enterococci*: review of the Sixth International Conference. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 22, p. 6085-6092, nov. 2002.

ZINSLY, C. F. **Curso de atualização em cunicultura**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 1986.

ZUBILLAGA, M. et al. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. **Nutrition Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, mar. 2001.