UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

MONITORAMENTO DA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS EM
AMOSTRAS DE LEITE FERMENTADO PELOS GRÃOS DE KEFIR E
DO TIBET UTILIZANDO TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS E HPLC

Lídia Santos Pereira Martins

Tese apresentada ao Instituto de Química
de São Carlos, da Universidade de São
Paulo como requisito para obtenção do
Título de Doutor em ciências - Química
Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo

São Carlos

2006

Martins, Lília Santos Pereira

Monitoramento da produção de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentados pelos grãos kefir e do Tibet utilizando técnicas voltamétricas, RP-HLPC./Lília Santos Pereira Martins. – São Carlos, IQSC, 2006.
151p.

Tese (Doutorado)-Instituto de Química de São Carlos/
Universidade de São Paulo, 2006

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Mazo

1.Leite Fermentado. 2.Eletroquímica.3.HPLC. Título

Dedico este trabalho

A minha mãe, Waldelice, pela sua força de vontade em colocar todos seus filhos para estudar, com todo sacrifício. Quero ainda destacar, que esta foi, uma visão indispensável e essencial para este resultado, meu muito obrigada!

Ao meu pai, João Achilles, pelo exemplo de ser alegre e trabalhador.

Aos meus irmãos Maria do Carmo, José Raimundo, Lurdemar, José Roberto, Marina e Jurandir por formamos uma família que muito se ama e pelo bem-querer forte que existe entre nós. E ao meu cunhado, Raimundo Silva, pelas palavras amigas e de apoio.

Ao meu marido, Keyll Carlos, pela ajuda, por ser muito amigo e sempre disponível quando precisei.

Ao meu querido filho Felipe Gabriel pelos momentos que me ausentei e por tantas alegrias dadas.

Ao meu sogro “in memorium” Antonio Soares pelo carinho e respeito dispensados a mim. A minha sogra pelos incentivos e a Maria Cristina pelas atenções e companhias.

Agradecimentos

A Deus pela vida e pela força para enfrentar todas as dificuldades.

Ao professor Luiz Henrique Mazo pela orientação deste trabalho e por ter confiado em mim. Quero também fazer um agradecimento especial a sua qualidade de ser muito humano e muito amigo.

Ao Dr. Guilherme Miola Titato pela co-orientação na parte de cromatografia e exemplo de profissionalismo que demonstrou ao longo de nossa parceria e a Maribel sempre solícita nas ocasiões em que precisei.

Ao Prof. Emanuel Carrilho e a Profa. Eny M. Vieira pelas contribuições ao trabalho durante o exame de qualificação.

Ao Gian Carlos, “Jhi” meu muito obrigado pelas discussões e contribuições importantes para a consumação deste trabalho.

Aos professores do departamento de química e biologia da Universidade Estadual do Maranhão pelo apoio no meu afastamento e também as secretárias Laurinete e Juceneide e a todos que participaram deste processo.

Aos amigos do laboratório GMEME: Prof. Luiz Alberto Avaca e Prof. Sérgio Antonio Spínola Machado por me aceitar no grupo. E em a especial a Andréa, Djenaine e Rafael pelas ajudas. Aos demais pelos momentos de descontração e convívio Katlin,

Marirah, Fabiano, Robson, Mauro, Cláudia Coutinho, Cláudia, Osmair, Renata, Marcelo, Eliane, Marisa, Maria Luiza, Inês, Hugo, Murilo, Michele, Milena, Alexandra e Sônia.

Ao João Tiengo pelo seu auxílio técnico em todos os momentos solicitados, compromisso e eficiência.

Agradecimento especial a “minha irmã” Marina e ao meu cunhado Silva pelos valiosos conselhos, amizade, orações e atenção, importantíssimos nestes anos todos e a minha irmã Maria do Carmo pelo companheirismo, elevado sentimento de fraternidade e atenção e também por ter acompanhado junto a imobiliária o aluguel da minha casa. E a todos vocês, por terem vindo, aqui , em São Carlos, por duas vezes, trazer energia e amor.

As bibliotecárias Wilneide, Regina, Bernadete, Sônia, Eliana pela atenção em todos os momentos que precisei.

Ao colegas do grupo de biofísica molecular Juliana, Priscila, Sandra, Renato, Cláudia e “Pecherrucha” pelos momentos de descontração e a Profa. Janice por ter me acolhido no IQSC.

À Maria Sílvia de Guzzi Plepis e a Andréia Cristina de Moraes Cardoso pela prestação de serviços da CPG.

Ao programa Capes-PICDT pelo apoio financeiro.

Portanto, se alguém de vós tiver falta de sabedoria, persista em pedi-la a Deus, pois ele dá generosamente a todos, e sem censurar, e ser-lhe à dada.

Tiago 1,5.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO.....	0
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leite Fermentado.....	1
1.2. Leite	5
1.3. Kefir e Grãos de Kefir	8
1.3.1 Microbiologia do kefir: Bactérias e Leveduras.....	16
1.3.2. Distribuição da microflora dos grãos de kefir usando Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV/SEM).	20
1.3.3. Fabricação de kefir.....	24
1.3.4. Polissacarídeo do kefir - Kefirano	26
1.4. Grãos de Tibet	30
1.5. Ácidos orgânicos em derivados de leite	31
1.5.1. Outros compostos no leite fermentado	33
1.5.2. Ácidos orgânicos produzidos por espécies de bactérias (fermentadoras do leite), leveduras, aceto bactérias e existentes no leite.....	35
OBJETIVOS.....	46

OBJETIVOS.....	47
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	48
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	49
2.1. Técnicas Voltamétricas.....	49
2.1.1. Ultramicroeletrodos	49
2.2. Cromatografia Líquida	58
2.2.1. Os fundamentos teóricos em cromatografia líquida	58
2.2.2 Validação do método LC para determinação de ácidos orgânicos em leites fermentados.....	61
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	70
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	83
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	84
3.1. Eletroquímica	84
3.1.1. Eletrodos	84
3.1.2. Voltametria cíclica usando ultramicroeletrodo (UMEs)	84
3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	85
3.2.1. Técnica de Extração em Fase Sólida (SPE)	85
3.2.2. Metodologia da Extração em Fase Sólida.....	86
3.3. Cultivo do grão kefir em leite.....	87
3.4. Obtenção de polissacarídeo de kefir.....	88
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	92
4.1. Estudo do pH do leite e do leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet	92

4.2. Voltametria Cíclica	94
4.2.1. Teste de eletroatividade de compostos presentes no leite e leite fermentado em UMEs.	94
4.2.2 Variação da velocidade de varredura do leite e leite fermentado em UME de ouro.	99
4.2.3. Variação da concentração de leite fermentado em H_2SO_4 4,5 mmol L^{-1} em eletrodo de ouro.	106
4.2.4 Teste de Eletroatividade de Polissacarídeo kefirano em UMEs .	110
4.3. Obtenção dos espectros de Absorção no UV dos Ácidos Orgânicos	116
4.4. Cromatografia Líquida	118
4.4.1. Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) para quantificação de ácidos orgânicos em leites fermentados	118
4.4.2. Proposta de uma metodologia para a determinação de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentados pelos grãos kefir e do Tibet e amostra comercial de iogurte.	127
4.5. Avaliação do tempo de armazenamento de leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet, através do monitoramento da presença de ácidos orgânicos por HPLC e pela avaliação do pH.	137
4.6 Influência da temperatura na concentração de ácidos orgânicos por HPLC.	142
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES.	147
5. CONCLUSÕES.	148
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 151

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Precusores para a síntese do leite no ruminante	7
Figura 2. - Grãos de kefir	10
Figura 3. Microscopia de varredura eletrônica (MEV) de grãos de kefir	23
Figura 4 – Estrutura química proposta do kefirano.....	26
Figura 5.- Grão do Tibet.....	31
Figura 6 – Variação de potencial aplicado com o tempo em voltametria cíclica. E_f , potencial final, E_i potencial inicial, E_{max} , potencial máximo e E_{min} , potencial mínimo	54
Figura 7 – Voltamograma cíclico hipotético para um processo redox reversível $O + ne^- \rightleftharpoons R$	54
Figura 8 - Voltamograma cíclico de um composto hipotético mostrando o efeito do aumento da irreversibilidade da corrente em função do potencial.	57
Figura 9 – Voltamograma cíclico para processos redox irreversíveis (curva A) e quase-reversíveis (curva B)	58
Figura 10 - Estudo do pH do leite integral (I), leite na presença de grão do Tibet (•) e grão Kefir (?), durante tempo de 12 h. Massa de grão do Tibet 5,46g e massa de grão Kefir 5,46g em volume de 100 mL de leite	93
Figura 11 - Voltamograma cíclico de caracterização do eletrodo de platina em solução ácida de $K_3(FeCN)_6$ 1 mmol L ⁻¹ em H ₂ SO ₄ pH 2,3 em velocidade de 5mV s ⁻¹	96
Figura 12 - Voltamograma cíclico de uma amostra de leite obtido utilizando-se um UME de Pt (d = 25 µm) a 10 mV s ⁻¹	97
Figura 13 - Voltamograma cíclico de uma amostra de leite fermentado pelo grão de kefir utilizando UME de Pt (25 µm) a 10 mV.s ⁻¹	98
Figura 14 – (A): Voltamogramas cíclicos em solução 4,5 mmol L ⁻¹ de H ₂ SO ₄ contendo 8g de amostra comercial de iogurte utilizando UME de ouro (r = 10 µm	

) em diferentes velocidades. Velocidades (a) 20; (b) 50 (c) 100 e (d) 200 mV s^{-1} ;	
(B): curva i_p vs. v e (C): curva i_p vs. $v^{1/2}$.	100
Figura 15 – (A): Voltamogramas cíclicos em solução 4,5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 contendo 8g de amostra de leite fermentado pelo grão de kefir utilizando UME de ouro ($r = 10 \mu\text{m}$) em diferentes velocidades. Velocidades (a) 20; (b) 50 (c) 100 e (d) 200 mV s^{-1} ; (B): curva i_p vs. v e (C): curva i_p vs. $v^{1/2}$.	101
Figura 16 – (A): Voltamogramas cíclicos em solução 4,5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 contendo 8g de amostra de leite fermentado pelo grão de tibet utilizando UME de ouro ($r = 10 \mu\text{m}$) em diferentes velocidades. Velocidades (a) 20; (b) 50 (c) 100 e (d) 200 mV s^{-1} ; (B): curva i_p vs. v e (C): curva i_p vs. $v^{1/2}$.	102
Figura 17 – Curvas do logaritmo da corrente de pico anódica (i_{pa}) em função do logaritmo da velocidade de varredura para o grão de kefir	104
Figura 18 - Curvas do logaritmo da corrente de pico anódica (i_{pa}) em função do logaritmo da velocidade de varredura para o grão de tibet	105
Figura 19 - Curvas do logaritmo da corrente de pico anódica (i_{pa}) em função do logaritmo da velocidade de varredura para amostra comercial de iogurte Mix Vigor.	105
Figura 20 – (A): Voltamograma de varredura linear para amostra de leite fermentado pelo grão do tibet utilizando UME de ouro ($r = 10 \mu\text{m}$) 100 mV s^{-1} e (B): Corrente de pico vs. concentração.	107
Figura 21 – (A): Voltamograma de varredura linear para a amostra de iogurte comercial, utilizando UME de ouro de. $r = 10 \mu\text{m}$ a 100 mV s^{-1} e (B): Corrente de pico vs. concentração.	108
Figura 22 – (A): Voltamograma de varredura linear utilizando UME de ouro de amostra de leite fermentado pelo grão do kefir. $r = 10 \mu\text{m}$ em 100 mV s^{-1} e (B): Corrente de pico vs. concentração.	109
Figura 23- Voltamogramas de varredura linear em solução 4,5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 contendo 8g de amostras de iogurte comercial, de leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet, utilizando UME de ouro ($r = 10 \mu\text{m}$) a 100 mV s^{-1} .	110
Figura 24 – Voltamograma cíclico obtido com eletrodo de cobre ($r = 50 \mu\text{m}$) a 50 mV s^{-1} para: (A) solução de NaOH 0,1 mol L^{-1} ; (B) solução de galactose 1 mmol L^{-1} em NaOH 0,1 mol L^{-1} ; (C): solução de glicose 1 mmol L^{-1} ; (D) solução	

de 0,36 g de polissacarídeo do grão de kefir em 10 mL em NaOH 0,1 mol L ⁻¹ em velocidade de 50 mV s ⁻¹	111
Figura 25 - Voltamograma cíclico obtidos com eletrodo de cobre ($\varphi = 50 \mu\text{m}$), para: (A) solução padrão de glicose e (B): polissacarídeo de kefir em velocidade de 50 mV s ⁻¹ em diferentes quantidades de massa 0,09; 0,18; 0,32 e 0,72g em 10 mL de NaOH 0,1 mol L ⁻¹	112
Figura 26 – Perfil voltamétrico de eletrodo de ouro em uma solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ em a 100 mV s ⁻¹	113
Figura 27 - Voltamograma de varredura linear de solução de (A): glicose 52 mmol L ⁻¹ e (B) galactose 100 mmol L ⁻¹ (NaOH 0,1 mol L ⁻¹) em eletrodo de ouro, $v=100 \text{ mV s}^{-1}$	115
Figura 28 - Voltamograma cíclico de uma solução de polissacarídeo do grão de kefir em solução de NaOH 0,1 mol L ⁻¹ para diferentes massas de 0,05; 0,10; 0,20 e 0,50g, utilizando eletrodo de ouro à velocidade de 100mV s ⁻¹	116
Figura 29 - Espectros de absorção na região do UV dos ácidos orgânicos em concentrações (mmol L ⁻¹): pirúvico (0,50); cítrico (0,40); láctico (24,17); fórmico (8,52); acético (6,10); succínico (8,50); oxálico (0,16) e úrico (0,32).	117
Figura 30 - Cromatograma de uma mistura padrão de 8 ácidos orgânicos. FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; pH 2,2; $t = 35^\circ\text{C}$; $F = 0,9 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injetado 20 μL ; detecção UV 210 nm; identificação dos picos dos ácidos orgânicos em concentração mmol L ⁻¹ : (1) oxálico (0,32); (2) fórmico (8,5); (3) pirúvico (0,32); (4) láctico (12,0); (5) acético (14,0); (6) úrico (0,24); (7) cítrico (0,32) e (8) succínico (8,51).	119
Figura 31 - Cromatograma obtido por HPLC de amostra de leite integral (4g em 10 mL de H ₂ SO ₄ 4,5 mmol L ⁻¹ . Condições: FM (100% tampão fosfato, pH (2,2); vazão FM (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 μL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.	121
Figura 32 - Cromatogramas obtidos por HPLC de amostra: iogurte comercial (4 e 8g), respectivamente. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão FM (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 μL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados em todas as amostras: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.....	123

Figura 33 - Cromatogramas obtidos por HPLC de leite fermentado pelo grão kefir (4 e 8g), respectivamente. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão FM (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados em todas as amostras: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.	124
Figura 34 - Cromatogramas obtidos por HPLC de leite fermentado pelo grão do Tibet (4 e 8g), respectivamente. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão FM (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados em todas as amostras: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.	125
Figura 35 – Cromatograma do tampão fosfato pH = 2,2. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão F (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm.	128
Figura 36 – Curva de calibração para solução padrão de ácidos orgânicos, usando as seguintes condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão F (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm.	129
Figura 37 – Variação de pH durante dias de armazenamento: 0, 7, 14 e 21 dias...	138
Figura 38 – Concentração de citrato, lactato, piruvato e acetato durante o armazenamento de kefir (n=3).....	140
Figura 39 - Concentração de citrato, lactato, piruvato e acetato durante o armazenamento de tibet (n=3).....	141
Figura 40 – Influência da temperatura no pH e no tempo de fermentação para leite fermentado pelos grãos de kefir e do tibet.....	144
Figura 41 – Influência da temperatura na concentração de ácidos láctico, acético, pirúvico e cítrico para o leite fermentado pelos grãos de kefir.....	146
Figura 42 - Influência da temperatura na concentração de ácidos láctico, acético, pirúvico e cítrico para o leite fermentado pelos grãos de tibet.....	146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Codex Alimentarius do kefir*	9
Tabela 2 – Definição de alimentos funcionais e probióticos	11
Tabela 3 - Microrganismos identificados em kefir e grãos de kefir	16
Tabela 4 – Bactéria encontrada em grãos de kefir e kefir	18
Tabela 5 – Leveduras encontradas nos grãos de kefir e kefir.....	20
Tabela 6 – Produção de exopolissacarídeo por bactérias ácidas lácticas de grãos de kefir.....	29
Tabela 7 - Lista de compostos estudados e/ou existentes no leite fermentado com PM (peso molecular), fórmulas estruturais e pKa dos ácidos.	35
Tabela 8 – Valores de I_p e E_p para pico de oxidação dos voltamogramas cíclicos de leite fermentado pela amostra comercial de iogurte em H_2SO_4 4,5 mmol L ⁻¹ variando a velocidade de varredura em UME de ouro (γ = 50 μ m).	103
Tabela 9 – Valores de I_p e E_p para pico de oxidação dos voltamogramas cíclicos de leite fermentado pelos grãos de kefir em H_2SO_4 4,5 mmol L ⁻¹ variando a velocidade de varredura em UME de ouro (γ = 50 μ m).	103
Tabela 10 – Valores de I_p e E_p para pico de oxidação dos voltamogramas cíclicos de leite fermentado pelos grãos de tibet em H_2SO_4 4,5 mmol L ⁻¹ variando a velocidade de varredura em UME de ouro (γ = 50 μ m).	103
Tabela 11 - Valores de tempos de retenção obtidos com soluções-padrão dos ácidos orgânicos. Condições: FM (100% tampão fosfato, pH (2,2); vazão FM (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 μ L); detecção no UV à 210 nm.	120
Tabela 12 - Valores de concentração e tempos de retenção de ácidos orgânicos, obtidos de amostra de leite integral. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão F (0,9 mL min ⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 μ L); detecção no UV à 210 nm.	121
Tabela 13 - Determinação quantitativa de ácidos orgânicos em leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet e em amostras de iogurte comercial.	127

Tabela 14 - Equação da regressão para curva de calibração e análise da linearidade	130
Tabela 15 - Resultado de repetibilidade da análise de “intra-day” (n = 4) e “inter-day” (n = 4)	132
Tabela 16 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do TIBET para um nível médio de concentração.	134
Tabela 17 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do TIBET para	134
Tabela 18 – Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do KEFIR para	135
Tabela 19 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do KEFIR para	135
Tabela 20 – Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do IOGURTE	136
Tabela 21 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do IOGURTE	136
Tabela 22. Acompanhamento da produção de ácidos orgânicos (mmol L ⁻¹) durante tempo de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias).....	142
Tabela 23. Acompanhamentos da produção de ácidos orgânicos em diferentes temperaturas (10, 20, 30, e 40 °C) pelos grãos kefir e do Tibet.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAB	Bactéria ácida acética
ACN	Acetonitrila
AOAC	Associação oficial dos comitês analíticos (Association of Analytical Communities)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCAB	Codex Alimentarius do Brasil
CV	Coeficiente de variação
C18	Fase estacionária do tipo octadecilsilano
ESD	Extrato Seco Desengordurado
FAO	Organização das nações unidas para a agricultura e alimentação (Food and Agriculture Organization)
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase móvel
LAB	Bactéria Ácida Láctica
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lc.</i>	<i>Lactococcus</i>
LC	Cromatografia Líquida
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Detecção em Massa
HPLC	Cromatografia Líquida de Alto Desempenho
SEM/MEV	Microscopia de varredura eletrônica

<i>subsp</i>	subespécie
mV	milivolt
nm	nanômetro
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial de Produtos de Origem Animal
RSD	Desvio padrão relativo
µm	micrometro
UME	Ultramicroeletrodo
UV	Ultravioleta
ufc mL ⁻¹	Unidade Formadora de Colônia por mililitro
VC	Voltametria Cíclica
WHO	Organização Mundial para a Saúde (world health organization)

RESUMO

Neste trabalho duas espécies de grãos, de kefir e do tibet, popularmente conhecidas e utilizadas para fermentar o leite, foram estudados neste trabalho, no que se refere aos produtos formados durante a fermentação.

O grão de kefir é uma associação simbiótica de microorganismo pertencente a diversas espécies incluindo no geral bactérias ácidas lácticas (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e bactérias ácidas acéticas (*Acetobacter*). O grão de tibet é, também composto por uma associação simbiótica de leveduras e bactéria ácida láctica. No entanto, grãos de kefir e tibet são muito similares em quantidade microbiológica, procedimento de cultivo, muito similar em estrutura e produtos de fermentação, mas diferem em aspecto visual.

A voltametria cíclica e cromatografia líquida de alta eficiência, em fase reversa (HPLC) com detecção no UV em 210nm operando no modo de eluição isocrático, foram aplicadas para determinar ácidos orgânicos em leite fermentados pelos grãos kefir e do Tibet e em amostra de iogurte comercial. Em ambos os métodos utilizados os resultados obtidos mostraram a presença de ácidos orgânicos em leite e no leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet e em amostra comercial de iogurte. Essas matrizes mostraram eletroatividade em ultramicroeletrodo de ouro. E nas análises por HPLC foi comprovado a presença de ácidos orgânicos e em grandes quantidades para cinco ácidos dos oito presentes nas amostras.

Neste trabalho, foi efetuada a determinação de 8 ácidos orgânicos. Nas amostras citadas foram identificados os ácidos láctico, oxálico, pirúvico, acético, úrico, cítrico, succínico e fórmico. Esta identificação foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos compostos nas amostras de leite fermentado com os tempos de retenção dos padrões dos ácidos injetados individualmente para a técnica de HPLC. E quanto a aplicação da voltametria na análise de leite fermentado, o grão de Tibet demonstrou maior resposta analítica entre corrente e concentração, comparado ao grão de kefir e amostra comercial de iogurte.

Fazendo uma análise comparativa das duas técnicas a HPLC tornou-se mais adequada devido a maior seletividade.

Palavras-chave: leite fermentado, ácidos orgânicos, voltametria cíclica, cromatografia líquida de alta eficiência, determinação analítica.

ABSTRACT

The products formed during the milk fermentation using the kefir and tibet grains (popularly known species) were studied in this work.

The kefir grain is a symbiotic association of microorganisms that includes several species of lactic acid bacteria (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*), yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) and acetic acid bacteria (*Acetobacter*). The tibet grain is also composed by a symbiotic association of yeasts and lactic acid bacteria. In spite of, the kefir and tibet grains are very similar in microbiologic components, cultivation procedure, structure and fermentation products, they differ in visual aspect.

For the determination of the organic acids contained in fermented milk by the kefir or tibet grains and in a sample of commercial yogurt, the cyclic voltammetry and high performance liquid chromatography (HPLC) in reverse phase techniques were applied, the later was operated in isocratic elution mode with detection in the UV (210nm) region. In both techniques used, the obtained results showed the presence of organic acids in milk and in the fermented milk by the grains kefir and tibet and in the sample of commercial yogurt. Those matrixes showed electroactivity on a gold ultramicroelectrode and their analyses using HPLC was also possible. Thus, the presence of organic acids in great amounts for five acids of the eight presents in the samples was confirmed.

In this work, the detection of 8 organic acids was carried out. In the mentioned samples were identified the lactic, oxalic, pyruvic, acetic, uric, citric, succinic and formic acids. This identification was performed by comparison among the retention times of the compounds in the samples of fermented milk with the retention times of the patterns of the acids, injected individually for the HPLC technique. Nevertheless, in the voltammetry application for the analysis of the fermented milk, the tibet grain demonstrated larger analytical signals (current – concentration relationship), compared to the kefir grain and the commercial sample of yogurt. Making a comparative analysis of the two techniques, HPLC became more appropriate due its larger selectivity.

Key words: fermented milk, organic acids, cyclic voltammetry, high performance liquid chromatography, analytical determination.

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leite Fermentado

Evidências arqueológicas têm indicado que o processo de fermentação em alimentos foi descoberto acidentalmente milhares de anos atrás. Entretanto, logo se tornou óbvio que muitos alimentos fermentados tinham uma vida de prateleira mais longa e melhor valor nutritivo comparado ao seu equivalente alimento não fermentado, fazendo desta forma de alimento, uma técnica popular. Não é surpresa, portanto, encontrar que muitos alimentos incluindo vegetais, frutas, cereais, carne e peixe têm sido todos convertidos para produtos agradáveis pela fermentação e que são consumidos por todas as partes do mundo.

Certas bactérias, sozinhas ou não, provocam mudanças durante a fermentação, que têm efeito positivo na saúde bem como a resistência a doenças.

Em muitos países do mundo, a fermentação do leite é feita por diferentes métodos, resultando em vários produtos de leite fermentado, sendo o iogurte o mais comum e também o mais consumido. Os produtos variam, consideravelmente, em composição, “flavor” e textura, de acordo com a natureza dos microrganismos fermentadores, do tipo de leite e do processo usado na fabricação¹.

Este produto é definido pelo RIISPOA, como produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtido por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionado, ou não, de outros produtos lácteos, por fermentação láctea mediante a ação proto-simbiótica de *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*, os quais podem ser acompanhados, de forma complementar, de outras bactérias ácidas lácticas que, por sua atividade, contribuem para a determinação das características do produto

final². O iogurte, segundo Caruso e Oliveira³, é um produto comprovadamente, reconhecido como de alta qualidade organoléptica, e é considerado um “produto vivo” uma vez que contém até cinco bilhões de células por grama.

O iogurte é o mais antigo produto láteo fermentado, tendo sido citado na Bíblia, quando, segundo a mesma, Abraão recebeu instruções de um anjo para curar sua esposa Sara, utilizando leite de cabra fermentado⁴. Acredita-se que o iogurte é mais antigo que a Bíblia e, embora não haja nenhum registro disponível com relação à sua origem, esta deve ter ocorrido em regiões montanhosas próximas ao Mediterrâneo, pois os povos nômades, dessas regiões, atravessavam o deserto levando o leite “in natura” acondicionado em bolsas confeccionadas com pele de cabra, e transportadas por camelos. O contato das bolsas com o corpo dos camelos oferecia condições ótimas de temperatura para o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico. Ao consumir o leite, os nômades encontravam um produto de sabor agradável, que não se “deteriorava” com a mesma facilidade que o leite. Essa preparação passou, então, a ser transmitida de pai para filho⁵.

Os primeiros iogurtes comerciais foram produzidos na França e na Espanha, em 1920, e nos Estados Unidos, em 1940. Mas somente a partir da década de 1960 é que houve um aumento no consumo deste produto, devido a melhorias nas técnicas de processamento, reconhecimento da qualidade nutritiva e da função terapêutica. No Brasil, o iogurte foi introduzido nos anos 30, com a imigração européia, a partir de um pequeno grupo de consumidores⁶.

O potencial de crescimento do mercado de iogurte no Brasil é grande. O brasileiro consome cerca de 2kg de produtos refrigerados per capita, incluindo iogurtes, bebidas e sobremesas lácteas⁷. Esse valor é baixo, quando comparado ao de outros países, como Chile, onde o consumo é de 8kg e na Bulgária, o consumo

está em torno de 31kg⁸. Uma das causas do baixo consome de iogurtes pelos brasileiros é o custo elevado do produto, que, segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Iogurtes, não advém do processo produtivo, mas da carga tributária. Outra causa do baixo consumo é o hábito de se realizar compras uma vez por mês, ocasionando a preferência por produtos com prazo de validade prolongado, o que não é o caso do iogurte⁹.

Em 1930, através de pesquisa sobre a microflora intestinal, o médico microbiologista Minoru Shirota descobriu o *Lactobacillus casei shirota*, dando início à história da Yakult. Em 1935, foram industrialmente produzidos os primeiros leites fermentados com os *Lactobacillus shirota* e sua distribuição se deu de porta em porta nas residências. Devido à grande aceitação do produto, foi fundado em 1955 o Centro de Pesquisa em Microbiologia na cidade de Kyoto, no Japão. A ingestão dos leites fermentados Yakult proporcionava a regularização do intestino. A aceitação do produto aumentou no Japão e nos países onde se estenderam por mais de 20 países. Cerca de 25 milhões de frascos de Yakult são consumidos diariamente por esses países. Além do leite fermentado Yakult, estão presentes os suplementos de vitaminas Taffman-E (desde 1982) e Hi-Line (desde 2000). Este último apresenta em sua composição um outro ingrediente funcional chamado oligossacarídeo, derivado da galactose, que atua como prebiótico. Os alimentos funcionais constituem-se hoje como a prioridade e os efeitos benéficos que estes produtos podem contribuir na promoção da saúde e do bem-estar¹⁰.

A palavra iogurte é derivada de “jugurt”, com origem na Turquia, designando produto obtido a partir da fermentação do leite pelos microrganismos *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp thermophilus*¹¹. O iogurte é o principal produto fermentado a partir do leite. Os diversos tipos de leites

fermentados são processados utilizando tecnologias semelhantes e, em muitos casos, as diferenças se limitam ao tipo de microrganismo empregado no cultivo e o conteúdo de sólidos totais do leite. No caso do iogurte, a FAO (2003) tem recomendado que o extrato seco desengordurado no leite original apresente um valor mínimo de 8,2%, para que o iogurte tradicional permaneça com suas características sensoriais semelhantes, independentemente da região onde é produzido¹².

O iogurte pode ser classificado quanto ao seu teor de gordura em: iogurte com creme (mínimo de 6,0%), iogurte integral (mínimo de 3,0%), iogurte parcialmente desnatado (entre 0,5% e 2,9%) e iogurte desnatado (máximo de 0,5%)¹³.

No Brasil, o aperfeiçoamento do parque tecnológico e a abertura do mercado interno possibilitaram uma maior participação dos laticínios no faturamento da indústria de alimentos, de 10% para 18,6%¹⁴. Com isso, houve um aumento da atividade de produção de iogurtes nos últimos anos, a qual saltou de aproximadamente 60 mil toneladas em 1980 para 470 mil toneladas em 1998. O consumo interno deste produto também aumentou, principalmente no período de 1994 a 1997, quando variou de 1,4 para 3,0 Kg/habitante/ano¹⁵. Estes dados apresentados são referentes ao iogurte produzido com leite bovino.

Na tecnologia de produção do iogurte incluem, de modo geral, verificação das características do leite original, padronização dos teores de gordura e, eventualmente, de extrato seco, tratamento térmico, semeadura, incubação e embalagem do produto final. O leite destinado à elaboração do iogurte deve apresentar características peculiares que proporcionem o desenvolvimento microbiano sem causar nenhuma alteração nas suas características físico-química, microbiológica, reológica e sensorial. O elevado teor de sólidos totais no leite é

desejável para proporcionar produto com características peculiares ao produto final. O leite desnatado para elaboração do iogurte deve apresentar características peculiares que proporcionem o desenvolvimento microbiano sem causar nenhuma alteração nas suas características físico-química, microbiológica, reológica e sensorial. O elevado teor de sólidos totais no leite é desejável para proporcionar produto com características peculiares ao produto. O nível recomendado de EST empregado na elaboração de iogurte de leite de vaca encontra-se entre 14 e 18%¹⁶.

Composição do iogurte

A composição do iogurte é similar à do leite, embora se reconheça que há algumas diferenças devido a mudanças ocorridas pela fermentação bacteriana sobre a lactose e pela adição de leite em pó, normalmente feita para aumentar os sólidos do leite, o que permite maior conteúdo protéico, além da presença de aditivos e flavorizantes¹⁷.

1.2. Leite

O leite é uma mistura homogênea de grande número de substâncias (lactose, glicérideo, proteínas, sais, vitaminas, enzimas, etc.), das quais algumas estão em emulsão (a gordura e as substâncias associadas), algumas em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro, sais, etc.). A qualidade do leite como alimento e matéria-prima para a indústria de laticínios dependem de sua composição nutritiva e qualidade microbiológica. Vários aspectos influenciam na composição bromatológica do leite e dois fatores são importantes: a alimentação e a nutrição do

animal, de fácil controle. Mas, além destes outros fatores, exercem um maior ou menor efeito sobre a composição do leite: o fator racial, o estágio de lactação, a temperatura ambiental e as condições de estresse do animal, a perda excessiva de condição corporal, a estação do ano, a contagem de células somáticas, a mastite e saúde geral da vaca, a manifestação do cio, a frequência e a técnica de ordenha, bem como o avanço no sentido de maior volume de produção de lactação.

Os fatores nutricionais são os que podem ser controlados de modo mais direto e em prazo relativamente curto, mas demandam um conhecimento mais aprofundado, já que afetam não somente a fermentação do rúmen como também o metabolismo geral do animal e a secreção de leite no úbere. Dos componentes do leite, o teor de gordura é o que mais pode variar em função da alimentação, de modo geral, diminuindo com o aumento do volume de produção. Alterações no teor de gordura podem informar sobre a fermentação no rúmen, as condições de saúde da vaca e funcionamento do manejo alimentar. O teor de proteína também pode ser afetado, porém em menor grau, enquanto que o teor de lactose é o menos influenciado.

Os principais componentes do leite, a lactose, as proteínas e a gordura, são sintetizados nas células que formam os alvéolos da glândula mamária, a partir de substâncias extraídas do sangue. Parte da gordura do leite é formada a partir dos precursores, ácidos acético e butírico, produzidos no rúmen e a partir dos ácidos graxos com mais de 16 carbonos absorvidos no intestino ou mobilizados das reservas corporais. A proteína do leite tem sua origem nos aminoácidos absorvidos no intestino, provenientes, por sua vez, em maior parte, da proteína microbiana formada no rúmen e da proteína da dieta não degradada no rúmen, disponível no intestino. A lactose é o açúcar do leite que é sintetizado a partir da glicose produzida

no fígado pelo aproveitamento do ácido propiônico absorvido no rúmen e pela transformação de certos aminoácidos. Conforme o esquema apresentado na Figura 1, pode-se verificar que as transformações que ocorrem no rúmen, e que dependem da composição da dieta, são de grande importância na produção e composição do leite. Além disso, o processo de absorção nos intestinos, o metabolismo no fígado e a mobilização das reservas corporais participam do fornecimento de nutrientes e de precursores, através do sangue, para a síntese do leite na glândula mamária.

Figura 1 - Precursores para a síntese do leite no ruminante
(Fonte: Schmidt e Van Vleck, 1974)

A energia necessária para o metabolismo dos animais ruminantes provém basicamente dos ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico) produzidos no rúmen pela fermentação dos diferentes alimentos (Figura 1) e, dependendo da composição da dieta, ocorrerá uma variação entre a proporção dos ácidos graxos acético e butírico, que são metabólitos precursores de parte da gordura do leite, e o ácido propiônico, que é precursor da lactose do leite e o responsável pelo volume do leite. Quanto mais ácido propiônico é absorvido no rúmen, maior é a produção de

leite, pois esse ácido é utilizado pelo organismo do animal para produzir a lactose do leite, e quanto mais lactose, tanto maior a produção de leite.

1.3. Kefir e Grãos de Kefir

Kefir é uma bebida viscosa, ligeiramente carbonatada, que contém poucas quantidades de álcool, e semelhante a iogurte. Essa bebida teve origem nas montanhas do Cáucaso. Ela é fabricada sobre uma variedade de nomes incluindo “kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi e kippi”, com uma produção artesanal divulgada em muitos países como a Argentina, Taiwan, Portugal, Turquia e França. Não é claro se todo kefir se originou de uma única cultura-mãe (grãos de kefir). A análise microbiológica de amostra de kefir, a partir de diferentes localizações, indica população de microflora diferente ¹⁸.

Outro conceito para o kefir: é uma bebida revigorante de leite fermentado que tem sabor exótico ligeiramente alcoólico e azedo. Kefir é derivado de “kef”, que significa sabor agradável em turquistanês¹⁹ (vide Figura 2).

O kefir tem vários conceitos, por isto a FAO/WHO (2001) tem proposto uma definição de kefir baseada na composição microbiológica do grão de kefir (a cultura-mãe usada para produzir kefir) como o produto final do kefir. (vide Tabela 1)

Tabela 1 – Codex Alimentarius do kefir*

Definição	
Cultura-mãe preparada a partir de grãos de kefir, <i>Lactobacillus kefir</i> , e espécies do gênero <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> e <i>Acetobacter</i> crescendo em uma relação simbiótica muito forte. Grãos de kefir constituem ambas as leveduras fermentadoras de lactose (<i>kluyveromyces marxianus</i>) e não fermentadoras de lactose (<i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cereviseae</i> e <i>Saccharomyces exiguus</i>)	
Composição	
Proteína do leite (% w/w)	min. 2,8
Gordura do leite (%m/m)	<10
Acidez titulável, expressada com % de ácido láctico	min 0,6
(%m/m)	
Etanol (% vol.w)	não detectado
Resumo de microrganismos constituintes da cultura mãe	min. 10 ⁷
(cfu/g em total)	
Leveduras (cfu/g)	min.10 ⁴

*Fonte: "Codex Standard for Fermented Milks CODEX STAN 243-2003"²⁰

O *codex alimentarius* é um código de normas básicas sobre alimentos. As principais finalidades deste código são: proteger a saúde dos consumidores, assegurar práticas justas no comércio de alimentos e promover a coordenação de todo trabalho sobre normas alimentares realizado por organizações internacionais governamentais e não-governamentais. O Brasil também é membro do *codex Alimentarius*. Em 1980, foi criado o Comitê do Codex Alimentarius do Brasil (CCAB), através das Resoluções 01/8 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (Conmetro). O CCAB tem como principais finalidades a participação, em representação do País, nos Comitês internacionais do Codex Alimentarius e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas Codex como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos.

Figura 2. - Grãos de kefir

Composição do kefir

A composição do kefir depende em grande parte do tipo de leite que foi usado na fermentação. Entretanto durante a fermentação ocorrem mudanças na composição dos nutrientes e outros ingredientes. O ácido láctico L(+) é o ácido orgânico produzido em maior concentração após a fermentação e é derivado de aproximadamente 25% da lactose original no leite iniciador. Os aminoácidos valina, leucina, lisina e serina são formados durante a fermentação, enquanto que a quantidades de alanina e ácido aspártico aumentam quando comparados ao leite cru. Alguns pesquisadores citam a ocorrência de ácido acético no kefir, enquanto outros citam ausência deste ácido. Outros citam que dependendo da fonte de kefir usada quantidades de piroxidina, vitamina B12, ácido fólico e biotina são sintetizados durante a produção de kefir, enquanto que tiamina e riboflavina foram encontradas em níveis bem reduzidos. Mas estes resultados contrastam com aqueles obtidos por Alm et al. (1982) que em estudos informaram que há pouca quantidade de biotina, vitamina B12 e piroxidina, e grandes quantidades de ácido fólico comparado com leite não fermentado.

Sobre a composição do kefir há muitas controvérsias, mas ao longo dos estudos foi observado que esta composição está intrinsecamente relacionada com a origem do kefir e do tipo de região, inclusive clima que é cultivado.

Ingredientes Bioativos do kefir¹⁸.

Os alimentos funcionais (ver Tabela 2) tem atraído grande negócio de interesse recentemente reconhecido que muitos alimentos contêm ingredientes bioativos que oferece benefícios a saúde ou resistência a doenças. Uma subclasse de alimentos funcionais é um alimento probiótico, do qual tem muitas possíveis fontes de ingredientes bioativos. Os microrganismos deles (mortos e vivos), metabólitos de microrganismos formados durante a fermentação (incluindo antibióticos ou bactericidas), ou quebra de produtos da matriz alimentícia semelhantes a peptídeos pode ser responsável para estes efeitos benéficos. Kefir tem uma longa tradição de oferecer benefícios a saúde, especialmente no norte da Europa. Há muitos compostos no kefir que pode ter propriedades bioativas.

Tabela 2 – Definição de alimentos funcionais e probióticos

Alimentos Funcionais

Um alimento funcional é aquele que pode ser consumido como parte usual da dieta, e deve conter benefícios fisiológicos e/ou reduzir risco de doenças crônicas além da função básica nutricional.

Probióticos

Aquele que contém microrganismos vivos, quando administrado em quantidade adequado e confere grandes benefícios a saúde (FAO/WHO 2002)

Interesses em tais espécies probióticas têm aumentado nos últimos anos tanto quanto é conhecido sobre os microrganismos usado em processos de fermentação, e a possibilidade de adicionar bactéria benéfica ao produto alimentício. Produtos fermentados de leite de uma variedade de animais talvez sejam os mais comuns alimentos fermentados em todo o mundo¹⁸.

Kefir versus iogurte e tipos de iogurte

Os microrganismos utilizados na elaboração de iogurtes compreendem as espécies *Streptococcus salivarius subsp thermophilus* e o *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus*. Estes microrganismos possuem características distintas, sendo que as modificações que transformam o leite em iogurte decorrem da ação simbiótica entre ambos os tipos. Os *Salivarius subsp thermophilus* apresentam-se formando pares (diplococos) ou cadeias mediantemente largas e esféricas, com diâmetro aproximadamente de 0,7 a 0,9 µm. Os cocos possuem temperatura ótima de crescimentos entre 37 e 42°C e atividade máxima aproximada quando o iogurte apresenta 0,8% de ácido láctico. Já o *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus* apresenta-se como bastonetes relativamente largos, com tamanho entre 0,2 a 0,4 µm. Os bacilos possuem uma temperatura ótima de crescimento entre 42 e 45°C e atividade máxima quando o iogurte apresentar entre 1,5 e 2,0% de ácido láctico²¹.

Para a fabricação de iogurte comercial, recomenda-se, geralmente, a temperatura de incubação entre 42-42.5 °C, com acidez final suave e moderada, variando de 0,8 a 0,9 % de ácido láctico. A atividade de acidificação da combinação de cada um deles separadamente²².

No início da incubação, em um pH acima de 5,5, o *S. thermophilus* cresce rapidamente estimulado pela produção de alguns aminoácidos (glicina, histidina e

valina) liberados pelo *Lb. bulgaricus*, mas como a acidez diminui, a multiplicação das células vagorosamente decresce até estacionar em um pH aproximado de 4,2. O *Lb. bulgaricus* cresce mais lentamente no início pela produção de substâncias (ácido fórmico) pelo *S. thermophilus*⁸.

O desenvolvimento das culturas durante a incubação é caracterizado, também, pela formação de acetaldeído, principal substância que confere o aroma típico nos iogurtes. O acetaldeído é produzido pelo *Lb. Bulgaricus*²². Outros compostos presentes, elaborados por culturas mistas, que também participam da formação do aroma e do sabor em iogurtes, são a acetoína, a acetona, a 2-butanona, o diacetil e o etanol²³.

A preparação da cultura-mãe e dos cultivos intermediários deve ser realizada em condições de laboratórios, em uma câmara asséptica, ou então em uma instalação independente das destinadas à elaboração do iogurte.

Os microrganismos empregados na elaboração do iogurte são adquiridos, geralmente, sob a forma liofilizada, uma vez que são de fácil manipulação, possibilitando um controle eficaz nas propriedades através de semeadura direta em um litro de leite previamente aquecido a 90°C por 30 minutos, seguido de incubação a 43 a 45 °C por cerca de três horas, até alcançar o pH de 4,5 a 4,65²¹.

De acordo com a *International Dairy Federation* (1988), países como a França e Espanha estabeleceram que o mínimo de bactérias ácido-láticas viáveis durante o período de vida-de-prateleira é de 10^5 ufc mL⁻¹. Outros países estabeleceram valores de 10^6 ufc mL⁻¹ (Suíça e Itália), 10^7 ufc mL⁻¹ (Japão) e 10^8 ufc mL⁻¹ (Portugal). O Mercosul estabeleceu que o limite mínimo de bactérias ácido-láticas viáveis é da ordem de 10^7 ufc mL⁻¹²⁴.

Entre os microrganismos indesejáveis no iogurte, devem-se destacar as bactérias psicotróficas, as quais provocam alterações nas características organolépticas de derivados lácteos quando se encontram em níveis em torno de 10^6 ufc mL⁻¹ ²⁵.

A composição do iogurte é, de modo geral, similar à composição do leite que lhe deu origem com pequenas variações ²⁶.

Quanto aos parâmetros sensoriais, a principal substância que colabora para o aroma e o sabor típico do iogurte é o acetaldeído, o qual é produzido pelos microrganismos durante a incubação²⁷. Há participação de outros compostos na formação do aroma e do sabor, como acetoína, 2-butanona, diacetil e etanol, que ocorrem em menores quantidades²³. As culturas lácteas também podem produzir quantidades excessivas de acetaldeído, que são responsáveis pelo aparecimento do sabor e aroma de malte ²⁸.

Há três tipos de iogurte, classificados segundo o aroma que apresentam: iogurte natural (é o iogurte com seu típico sabor ácido acentuado); iogurte com frutas (é o produzido por adição de frutas, usualmente frutas naturais, congeladas, purês, polpas, pedaços ou geléias de frutas); iogurte aromatizado (preparado por adição, ao iogurte natural, de açúcar e outros agentes adoçantes, saborizantes e corantes sintéticos)²⁹.

O kefir contém uma quantidade muito grande de bactérias ácidas lácticas (ver Tabela 3) que são grupo fisiologicamente diversos de organismos. Elas podem geralmente ser descritas como gram positivas, cocos não esporuladas ou bastão, sendo o ácido láctico o maior produto da fermentação dos carboidratos. Tradicionalmente a LAB compreende quatro gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,

Pediococcus e *Streptococcus*. Entretanto, novos gêneros têm surgido para inclusão no grupo de LAB devido à recente revisão taxonômica³⁰. A LAB tem sido envolvida na fermentação de muitos alimentos incluindo leite, cereais e vegetais.³¹

O iogurte é conhecido por muitos nomes diferentes em vários países, é um produto fermentado e que é familiar aos consumidores. O kefir é menos conhecido que o iogurte; entretanto, a análise de sua composição indica que pode conter ingredientes bioativos benéficos à saúde. Isto significa que o kefir pode ser um importante produto probiótico³².

Na Tabela 3 é mostrado a diversidade da microflora dos grãos de kefir e kefir de diversos lugares do mundo.

Tabela 3 - Microrganismos identificados em kefir e grãos de kefir

Bactéria Ácida Láctica	Leveduras	Outros
<i>Lb. Kefiran</i> , <i>Lb. Kefieranofaciens</i> , <i>Lb. Kefir</i> , <i>Lb. parakefir</i>	N.D.	N.D.
<i>Lb. Brevis</i> , <i>Lb. viridescens</i> , <i>Lb. kefir</i> . <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. Rhamnosus</i> , <i>Lb. casei subsp tolerans</i> , <i>Lb. casei subsp. pseudoplatantarum</i> , <i>Lb. Acidophilus</i> ; <i>Lb. Gasseri</i> . <i>Lb lactis subsp lactis</i> ,; <i>s. salivarius subsp thermophilus</i> ,; <i>Leuconostoc subsp</i>	<i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. uniporus</i> , <i>Candida kefir</i> , <i>C. homii</i> , / <i>c.friedrichi</i> , <i>kluveromyces lactis</i> , <i>Pichia fermentans</i>	<i>Pediococcus subsp</i> , <i>Micrococcus subsp</i> , <i>Bacillus subsp</i> <i>acetobacter subsp</i> , <i>Escherichia coli</i>
N.D.	<i>Kleyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i> , <i>Sccahromyces cerevisiae</i> , <i>S. dairensis</i>	N.D.
<i>Lb. Helveticus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Kleyveromyces marxianus</i> , <i>Pichia fermentans</i>	N.D.
N.D.	<i>Cândida kefir</i> , <i>Kleyveromyces marxianus</i> , <i>Cândida colliculosa</i> , <i>Torulaspora delbrueckii</i> , <i>Saccharomyces unispora</i> , <i>Brettanomyces anomalus</i> , <i>Saccharomyces turicensis</i>	N.D.
<i>Lb. Kefir</i> ; <i>L. lactis subs. lactis</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>	N.D.

Fonte: FARNWORTH, E.R. Kefir: from folklore to regulatory approval. Journal. Nutraceutical, Functional and Medical Foods. v. 1, p. 57-68, 1999

1.3.1 Microbiologia do kefir: Bactérias e Leveduras

As Bactérias

A população encontrada nos grãos de kefir tem sido usada como um exemplo de comunidade simbiótica³³ e esta natureza simbiótica tem dificultado a identificação e o estudo dos microrganismos constituintes dentro dos grãos. As bactérias do kefir e leveduras quando separadas como cultura pura, ou não crescem

em leite ou têm uma diminuição da atividade bioquímica, que complica os estudos da população de grãos de kefir³⁴. Muitos meios têm sido propostos para isolá-lo e identificar bactérias em grãos de kefir³⁵. O *Lactobacillus kefir* cresceu melhor quando as leveduras *Candida kefir* foram adicionada ao leite³⁶. Observação similar foi obtida quando tentou-se crescer *Lactobacillus kefir* em leite³⁷. Em geral, bactérias ácidas lácticas são mais numerosas (10^8 - 10^9) que leveduras (10^5 - 10^6) em grãos de kefir e bactérias ácidas acéticas (10^5 - 10^6), ainda que condições de fermentação possam afetar seu padrão³⁸. A Tabela 4 mostra uma lista de várias bactérias que têm sido informado em kefir e grãos de kefir por volta do mundo.

Tabela 4 – Bactéria encontrada em grãos de kefir e kefir

Lactobacilli	
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus kefiranoofaciens</i> ,	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus kefirgranum</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactobacillus hilgardi</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ³⁹ .	<i>Lactobacillus viridescens</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>	
Lactococci	
<i>Lactococcus lactis subsp lactis</i>	
<i>Lactococcus lactis subsp cremoris</i>	
Streptococci	
<i>Streptococcus lactis</i>	
Enterococci	
<i>Enterococcus durans</i>	
Leuconostocs	
<i>Leuconostoc sp.</i>	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
Acetic acid bacteria	
<i>Acetobacter sp.</i>	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Acetobacter aceti</i>	
Outras bactérias	
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Micrococcus sp.</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>

As Leveduras

É conhecido que leveduras mostram uma importante função na preparação de produtos fermentados de leite, onde elas podem fornecer nutrientes essenciais de crescimento, tais como aminoácidos e vitaminas, elas alteram o pH, secretam etanol e produz CO₂ ⁴⁰. As leveduras em kefir têm sido menos estudadas que as

bactérias do kefir, entretanto é óbvio que as leveduras de kefir fornecem um ambiente para o crescimento de bactérias de kefir, produzindo metabólitos que contribuam para o aroma e sabor do kefir⁴¹. Uma Tabela 5 lista várias leveduras que têm sido informada em grãos de kefir. Para prevenir excesso de produção de CO₂ (particularmente após a fermentação)⁴², sugeriram que os dois estágios de fermentação comesçassem com levedura que não fermenta a lactose, como a *Saccharomyces cerevisiae*. As propriedades de leveduras encontradas em kefir variam. Por exemplo, algumas leveduras encontradas em kefir fermentam a lactose enquanto outras não. Também são encontradas algumas leveduras na superfície do grão enquanto outras habitam seu interior. Pode ser que leveduras localizadas em diferentes pontos nos grãos de kefir mostram diferentes funções no processo de fermentação⁴³. O padrão eletroforético da levedura *Torulipsis holmii* isolado de grão de kefir da Dinamarca demonstrou padrão indicando a presença de dez diferentes enzimas⁴⁴. Fazendo uma comparação entre a microflora do grão de kefir e do kefir entre bactéria e leveduras, observou-se que, tanto quanto as bactérias de kefir, o perfil de leveduras é diferente em grãos de kefir quando comparado ao produto final de kefir⁴⁵.

Tabela 5 – Leveduras encontradas nos grãos de kefir e kefir

<i>Kluyveromyces marxianus</i> (também informado como <i>Saccharomyces laceis</i> e <i>Kluyveromyces</i> <i>laceis</i>)	<i>Candida friedrichii</i>
<i>Saccharomyces sp.</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces cereviseae</i> (informado também como <i>Saccharomyces carlbergensis</i>)	<i>Candida tenuis</i>
<i>Saccharomyces unisporius</i>	<i>Candida inconspícua</i>
<i>Saccharomyces exigius</i> (informado como <i>Torolopis holmmii</i>)	<i>Candida marius</i>
<i>Saccharomyces turicensis</i>	<i>Candida Lambica</i>
<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Saccharomyces dairensis</i>	<i>Candida valida</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Brettanomyces anomalus</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Issatchenkia occidentalis</i>	<i>Pichia fermentans</i>

1.3.2. Distribuição da microflora dos grãos de kefir usando Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV/SEM).

A microscopia de varredura eletrônica é importante no estudo de superfícies complexas como a do grão de kefir. Somente com auxílio de um microscópio é possível ver características importantes nestes sistemas biológicos, por serem demasiadamente pequenas para serem vistas a olho nu. Pois o olho humano só consegue formar imagens de objetos com dimensões superiores a cerca de 0,2 mm. Para observar objetos de tamanho inferior, é necessário formar deles uma imagem ampliada. Os microscópios são os aparelhos utilizados para formar uma imagem ampliada, nestes casos.

No microscópio de varredura eletrônica, o feixe irradia apenas um ponto da amostra. O feixe percorre sistematicamente toda a amostra por um processo de

varredura e a interação do feixe com a amostra gera sinais que podem ser medidos por detectores apropriados. A imagem forma-se ponto a ponto em tubos de raios catódicos, o feixe de elétrons se move de um modo sincronizado com o movimento do feixe de radiação do microscópio, de modo que cada ponto do objeto corresponde a um ponto da imagem. A intensidade e/ou cor do ponto de imagem são moduladas pelo sinal recolhido pelo detector. A resolução deste tipo de aparelho depende principalmente do tamanho da área do objeto irradiada pelo feixe.

Quando é de interesse estudar a superfície de amostras inteiras, os métodos de preparação têm por objetivo preservar as superfícies, de modo tão fiel quanto possível. No caso do interesse de se estudar o interior das amostras, estas podem ser cortadas ou fraturadas de forma a expor o interior. Como as amostras são observadas no vácuo do microscópio, elas têm de ser fixadas e secas. A secagem é habitualmente o passo mais delicado, uma vez que no seu decurso os fenômenos de tensão superficial exercem forças capazes de destruir a maior parte da estrutura biológica observável. Para evitar estes efeitos, recorre-se à secagem por métodos de ponto crítico ou a partir de líquidos de tensão superficial baixa. Os microscópios de varredura “ambientais” no qual a câmara que contém a amostra pode ser mantida a uma pressão elevada, próxima da pressão atmosférica, e permite a observação de amostras secas, não desidratadas. Diminui, assim, a complexidade no tratamento da amostra.

A microscopia de varredura eletrônica do kefir já foi realizada por diversos pesquisadores. As apresentadas aqui foram realizadas por dois pesquisadores de diferentes países e foi observada uma grande diversidade na microflora dos grãos de kefir, inclusive para aqueles do mesmo país, diferenciando somente a região.

A importância desta demonstração é que a composição microbiológica do kefir em sua diversidade está relacionada à produção de ácidos orgânicos durante a fermentação.

Quando vista a olho nu, estes estudos mostram que a parte externa do grão de kefir mostrou-se lisa e brilhante. Entretanto, com auxílio de SEM, a superfície dos grãos revelou-se rugosa. Com auxílio de SEM, em uma magnificação de 35x, foi possível ver que o lado externo do grão é rugoso e irregular (Figura 3A). Em amostras fatiadas, a superfície do submeio também parece ser rugosa, enquanto que porções internas tinham buraco na superfície semelhante a uma coleção de pequenas crateras. Segundo Guzel et al. a aparente superfície cheia de irregularidade pode ser o resultado do procedimento usado na preparação dos grãos de kefir para microscopia eletrônica. Lactobacilli, leveduras e material fibrilar foram observados em 5000x e 10000x na parte externa do grão (Figura 3B e 3C). O material fibrilar foi devido ao polissacarídeo kefirano, como informado em estudo anterior. Três tipos de diferentes lactobacilos (curto, longo e curvado) foram observados e envolvidos nos grãos com leveduras.

Na porção do submeio do grão (Figuras 3D e 3E), uma variedade de lactobacilos, leveduras e material fibrilar foram observados usando alta magnificação. Relativamente poucas leveduras foram observadas no submeio, comparado a outras porções dos grãos de kefir. Os grãos de kefir tinham uma estrutura fibrilar esponjosa, que foi ramificada e interconectada. O material fibrilar aumenta progressivamente para o lado interno do grão. A porção interna do grão está apresentada na Figura 3F e 3G.

(A) Parte interna da superfície do kefir 35x

(D) Submeio de grãos de kefir em 7000x

(B) Parte externa de grãos de kefir 5000x

(E) Submeio de grãos de kefir em 9000x

(C) Parte externa de grãos de kefir em 10000x

(F) Parte interna de grãos de kefir 5000x

(G) Parte interna de grãos de kefir em 1500x

Figura 3. Microscopia de varredura eletrônica (MEV) de grãos de kefir

(Fonte: Int. J. Dairy Techn. v.58, p 25-29, 2005).

Na parte mais interna da porção dos grãos, havia uma variedade de lactobacilos (curto, longo e curvados) envolvidos no material fibrilar, mas leveduras não foram evidentes nesta parte do kefir. Isto é devido, talvez, às leveduras serem aeróbicas e mais provável colonizarem na superfície do grão. A observação indica que leveduras tornam-se menos predominante no interior do grão.

Outros pesquisadores têm observado que leveduras predominam na parte central do grão, enquanto a parte exterior do grão tinha principalmente lactobacilos e poucas leveduras ^{46, 47}. Eles informaram uma variedade de lactobacilos (curtos, longos e curvados) em todas as partes da amostra. Entretanto, Guzel-Seydim et al.⁴⁸ observaram lactobacilos longos e curvados, principalmente na parte interna dos grãos (Figuras 3F e 3G), e curtos na parte externa dos grãos (ver Figuras 3). Rea et al.⁴⁹ observaram lactobacilos longos e curvados na parte interna dos grãos da Irlanda. Rea et al. foram capazes de detectar lactococos em somente uma amostra usando SEM e observaram que lactococos residem na superfície. Nos estudos da SEM, deste kefir de origem turquistanesa, mostrados na Figuras 3, não foram observados lactococos em nenhuma das partes deste kefir.

1.3.3. Fabricação de kefir

Kefir é tradicionalmente fabricado de leite bovino, e também é feito de leite de ovelhas, cabras e búfalas. Entretanto, há informações recentes sobre a produção de kefir a partir de leite de soja⁵⁰. Tradicionalmente kefir é produzido pela adição de grãos de kefir a uma quantidade de leite. O tamanho do grão inicial inoculado afeta o pH, viscosidade e perfil microbiológico do produto final⁵¹.

O produto é feito pela inoculação de grãos de kefir no leite. Grãos de kefir são pequenos, de forma irregular e de cor branco-amarelado, os quais parecem miniaturas de couve-flor. Kefir é uma bebida carbonatada que deve seu distinto sabor a uma mistura de ácido láctico, etanol, dióxido de carbono e outros produtos semelhantes, como acetaldeídos e acetonas. Este sabor único é o resultado de uma atividade metabólica simbiótica de um número de bactérias e espécies de leveduras⁵². De acordo com Koroleva⁵³, “leveduras” exercem um efeito favorável na atividade de bactéria ácida láctica fornecendo a elas estimulante crescimento tão bem quanto pelo metabólito de ácido láctico.

O grão de kefir é uma associação simbiótica de microrganismos pertencente a diversas espécies, incluindo no geral bactéria ácida láctica, leveduras e alguma bactéria ácida acética^{49, 54, 55}. A microflora do kefir é mantida junto da matriz, composta em grande quantidade de material fibrilar em igual quantidade de polissacarídeos. Este polissacarídeo é conhecido como kefirano, produzido no centro do grão e sintetizado por *Lb. Kefiranofaciens*, uma bactéria. Esta bactéria é encapsulada no interior do centro do grão, onde condições anaeróbicas são favoráveis para a síntese de kefirano na presença de etanol⁵⁶.

As bactérias mais freqüentemente isoladas a partir da microflora do kefir são homofermentativas e heterofermentativas. Ambos os caminhos homofermentativo e heterofermentativos são empregados por estas bactérias, conduzindo a um produto acidificado⁵⁷. Estas são os *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e algumas *Acetobacter*. Muitos pesquisadores têm estudado a composição da microflora presente em grãos de kefir⁵⁸

1.3.4. Polissacarídeo do kefir - Kefirano

O exopolissacarídeo de estruturas e composição diferentes são produzidos por uma variedade de bactérias ácidas lácticas incluindo *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*^{59, 60}. Estes carboidratos presentes em superfície celular conferem propriedades de proteção e adaptação em sua produção bacteriana. Eles são fracamente ligados à membrana celular, portanto, são facilmente desligados do seu meio ambiente⁶¹. Em produtos alimentícios, exopolissacarídeos freqüentemente contribuem para a estabilidade e as características organolépticas. O único polissacarídeo chamado kefirano tem sido encontrado em grãos de kefir (Figura 4). Os grãos podem conter também outros exopolissacarídeos¹⁸.

Figura 4 – Estrutura química proposta do kefirano.

(Fonte: Carbohydrate Research 7, Kooiman, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain, pp.200-211).

O polissacarídeo kefirano contém D-glicose e D-galactose somente em uma razão 1:1. Reações de hidrólise seguida por análise de RMN foram usadas para determinar a estrutura química de polissacarídeo kefirano (ver Figura 4).

A estrutura proposta é uma ramificação hexa ou heptassacarídica repetindo unidade, que é composta de uma unidade pentassacarídica regular com um ou dois açúcares residuais, os quais estão aleatoriamente ligados. Estudos subseqüentes de

metilação/hidrólises têm mostrado que a estrutura de kefirano pode ser mais complexa que as primeiras idéias^{62, 63}. Metilação e análises de RMN têm sido usadas para verificar a produção de kefirano por novas bactérias⁶⁴. Uma análise mais completa de dados químicos publicados por Mukai et al. (1990) criou uma questão, com certeza, de que dois exopolissacarídeo são produzidos e têm estrutura química e propriedades semelhantes⁶². La Riviere et al. (1967)⁶⁵ informam que o kefirano tem razão glicose e galactose 1:1 e uma rotação ótica +68°, enquanto que Mukai (1990) isolou um kefirano com razão glicose:galactose 0,9:1,1. e uma rotação óptica de +54°. Exemplos podem ser encontrados na literatura onde as mesmas bactérias produzem polissacarídeos diferentes em meios diferentes⁶⁶. Além disso, Santos et al. 2003 recentemente isolaram um exopolissacarídeo aparentado ao kefirano.

Kefirano se dissolve lentamente em água fria e rapidamente em água quente e forma uma solução viscosa de concentração 2%⁶⁵. Carboximetil kefirano tem uma viscosidade que é 14 vezes maior que o kefirano, embora este seja ainda mais lento que outros agentes espessantes usados em alimento industrial, e então limita o uso de carboximetila kefirano.

Desde a primeira separação, foi informado que kefirano pode ser produzido por uma variedade de bactéria isolada de grãos de kefir, a qual tem sido obtida por muitos pesquisadores⁶⁵. Se de fato as bactérias informadas são as mesmas, não existem dados sobre esta afirmação e nem identificação definitiva publicada para caracterizar completamente aquelas bactérias informadas como produtoras de kefirano.

As bactérias que produzem exopolissacarídeo são freqüentemente encontradas em leite ou produtos de leite, embora estudos tenham mostrado que a

produção máxima de exopolissacarídeo ocorra em meio quimicamente definido (contendo carboidrato, sais minerais, aminoácidos/peptídeos, vitaminas e ácidos nucleicos) em pH constante⁶⁷. Esta propriedade potencial e saudável do kefirano tem estimulado o desenvolvimento de meios e condições de crescimento que aperfeiçoem a produção de kefirano⁶⁸. O kefirano é melhor produzido quando o meio está ácido ou na presença de ácido láctico. Nenhuma medida tem sido informada como recomendação para a concentração de kefirano no produto final de kefir. Entretanto, uma comparação da quantidade de carboidrato do leite (USDA 2004) e a mostrada pelo kefir é o dobro da quantidade de carboidrato. Ainda não é conhecida a quantidade deste kefirano. Abraham e De Antoni (1999)⁶⁹ mostraram que a quantidade de polissacarídeo de kefir produzido de leite bovino foi quase duas vezes maior que aquele produzido pelo leite de soja. Grãos de kefir crescem em leite de soja produzindo um exopolissacarídeo, que Liu et al., 2002⁷⁰ têm mostrado ser primeiramente composto de D-Glucose e D-Galactose (razão 1.00:0.43) com peso molecular de aproximadamente $1,7 \times 10^6$ Da.

Frengova et al., (2002)⁷¹ informam que o kefirano é o único polissacarídeo que é produzido por bactéria ácida láctica isolada de grãos de kefir.

Dentre quarenta espécies isoladas de grãos de kefir, a *L. Bulgaricus HP1* foi selecionada como a maior produtora de espécie kefirano, como pode ser mostrado na Tabela 6. Os exopolissacarídeo que as bactérias ácidas lácticas produzem contribuem para propriedades reológicas (propriedades relacionadas ao estudo da deformação da matéria) e textura dos produtos de leite fermentado^{72, 73}.

Tabela 6 – Produção de exopolissacarídeo por bactérias ácidas lácticas de grãos de kefir.

Bactérias ácidas lácticas	Exopolissacarídeos / mg L ⁻¹
<i>L. bulgaricus</i> HP1	460,27±7,02
<i>L. bulgaricus</i> HP2	147,23±6,85
<i>L. bulgaricus</i> HP3	46,93±4,94
<i>L. bulgaricus</i> HP4	195,37±3,97
<i>L. bulgaricus</i> HP5	51,60±4,84
<i>L. bulgaricus</i> HP6	298,83±8,79
<i>L. bulgaricus</i> HP7	370,30±9,14
<i>L. bulgaricus</i> HP8	66,63±4,89
<i>L. bulgaricus</i> HP9	112,23±6,45
<i>L. bulgaricus</i> HP10	38,17±2,97
<i>L. Helveticus</i> MP10	15,37±3,85
<i>L. Helveticus</i> MP11	19,23±3,34
<i>L. Helveticus</i> MP12	-
<i>L. Helveticus</i> MP13	10,40±1,55
<i>L. Helveticus</i> MP14	22,63±2,67
<i>L. Helveticus</i> MP15	16,90±2,39
<i>L. Helveticus</i> MP16	-
<i>L. Helveticus</i> MP17	20,67±4,07
<i>L. Helveticus</i> MP18	-
<i>L. Helveticus</i> MP19	-
<i>L. Brevis</i> B1	-
<i>L. Brevis</i> B2	-
<i>L. Brevis</i> B3	-
<i>L. Brevis</i> B4	-
<i>L. Brevis</i> B5	-
<i>S. thermophilus</i> T10	31,40±4,71
<i>S. thermophilus</i> T11	15,77±4,71
<i>S. thermophilus</i> T12	-
<i>S. thermophilus</i> T13	27,80±3,38
<i>S. thermophilus</i> T14	-
<i>S. thermophilus</i> T15	-
<i>S. thermophilus</i> T16	19,13±2,12
<i>S. thermophilus</i> T17	-
<i>S. thermophilus</i> T18	-
<i>S. thermophilus</i> T19	23,83±3,26
<i>L. lactis</i> C11	-
<i>L. lactis</i> C12	-
<i>L. lactis</i> C13	-
<i>L. lactis</i> C14	-
<i>L. lactis</i> C15	-

Fonte: FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BRESHKOVA, D.M.; SIMOV, Z.I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. Z. Naturforsch. v. 57, p. 805-810, 2002.

1.4. Grãos de Tibet

Os grãos de Tibet(GT) são gelatinosos e irregulares formados por uma associação simbiótica de leveduras e bactéria ácida láctica, que causa uma fermentação ácida alcoólica no açúcar mascavo e leite. Esta associação é algumas vezes equivocada com fungos originados do Tibet, tais como a *Camelia assamica* e *Cordyces sinensis*. Além disso, GT é também identificado como uma associação simbiótica de natureza semelhante ao kombuchá e kefir, ambos com origem em país asiático. O GT pode ser diferenciado da amostra de kefir e kombuchá a partir de seus produtos, quantidade microbiológica e estrutura morfológica. Além disso, GT é uma associação capaz de produzir membrana ao redor da cultura de grãos. A microflora do GT está envolvida em uma matriz polissacarídica gelatinosa semelhante à matriz apresentada no kefir. Kefir pode ser considerado como uma fonte probiótica devido a ele apresentar uma variedade de características saudável ao lado de sua condição nutricional. Há muitos estudos de investigação imunológicas, antineoplásicas, barreira patogênica e efeito pró-digestivo. Entretanto, kefir e GT são muito similares em quantidade microbiológica, procedimento de cultivo, muito similar em estrutura e produtos de fermentação, mas diferem no aspecto visual (ver Figura 5). Entretanto, somente o kefir é citado por trazer à saúde benefícios de natureza probiótica.

Os grãos do Tibet, quando cultivados em soluções de açúcar mascavo e/ou leite, produzem uma bebida fermentada composta por uma dúzia de bactéria e leveduras que vivem junto a uma matriz polissacarídica secretadas por eles. O produto fermentado destes grãos no leite é similar ao kefir, bebida probiótica originada nas montanhas do Cáucaso.

Os grãos de Tibet apresentaram comportamento similar aos grãos de kefir no que se refere aos produtos formados pela fermentação. Porém poucos trabalhos têm sido divulgados sobre os grãos de Tibet. E quanto a produtos de fermentação não há relatos na literatura.

Figura 5.- Grão do Tibet

1.5. Ácidos orgânicos em derivados de leite

A fermentação por bactérias ácidas lácticas (LAB) é caracterizada pela acumulação de ácidos orgânicos e acompanhada de redução de pH. O nível e tipos de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação dependem das espécies de organismo, da composição da cultura e condições de crescimento⁷⁴. O efeito antimicrobiológico dos ácidos orgânicos reside na redução do pH bem como na forma não dissociada das moléculas^{75, 76}. Tem sido proposto que pH baixo causa acidificação do citoplasma celular, enquanto que o ácido não dissociado, sendo lipofílico, pode difundir passivamente através da membrana⁷⁷. Os ácidos não dissociados agem pelo colapso de gradiente protônico eletroquímico ou por alteração da permeabilidade da membrana celular que resulta na ruptura dos sistemas de

transporte de substrato ^{78,79}. Esta é a forma de ação dos ácidos orgânicos na destruição de bactérias patogênicas.

O ácido láctico é o maior metabólito da fermentação da LAB em que o equilíbrio de suas formas não dissociadas e dissociadas e a extensão da dissociação depende do pH. Em pH baixo, uma grande quantidade de ácido láctico permanece na forma não dissociada e é tóxico para muitas bactérias, grãos e leveduras. Entretanto, diferentes microrganismos variam consideravelmente em sua sensibilidade para ácido láctico. Em pH 5,0, ácido láctico inibe bactérias na forma de esporo, mas é ineficiente contra leveduras⁸⁰. Além disso, os estereoisômeros de ácido láctico também diferem em sua atividade antimicrobiológica. O ácido L-láctico tem maior efeito inibitório que ácido D-láctico⁸¹.

Os ácidos acético e propiônico produzidos por espécies de LAB, através de caminhos heterofermentativo, podem interagir com membrana celular e causar acidificação intracelular e denaturação da proteína⁸². Eles têm efeito mais antimicrobiológico que o ácido láctico devido a seu mais alto valor de pka (ácido láctico 3,08, ácido acético 4,75 e ácido propiônico 4,87) e ácido com mais alto percentual de dissociação que o ácido láctico em dado pH⁷⁹. O ácido acético é mais inibitório que o ácido cítrico para determinada espécie. O ácido acético age sinergicamente com ácido láctico diminuindo o pH do meio, portanto aumenta também a toxicidade do ácido acético^{83, 84}.

logurte é um leite fermentado produzido pela adição de *Labctobacillus delbruecki subsp bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* ao leite. *Labctobacillus delbruecki subsp bulgaricus* libera aminoácidos e peptídeos da proteína do leite, estimulando o crescimento de *Streptococcus thermophilus*. O crescimento de *Lactobacillus delbruecki subsp bulgaricus* é estimulado pelo ácido fórmico ou CO₂

liberado durante o crescimento de *Streptococcus thermophilus*. Todo este processo ocorre em uma relação simbiótica⁸⁵.

Os ácidos orgânicos aparecem em produtos de leite como resultado da hidrólise da gordura do leite durante a lipólise (ácidos acético e butírico), do metabolismo bovino bioquímico normal (cítrico, orótico e úrico) ou do crescimento bacteriano (lático, acético, pirúvico, propiônico e fórmico). Estes ácidos são os maiores produtos do catabolismo de carboidratos da bactéria ácida láctica (LAB) e favorecem o desenvolvimento de microrganismos que interferem na qualidade higiênica do leite. Entretanto, a habilidade da LAB para inibir bactérias indesejáveis depende não somente da redução do pH, mas também dos tipos de ácidos produzidos por elas⁸⁶.

A determinação quantitativa de ácidos orgânicos é importante para monitorar a atividade e o crescimento bacteriano e também por razões nutricionais que contribuem para o sabor e aroma dos produtos derivados do leite⁸⁷.

1.5.1. Outros compostos no leite fermentado

O peróxido de hidrogênio é produzido por bactéria ácida láctica na presença de oxigênio como um resultado da ação de oxidase flavonoproteína ou peroxidase dinucleotídeo hidróxi nicotinamida adenina (NADH). O efeito antimicrobiológico de H₂O₂ pode resultar da oxidação de grupos sulfidrilas causando denaturação de um número de enzimas e da peroxidação da membrana lipídica. Deste modo, aumenta a permeabilidade da membrana⁸⁸. O H₂O₂ pode também ser como um precursor para a produção de radical livre bactericida semelhante como superóxido (O₂⁻) e radical hidróxi (OH⁻), o qual pode causar dano no DNA⁸⁹. A produção de H₂O₂ por espécies *Lactobacillus* e *Lactococcus* inibe *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas sp.* e vários microrganismos psicotrópicos em alimentos^{90, 91}.

O dióxido de carbono é principalmente produzido por LAB heterofermentativo. O mecanismo preciso de sua ação antimicrobiana é ainda desconhecido. Entretanto, CO₂ pode mostrar função em criar um ambiente anaeróbico que inibe descarboxilação enzimática, e a acumulação de CO₂ na bicamada lipídica que pode causar uma disfunção na permeabilidade⁹².

O CO₂ pode efetivamente inibir o crescimento de muitos microrganismos que estragam os alimentos, especialmente de bactérias gram negativa psicotrópicas^{93, 94}. O grau de inibição por CO₂ varia consideravelmente entre os microrganismos⁹⁵.

O diacetil e acetaldeído são compostos que dão aroma característicos aos leites fermentados. O diacetil é produzido por espécies dentro de todos os gêneros da LAB pela fermentação do citrato. O efeito antimicrobiológico de diacetil tem sido conhecido desde 1930⁹⁶. Ele inibe o crescimento de bactéria gram negativa pela reação com a proteína e arginina, então afetando a utilização da arginina⁹⁷.

Jay (1982)⁹⁶ mostrou que bactéria gram-negativa foi mais sensível a diacetil que bactéria gram positiva; a anterior foi inibida por diacetil em 200 µg mL⁻¹ e a posterior em 300 µg mL⁻¹. Diacetil em 344 µg mL⁻¹ inibe espécies de *Listeria*, *Solmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* e *Aeromonas*. Mesmo a produção de diacetil durante a fermentação láctica é baixa, por exemplo, 4 µg mL⁻¹ produzido por *Lc. Lactis subsp diacetylactis*, e o nível de aceitabilidade sensorial de diacetil está entre 2-7µg mL⁻¹ ⁷⁹. Seu uso prático como preservativo em alimentos é limitado. Entretanto, diacetil pode agir sinergeticamente com outros fatores antimicrobiológicos⁹⁶ e contribuir para combinar sistema de preservação em alimentos fermentados.

O acetaldeído é produzido por *Lb.delbruckii subsp bulgaricus* pela ação de uma aldolase teonina, cuja teonina é dividida em acetaldeído e glicina. Uma vez que

Lb.delbruckii subsp bulgaricus e *S. thermophilus* em iogurte não pode metabolizar o acetaldeído, ele é acumulado no produto em uma concentração de 25 ppm. Acetaldeído inibe o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurime* e *E. Coli* em produtos do leite⁹⁸.

1.5.2. Ácidos orgânicos produzidos por espécies de bactérias (fermentadoras do leite), leveduras, aceto bactérias e existentes no leite.

Os principais ácidos orgânicos metabolicamente importantes produzidos pelas bactérias ácidas lácticas com seus respectivos pesos moleculares, fórmulas e pkas, estão relacionados na Tabela 7, além de outros compostos produzidos por estas bactérias.

Tabela 7 - Lista de compostos estudados e/ou existentes no leite fermentado com PM (peso molecular), fórmulas estruturais e pKa dos ácidos.

Ácidos	PM/ g.mol ⁻¹	Fórmulas estruturais	pka
Fórmico	46,03	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H} - \text{C} \\ \backslash \\ \text{O} \end{array}$	3,74
Acético	60,05	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} \\ \backslash \\ \text{O} \end{array}$	4,76
Propiônico	74,08	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{C} \\ \backslash \\ \text{OH} \end{array}$	4,87

Butírico	88,11	$\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array}$	4,82
Lático	90,00	$\begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{OH} \end{array} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	3,08
Pirúvico	110,00	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{H}_3\text{C} - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \end{array} \end{array}$	2,49
Succínico	120,07	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\ \qquad \qquad \\ \text{HO} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \end{array} \end{array}$	4,20 (1) 5,63 (2)
Oxálico	126,07	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \qquad \text{O} \\ \qquad \qquad \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \end{array} \end{array}$	1,25 (1) 4,26 (2)
Orótico	156,10	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HO} - \text{C} - \text{C}_5\text{H}_3\text{N}_2 \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O} \end{array} \cdot \text{H}_2\text{O} \end{array}$	2,40

Úrico	168,11		5,40 (1) 5,53 (2)
-------	--------	--	----------------------

Hipúrico	179,20		
----------	--------	--	--

Cítrico	210,14		
---------	--------	--	--

3,13 (1)
4,76 (2)
6,40 (3)

Outros compostos	PM g/mol	Fórmulas
Acetaldeído	44,05	
Etanol	46,07	
Diacetil	86,09	
Acetoína	88,10	

Neste trabalho, foram aplicadas duas técnicas analíticas para o estudo dos produtos formados na fermentação do leite. Um: estudo voltamétrica, utilizando a voltametria cíclica e voltametria de varredura linear para investigar o comportamento eletroquímico dos ácidos presentes no leite e aqueles formados durante a fermentação do leite pelos grãos kefir e do Tibet, utilizando ultramicroeletrodo de platina, cobre e ouro. E outro: a cromatografia líquida em método isocrático para quantificar e separar os ácidos orgânicos obtidos nos leites fermentados.

A voltametria cíclica (VC) mostra ser um método vantajoso para estas análises devido ao baixo custo e execução fácil e rápida. Enquanto que a HPLC apresenta como vantagens alta sensibilidade na determinação de substâncias e seletividade na separação dos constituintes das amostras. Esta técnica tem sido usada com muito sucesso para determinar simultaneamente uma variedade de ácidos orgânicos em diversas amostras⁷. A determinação destes compostos em produtos do leite inclui duas fases: extração da matriz e determinação por HPLC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- DEETH, H. C.; TAMIME, A. Y. Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. J. food. Prot.. v. 44, p. 78-96, 1981.
- 2- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria no 15 de 23 de agosto de 1988. Produtos Saneantes Domissanitários. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 30 ago. 1988.
- 3- CARUSO, J.B.; OLIVEIRA, A.J. Leite: obtenção, controle de qualidade e processamento. São Paulo: Secretaria da Indústria e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1984. 162p.
- 4- MARTIN, A.F. Armazenamento do iogurte comercial e o efeito na proporção das bactérias lácticas. 2002. 49f. Tese (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"-Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- 5- SILVA, J.C. Iogurte. 1985. 23f. Monografia (Bacharelado) - Esalq, Depto. Tecnologia Rural, Piracicaba, 1985.
- 6- TAMIME, A.Y., ROBINSON, R.K. Yogurt: science and technology. Oxford: Pergamon Press 1985. 431p.
- 7- CONSUMO de iogurte. Leite B. v.11, p.6, 1997.
- 8- BRANDÃO, S.C.C. Tecnologia da produção industrial de iogurte. Leite e Derivados. v. 4, p. 24-38, 1995.
- 9- PENNA, A.L.B.; OLIVEIRA, M.N.; BARUFFALDI, R. Avaliação da qualidade de iogurte. Leite e Derivados .v. 1, p.13-18, 1994.
- 10- O INGREDIENTE do lácteo saudável. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissões/tecno.htm>>. Acesso em 16 mar.2004.
- 11- TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yogurt: Technology and biochemistry. J. Food. Prot. v. 43, p. 939-977, 1980.
- 12- CUNHA, O. C. N. Avaliação do iogurte natural produzido com leite de búfala contendo diferentes níveis de gordura. 2003. 57 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de

Zootecnia e Engenharia de alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.

13- BRASIL. Ministério da Agricultura, Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria no 146/96. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da União, Brasília, 07 mar. 1996.

14- FONSECA, M. G.D, MORAIS, E.M. Indústria de leite e derivados no Brasil: uma década de transformação. Informação Econômica. v. 29, p.7-29, 1999.

15- ANUÁRIO MILKBIZZ. Anuário Milkbizz1999/2000. São Paulo: Ed. Milkbizz, 1999.

16- TAMIME, A.Y.; DEETH, H.C. Yogurt: Technology and biochemistry. J. Food Prot.v. 43, p. 939-977, 1980.

17- DEETH, H. C; TAMIME, A.Y. Yogurt:nutritive and therapeutic aspects. J. Food Prot.v. 44, p. 78-96, 1981.

18- FARNWORTH.E.D. Kefir – a complex probiotic. Food Sci. Techol. v. 2, p.1-17, 2005.

19- KURMAN, J. A ., RASIC, J.L., E KROGER, M. Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products. Van Nostrand Reinhold, New York. 1992.

20- Codex Standard for Fermented Milks CODEX STAN 243-2003

21- SPREER, E. Lactologia industrial. 2.ed. Zaragoza: acribia, 1991.

22- MOCQUOT, G.; HUREL, C. The seletion and use of some microorganisms for the manufacture of fermented and acidified milk products. J. Soc. Dairy Technol. v. 23, p. 130-142, 1970.

23- BESHKOVA, D.; SIMOVA, E.; FRENOGOVA, G.; SIMOV, Z. Production of flavour compounds by yogurt startercultures. J. Microbiol. Biotechnol. v. 20, p. 180 – 186, 1998.

24- MERCOSUL/GMC/Res. No 47/97 Regulamento técnico Mercosul de identidade e qualidade do leite fermentado. Disponível em:
<http://www.mercosul.org.org.uy/portugues/snor/normativa/resoluciones/1997/47-97.htm>. Acesso em: 03 abr.2006

25- CROMIE, S. Psychrotrophs and their enzyme residues in cheese milk. Aust. J. Dairy Technol. v. 47, p.96-100, 1992.

26- VERUMA. M.R.; OLIVEIRA, A.J. Avaliação química e nutricional do queijo mozzarella e iogurte de leite de búfala. Scientia Agrícola. v. 50, p. 438 – 443, 1993.

27- TAMIME, A.Y.; DEETH, H.C.. Yogurt: Technology and biochemistry. J. Food Prot. v. 43, p. 939-977, 1980.

-
- 28- SOUZA, G. Iogurte: Tecnologia, consumo e alta produção. Leite e Derivados. v.28, p.19-23, 1996.
- 29- SALADO, G.A; ANDRADE, M.O. de. Processamento de qualidade nutricional do iogurte. Boletim Cultural. v. 7, p. 1-35, 1989.
- 30- AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 2nd edition. Eds. Salminen, S. and von Wright, A. Marcel Dekker, Inc., New York. 1998, 72p.
- 31- McKAY, L.L. E BALDWIN, K. Application for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol.Rev. v. 87, p. 3-14, 1990.
- 32- FARNWORTH, E.R. Kefir: from folklore to regulatory approval. Journal. Nutraceutical, Functional and Medical Foods. v. 1, p. 57-68, 1999.
- 33- MARGULIS, L. From kefir to death. Ed. In Brockman, J. and Matson, K., How things are: 69-78. William Morrow and Co., New York.
- 34- KOROLEVA, N.S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeast. In: Robinson, R.K., editor. Therapeutic properties of fermented milks. Elsevier Applied Sciences Publishers. London, UK, 1991. 179p.
- 35- KOJIMA, S., TAKISAWA, S., TAMURA, S., FUJINAGA, S., BENNO, Y. E NAKASE, T. An improved medium for the isolation of Lactobacilli from kefir grains. Biosci. Biotechnol. and Biochem.. v. 57, p. 199-202, 1993.
- 36- LINOSSIER, J.P.; DOUSSET, X. Stimulation de la croissance et du métabolisme de Lactobacillus kefir par Candida kefir. Microbiologie Aliments Nutrition. v. 12. p. 342-351, 1994.
- 37- GARROTE, G.L.; DELFEDERICO, L.; BIBILONI, R.; ABRAHAM, A.G.; PEREZ, P.F.; SEMORILE, L. ; De ANTONI, G.L. Lactobacilli isolated from kefir grains: evidence of the presence of S-layer protein. J. Dairy Res. v. 71, p. 222-230, 2004.
- 38- KOROLEVA, N.S. Products prepared with lactic acid bacteria and yeast. In: Robinson, R.K., editor. Therapeutic properties of fermented milks. Elsevier Applied Sciences Publishers, London, UK. 1991, 179p.
- 39- PARASKEVOPOULOU, A. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. Food Res. Int. v. 36, p. 431-438, 2003.
- 40- VILJOEN, B.C. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. Int. J. Food Microbiol. v. 69, p.37-44, 2001.
- 41- CLEMENTI, F.; GOBBETTI, M.; ROSSI, J. Carbon dioxide synthesis by immobilized yeast cells in kefir production. Milchwissenschaft. v. 44, p.70-74, 1989.

-
- 42- KWAK, H.S., PARK, S.K. E KIM, D.S. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *J. Dairy Sci.* v. 79, p. 937-942, 1996.
- 43- IWASAWA, S.; UEDA, M.; MIYATA, N.; HIROTA, T.; AHIKO, K. Identification and fermentation character of kefir yeast. *Agric. Biol. Chem.* v. 46, p.2631-2636, 1982.
- 44- WYDER, M. T.; SPILLMANN, H.; MEILE, L.; PUHAN, Z. Investigation of the yeast flora in dairy products from kefir at species: a case study of kefir. *Food Technol. Biotechnol.* v. 35, p.299-304, 1997.
- 45- WYDER, M.T; PUHAN, Z. A rapid method for identification of yeast from kefir at species level. *Milchwissenssenschaft.* v. 52, p.327-330, 1997.
- 46- TOBA, T.; ABE, S.; ADACHI, S. Modification1990 of PL medium for polyssacaride production by *Lactobacillus* sp. Isolated from kefir grain. *Jpn. J. Zoot. Sci.* v. 58, p.987-990, 1987.
- 47- LIN, C-W.; CHEN, H-L; LIU J-R. Identification and characterization of lactic acid bacteria and yeast isolated from kefir grains in Taiwan. *Aust. J. Dairy Technol.* v. 54, p.14-18, 1999.
- 48- GUZEL-SEYDIM, Z.B. , SEYDIM, A . C., GREENE, A. K. E BODINE, A. K. Determination of organic and volatile flavor substance in kefir during fermen. *Tation.J. Food Comp. Anal.* v. 13, p.35-43, 2000(a).
- 49- REA, M.C.; LENNARTSON, T.; DILLON, P.; DRINAM, F.D.; REVILLE, W.J., HEAPES, M.; COGAM,T.M.. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *J. Appl. Bacteriol.* v. 81, p.83-94, 1996.
- 50- KUO, C.Y.; LIN, C.W. Taiwanese kefir grains: their growth, microbial a chemical composition of fermented milk. *Aust. J. Dairy Technol.* v. 54, p.19-23, 1999.
- 51- GARROTE,G.L.;ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L.Characteristics of kefir prepared with different grain:milk ratios. *J. Dairy Res.* v. 65, p.149-154, 1998.
- 52- WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ. T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different south african kefir grains. *Int. J. Dairy Technol.* v. 57, p. 33-37, 2004.
- 53- KOROLEVA, N.S. Starters for fermented milks kefir and kumys starters. *Int. Dairy Fed. Bull.* v. 227, p.34-50, 1988. (este jornal é Bulletin of The International Dairy Federation)
- 54- LA RIVIERE, J.W.; KOOIMAN, P. Kefirano, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mkrobiol.*v.59, p.259-278, 1967.
- 55- LUIS, A.; LOPEZ, E.; LEMMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region. *J. Dairy Res.* v. 60, p.263-267, 1993.

-
- 56- MUROFUSHI, M.; MIZUGUCHI, J.; AIBARA, K.; MATUHASI, T. Immunopotentiative effect of polysaccharide from kefir grain, KGF-C, administered orally in mice. *Immunopharmacology*, v. 1, p.29-35, 1986.
- 57- GUZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; BODINE, A. K. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. *J. Food Comp. Anal.* v. 13, p. 35–43, 2000(b).
- 58- PARASKEVOPOULOU, A.. Functional properties of single cell protein produced by kefir microflora. *Food Res. Int.* v. 36, p. 431-438, 2003.
- 59- DE VUYST,L; DEGEEST,B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews.*, v. 23, p.153-177, 1999.
- 60- RUAS-MADIEDO ,P.; HUGENHOLTZ, J. Z. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* v. 12, p. 163-171, 2002.
- 61- JOLLY, L.; VINCENT, S.J.F.; DUBOC, P.; NEESER, J-R. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* v. 82, p. 367 – 374, 2002.
- 62- MUKAI, T.; TOBA,T.; ITOH,T.; ADACHI, S. Strutral microheterogeneity of kefiran from kefir grains. *Jpn. J. Zoot.* v. 59, p. 167-176, 1988.
- 63- MUKAI, T.; TOBA, T.; ITOH, T.; NIMURA, T.; ADACHI,S. Carboxilmethyl kefiran: preparation and viscometric properties. *J. Food Sci.* v. 55, p.1483-1484, 1990.
- 64- YOKOI,H.; WATANABE, T.; FUJII,Y.; MUKAI,T.; TOBA,T.; ADACHI,S. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus sp* KPB-167B isolated from kefir grains and characterization of its extracellular polysaccharide. *Int. J. Food Microbiol.* v. 13, p. 257-264, 1991.
- 65- LA RIVIÉRE , J.W.M.; KOOIMAN,P.; SCHIMDT, K. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Michrobiol.* v. 59, p. 269-278, 1967.
- 66- VAN GEEL-SCHUTTEN, G.H.; FABER, E.J.; SMIT,E.; BONTING,K.; SMITH, M.R. TEN BRINK,B.; KAMERLING,J.P.; Vliegenthart, J.F.; DIJKHUIZEN, L. Biochemical and structural characterization of the glucan and fructan exopolysaccharides synthesized by the *Lactobacillus reuteri* wildtype strain and by mutant strains. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 65, p.3008-3014,1999.
- 67- DUPONT, I.; ROY, D. LAPOINTE, G. Comparison of exopolysaccharide production by strains of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus paracasei* grown in chemical defined medium and milk. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v. 24, p. 251-255, 2000.

-
- 68- TOBA, T.; ABE, S.; ADACHI, S. Modification of PL medium for polysaccharide production by *Lactobacillus* sp. Isolated from kefir grain. *Jpn. Zoot. Sci.* v. 58 p.987-990, 1987.
- 69- ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Characterization of kefir grains grown in cow's milk and in soya milk. *J. Dairy Res.* v. 66, p. 327-333, 1999.
- 70- LIU, J.R.; CHEN, M.J.; LIN, C.W. Characterization of polysaccharide and volatile compounds produced by kefir grains grown in soymilk. *J. Food Sci.* v. 67 p.104-108, 2002.
- 71- FRENGOVA, G. I.; SIMOVA, E. D.; BRESHKOVA, D.M.; SIMOV, Z.I. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria of kefir grains. *Z. Naturforsch.* v. 57, p. 805-810, 2002.
- 72- GIRRAFFA, G. Microbial polysaccharides produced by lactic acid bacteria in the dairy industry. *Industrie Alimentari*, .v. 33, p. 295-298, 1994.
- 73- CRESCENZI, V. Microbial polysaccharides of applied interest: on going research activities in Europe. *Biotechnol. Prog.* v. 11, p. 251-259, 1995.
- 74- LINDGREN, S.E. E DOBROGOSZ, W.J. Antagonism activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 87, p. 149-164, 1990.
- 75- GOULD, G.W. Antimicrobial compound. In: *Biotechnology and Food Ingredients*. 3eds. Goldberg, I. and Williams, R. pp. 461-483. Van Nostrand Reinold, New York, 1991.
- 76- PODOLAK, P.K.; ZAYAS, J.F.; KASTNER, C.L.; FUNG, D.Y.C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* 0157:H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Prot.* v. 59, p.370-373, 1996.
- 77- KASHKET, E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* v. 46, p.233-244, 1987
- 78- SMULDERS, F.J.M.; BARENDSEN, P.; van LOGTESTIJN, J.G.; MOSSEL, D.A.A.; van den MAREL, G.M. Review: Lactic acid: considerations in favor of its acceptance as a meat decontaminant. *J. Food Technol.* v. 21, p.419-436, 1986.
- 79- EARNSHAW R.G. The antimicrobial action of lactic acid: natural food preservation system. In: *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease*. Ed. Wood, B.J.B. Elsevier Applied Science. London and New York. 1992, 237p.
- 80- WOOLFORD, M.K. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. *J.Sci. Food Agric.*, v. 26, p.229-237, 1975.

-
- 81- BENTHIN, S. E VILLADSEN, J. Different inhibition of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *Bulgaricus* by D- and L-lactic acid: effects on lag phase, growth rate and cell yield. *J. Appl. Bacteriol.*, v. 78, p. 647-654, 1995.
- 82- HUANG, L. Influence of external pH and fermentation products on *clostridium acetobutylicum* intracellular distribution of fermented products. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 51, p.1230-1234, 1999.
- 83- ADAMS, M.R.; HALL, C.J. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol.* v.23, p. 287-292,1988.
- 84- YANG, Z. Antimicrobial compounds and extracellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria: strutures and properties. 2006.61f. Tese(Doutorado) – University of Helsinki.
- 85- ZOURARI, A.; ACCOLAS, J.P.; DESMAZEAUD, M.J. Metabolism and biochemical characteristic of yogurt bacteria. *Le Lait*, v.72, p.1-34, 1992.
- 86- IZCO, J.M.; TORMO, M.; JIMÉNEZ-FLORES, E R. Development of a CE method to Analyse Organic Acids in Dairy Products: Application to study the Metabolism of Heat-Shocked Spores. *J. Agric. Food Chem.* v.50, p.1765-1773, 2002.
- 87- FOX, P.F.; LAW, J.; McSWEENEY, P.L.H; WALLACE, J.; in:P.F.Fox(Ed.), *Cheese:Chemistry, Physics and Microbiology*, Chapman e Hall, London, UK, p. 1993, 389p.
- 88- KONG, S.; DAVISON, A. J. The role of of relations between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. *Arch. Biochem. Byophys*, v. 204, p. 13-29, 1980.
- 89- BYCZKOWSKI, J.; GESSNER, T. Biological role of superoxide ion-radical. *Int. J. Biochem.* v.20, p.569-580, 1988.
- 90- DAVIDSON, P. M. ET AL. Naturally occuring and miscellaneous food antimicrobials. In: *Antimicrobials in Foods*. Eds. Davidson, P.M. and Branen, A. L. Marcel Dekker Inc., New York. 392p.
- 91- CORDS, B.R. E.; DYCHDALA, G.R. Sanitizers: halogens, surface-active agents, and peroxide. In: *antimicrobials in Foods*, 2nd edition.eds.. Davidson, P.M. and Branen, A. L. Marcel Dekker Inc., New York., 1993. 537p.
- 92- EKLUND, T. The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *Int. J. Food Microbiol.* v. 1, p. 179-185, 1984.
- 93- FABER, J.M. Microbiological aspects of modified-atmosphere packing technology – a review. *J. Food Prot.*, v. 54, p. 58-70,1991.

-
- 94- HOTCHKISS, P.E; CHEN, J.H.; LAWLESS, H.T. Combined effects of Carbon dioxide addition and barrier films on microbial and sensory changes in pasteurized milk. *J. Dairy Sci.* .v. 82, p.690-695, 1999.
- 95- LINDGREN, S.E. E.; DOBROGOSZ, W. J. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 87, p.149-164, 1990.
- 96- JAY, J.M. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 44, p.525-532, 1982.
- 97- JAY, J.M. *Modern Food Microbiology*. 3rd edition. Van Nostrand Reinhold, New York. 1986.
- 98- PIARD, J. C. E.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end products. *Le Lait.*, v. 71, p.525-541, 1991.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O primeiro objetivo principal deste trabalho foi avaliar a eletroatividade de produtos de leite fermentados pelos grãos kefir e do tibet, em ultramicroeletrodos de platina ou ouro. O segundo foi separar e quantificar os ácidos orgânicos formados durante a fermentação, utilizando a cromatografia líquida.

Objetivos específicos:

- verificar a resposta voltamétrica utilizando UME (ultramicroeletrodo) de ouro em amostras de iogurte comercial e comparar com obtidos com amostra de leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet;
- quantificar ácidos orgânicos por HPLC e detectar em técnica voltamétrica;
- verificar a qualidade do leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet pela comparação com amostra de iogurte comercial;
- Avaliar a eletroatividade de polissacarídeos produzidos pelo kefir;
- Analisar a influência da temperatura na quantificação de ácidos orgânicos durante o tempo de armazenamento.

CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Técnicas Voltamétricas

A voltametria é a técnica eletroanalítica na qual se mede a corrente em função do potencial aplicado, com variação linear entre a corrente de pico e o potencial. Um sistema eletroquímico do tipo potenciostato é composto por uma célula contendo três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) ou dois eletrodos (um ultramicroeletrodo, o de trabalho, e outro, o de referência) compõem a ferramenta para a execução da medida voltamétrica. Na superfície do eletrodo de trabalho, ocorre a reação redox a ser investigada. O eletrodo de referência mantém o potencial constante durante todo o experimento e o terceiro eletrodo auxiliar serve para minimizar a polarização por densidade de corrente, portanto tem área muito maior que a do eletrodo de trabalho^{99, 100, 101}.

2.1.1. Ultramicroeletrodos

Segundo a IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), microeletrodo é definido como "qualquer eletrodo cuja dimensão característica é, sob determinadas condições experimentais, comparável ou menor que a espessura da camada de difusão"¹⁰². Consideramos ultramicroeletrodo como um eletrodo com dimensões inferiores a 100µm de diâmetro. Alguns autores consideram como UMEs aqueles que têm dimensão entre 0,1µm 100µm. Algumas características do comportamento eletroquímico peculiar dos UMEs, resultante da semelhança de suas dimensões micrométricas à espessura da camada de difusão, têm despertado um grande interesse nas áreas eletroquímica e eletroanalítica, que estão relacionadas

com a qualidade dos dados experimentais, incluindo aumento de resolução, aumento de densidade de corrente e diminuição nos efeitos da resistência da solução. Isso atribui a estes eletrodos propriedades vantajosas em relação aos eletrodos convencionais. Como:

i) Transporte de massa mais efetivo

Devido às contribuições das difusões planar e radial serem iguais, isto faz com que o estado estacionário seja alcançado em tempos mais curtos para os UMEs, comparado aos eletrodos convencionais. Estas características favorecem o estudo de reações eletródicas rápidas e justificam a alta densidade de corrente¹⁰³. Outra característica importante dos UMEs é o comparável tamanho destes à espessura da camada de difusão, sendo que esta camada é maior que o eletrodo, e isto contribui também para este eletrodo levar um menor tempo para atingir o estado estacionário. Este tempo é da ordem de milissegundo, enquanto eletrodos convencionais levam cerca de 2 minutos ou mais, sendo impossível em tempos tão curtos ocorrer a convecção. Desta forma, é estabelecida uma camada de difusão e único transporte de massa para a superfície do eletrodo e a difusão.

As correntes relacionadas ao processo de transferência de elétrons (oxidação e redução) dependem de como ocorre o transporte de massa das espécies eletroativas do seio da solução para a superfície do eletrodo de trabalho. Estes transportes de massa podem ocorrer por migração, convecção e difusão. Dois destes processos são minimizados pelo uso de eletrólito de suporte e temperatura constante (migração, devido a efeitos de campo elétrico) e por agitação da solução (convecção). Sendo assim, o único transporte de massa responsável pela condução das espécies eletroativas é a difusão, processo pelo qual as espécies difundem de

regiões de maior concentração para regiões de menor concentração (gradiente de concentração).

A difusão é descrita pela primeira Lei de Fick:

$$J_i(x) = -D_i \frac{\partial C_i(x)}{\partial x} \quad \text{Equação 1}$$

onde $J_i(x)$ é o fluxo de espécies i de concentração c_i na direção x e $\partial c / \partial x$ é o gradiente de concentração. D_i é um fator de proporcionalidade entre o fluxo e o gradiente de concentração, conhecido como o coeficiente de difusão¹⁰⁴.

Esta lei define que, para o fluxo de espécies eletroativas do seio da solução até a superfície do eletrodo de trabalho, a velocidade de difusão é proporcional ao gradiente de concentração.

ii) Menor queda ôhmica

As correntes, faradaica e capacitiva, que fluem por uma cela eletroquímica, geram um potencial que se opõe ao potencial aplicado. Este potencial é o produto da corrente total ($i_t = i_f + i_c$) pela resistência da solução (R), e é conhecido como potencial de queda ôhmica (Ir). Na prática, é subtraído da diferença de potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Como a corrente é proporcional à área do eletrodo, a corrente que circula em UME é muito baixa, então não há necessidade de compensação da queda ôhmica como acontece com o eletrodo convencional, em que é necessário o uso de eletrodo auxiliar (ou contra eletrodo), fazendo com que a corrente flua entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, como forma de compensar a queda ôhmica^{105, 106}.

A menor queda ôhmica possibilita o uso de instrumentação mais simples com cela eletroquímica contendo dois eletrodos, eletrodo de trabalho e de referência.

Possibilita também estudos eletroquímicos de sistema redox em solventes com elevada resistência ou mesmo na ausência de eletrólito suporte.

A corrente que circula pelo sistema e a resistência da solução (queda ôhmica, iR) é proporcional ao raio do eletrodo, então iR diminui com o raio do eletrodo.

$$iR \propto r^2 \times \frac{1}{r} \quad \text{Equação 2}$$

iii) Elevada razão corrente faradaica/corrente capacitiva

Na situação em que nenhuma transferência de carga ocorre entre o eletrodo e a solução, a interface eletrodo-solução se comporta como um capacitor, quando um potencial é aplicado sobre o eletrodo. Dependendo do potencial aplicado, vai ocorrer acomodo de carga na superfície do eletrodo e na solução na vizinhança do eletrodo, que pode ser um cátion, ânion ou molécula do próprio solvente. Esta região adjacente ao eletrodo é chamada de dupla camada elétrica e, durante sua formação, uma corrente capacitiva flui pelo sistema. E esta corrente é dada por:

$$i_c = \frac{\Delta E}{R} e^{-t/RC} \quad \text{Equação 3}$$

A corrente capacitiva pode ser maior que a corrente faradaica quando as espécies eletroativas estão em baixas concentrações, interferindo assim nas medidas de corrente difusional. Mas quando se utiliza UME, observa-se uma diminuição da corrente capacitiva, porque a corrente capacitiva é proporcional à área do eletrodo e, quando esta é diminuída, há um aumento da razão corrente faradaica/corrente capacitiva i_f/i_c .

2.1.1.1. Aplicação de ultramicroeletrodos na determinação de leite e derivados

2.1.1.2. Voltametria Cíclica^{107, 108}

A voltametria cíclica é a técnica mais largamente usada para informar qualitativamente as reações eletroquímicas. Esta técnica resulta da sua habilidade para fornecer informações consideráveis sobre a termodinâmica de processos redox, cinética de reações de transferência de elétrons heterogêneas, reações químicas paralelas ou processos de adsorção. Consiste também no primeiro experimento de um estudo eletroanalítico. Em particular, oferece uma rápida localização de potenciais redox de espécies eletroativas e excelente avaliação de processo redox.

A voltametria cíclica consiste de uma varredura linear de potencial de eletrodo de trabalho estacionário (solução não agitada) usando potencial em forma de onda triangular (Figura 6). Dependendo da informação buscada, podem ser usados ciclos simples ou múltiplos. Durante a varredura de potencial, as medidas potenciostáticas de corrente resultam de um potencial aplicado, que resulta ainda numa curva corrente versus potencial, chamada de voltamograma. O voltamograma cíclico é complicado, e é uma função dependente de tempo de um grande número de parâmetros físico e químico.

A Figura 7 mostra uma resposta esperada para um par redox durante um ciclo de potencial simples. Considerando que somente a forma oxidada “O” esteja presente inicialmente. Então uma varredura de potencial negativa é escolhida para a metade do primeiro ciclo, começando de um valor onde nenhuma redução ocorra. Como o potencial aplicado aproxima-se do E^0 característico para um processo redox, uma corrente catódica começa a aumentar até um pico ser formado. Após atravessar a região de potencial no qual o processo de redução acontece (no mínimo $90/n$ mV) além do pico, a direção de potencial será modificada para o sentido reverso. Durante a varredura reversa, moléculas “R” (gerada no ciclo direto e

acumulada próximo da superfície do eletrodo) são reoxidadas de volta para “O” e resulta em uma corrente anódica.

Os picos característicos na voltametria cíclica são causados pela formação da camada de difusão próximo da superfície do eletrodo.

Figura 6 – Variação de potencial aplicado com o tempo em voltametria cíclica. E_f , potencial final, E_i potencial inicial, E_{max} , potencial máximo e E_{min} , potencial mínimo

Figura 7 – Voltamograma cíclico hipotético para um processo redox reversível $O + ne^- \rightleftharpoons R$.

Critérios de reversibilidade em Voltametria¹⁰⁹.

O comportamento entre a corrente de pico (i_p) e a velocidade de varredura (v) ou a raiz quadrada da velocidade ($v^{1/2}$) de varredura classificam as reações em reversíveis e irreversíveis. Uma reação é reversível quando a corrente de pico (i_p) varia linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura e o potencial de pico independe do potencial de pico (E_p), portanto a diferença $|E_p - E_{p/2}|$ é igual a $56,6/n$ mV e é constante. E uma reação é irreversível quando há uma dependência entre a corrente de pico e o potencial de pico. Se ocorrer uma oxidação, a onda voltamétrica é deslocada para potenciais mais positivos. A forma das ondas voltamétricas são mais largas e freqüentemente menores em processos irreversíveis.

O voltamograma cíclico é caracterizado por muitos parâmetros importantes. Quatro destes observáveis: duas correntes de picos e dois potenciais de picos, que fornecem as bases para analisar a resposta da voltametria cíclica, cujos diagnósticos foram desenvolvidos por Nicholson e Shain.

Sistema Reversível

A corrente de pico para uma reação reversível (em 25°C) é dada pela equação de Randles -Sevick

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A C D^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 4}$$

Onde n é o número de elétrons, A é a área do eletrodo (cm^2), C é a concentração (mol cm^{-3}), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}). A corrente é diretamente proporcional à concentração e raiz quadrada da velocidade de varredura. A razão da corrente de pico direta e reversa, $i_{p,r}/i_{p,f}$ é igual à unidade para um par reversível.

A posição do potencial de pico no eixo x (E_p) está relacionada com o potencial formal do processo redox. O potencial formal para um par reversível está entre $E_{p,a}$ e $E_{p,c}$.

$$E^o = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad \text{Equação 5}$$

A separação entre os potenciais de pico (para um par reversível) é dado pela equação:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0,059}{n} V \quad \text{Equação 6}$$

Então a separação de pico pode ser usada para determinar o número de elétrons transferidos e é um critério para o comportamento nerstiano. Um processo que envolve um elétron exibe um ΔE_p cerca de 59mV.

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm \frac{0,028}{n} V \quad \text{Equação 7}$$

Sistemas Irreversíveis e Quase-Reversíveis

Sistemas irreversíveis

Para processos irreversíveis, aqueles com transferência de elétron lenta, os picos individuais têm tamanhos reduzidos e grande separação entre si.

$$E_p = E^o - \frac{RT}{an_a F} \left[0,78 - \ln \frac{k^o}{D^{1/2}} + \ln \left(\frac{an_a F v}{RT} \right)^{1/2} \right] \quad \text{Equação 8}$$

Sistemas totalmente irreversíveis são caracterizados pela mudança do potencial de pico com a velocidade de varredura. A diferença entre o potencial de

pico e o potencial de pico a meia altura é dada por, $E_p - E_{p/2} = 48/an \text{ mV}$. Então, quando menor for an tanto mais alongado será o voltamograma (Figura 8).

A corrente de pico é dada por

$$i_p = (2,99 \times 10^5) n (an_a)^{1/2} ACD^{1/2} \nu^{1/2} \quad \text{Equação 9}$$

Figura 8 - Voltamograma cíclico de um composto hipotético mostrando o efeito do aumento da irreversibilidade da corrente em função do potencial.

Sistemas quase-reversíveis

Para sistema quasi-reversíveis, a corrente é controlada tanto por transferência de carga como por transporte de massa. Então a forma do voltamograma é função do $k^0/vpaD$ (onde $a = nfv/RT$). Quando $k^0/vpaD$ aumenta, o processo aproxima-se de caso reversível. E para pequenos valores de $k^0/vpaD$, isto é, a velocidade muito rápida, o sistema exibe comportamento irreversível.

Sobretudo os voltamogramas de sistemas quase-reversíveis são mais alongados e exibem grande separação no potencial de pico comparado àqueles de sistemas reversíveis (Figura 9).

Figura 9 – Voltamograma cíclico para processos redox irreversíveis (curva A) e quase-reversíveis (curva B)

2.2. Cromatografia Líquida

2.2.1. Os fundamentos teóricos em cromatografia líquida

A cromatografia em fase líquida (LC), com detecção ultravioleta, fluorescência ou arranjo de diodo, é muito usada na determinação de ácidos orgânicos em leite e derivados de leite (iogurtes, queijos, manteigas etc.) e inclusive em vinhos e em vários sucos. Neste trabalho essa técnica foi usada na identificação e quantificação de ácidos orgânicos em leite, leite fermentado e amostra comercial de iogurte.

Os principais parâmetros cromatográficos utilizados na cromatografia líquida são¹¹⁰:

Tempo de retenção (t_R): é definido como sendo o tempo transcorrido desde o momento da injeção da amostra até que se obtenha o máximo do pico de um composto. O tempo de retenção ajustado (t'_R), que é o tempo em que o composto permanece na fase estacionária. É calculado através da subtração do t_R do tempo morto (t_M ou t_0). O tempo morto é definido como sendo o tempo necessário para eluir um pico não retido pela coluna¹¹¹.

Eficiência da coluna: Quanto maior o número de pratos, maior será a eficiência e, portanto, melhor a separação. A eficiência de uma coluna é determinada pelo número de pratos teóricos e pela altura equivalente a um prato teórico.

1) Em relação ao número de pratos:

Nestes cálculos, w_b é definido como a largura da base do pico, que corresponde a 4s de um pico gaussiano. Outra maneira de tratar a largura do pico é por meio de w_h , o qual é determinado na metade da altura do pico. A eficiência (N), assim, pode ser calculada pelas equações¹¹²:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \text{ ou } N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 \quad \text{Equação 10}$$

2) Em relação a altura equivalente a um prato (H):

$$H = \frac{L}{N} \quad (\text{onde } L = \text{comprimento da coluna}) \quad \text{Equação 11}$$

A eficiência da coluna está relacionada com o tamanho das partículas (d_p) de empacotamento^{113, 114}. O uso de partículas de menor diâmetro é importante para se obter altas eficiências. Isto permitiu a introdução de um novo conceito: a altura reduzida de um prato, (h), permite-lhe comparar melhor colunas com diferentes características.

$$h = \frac{H}{d_p} \quad \text{Equação 12}$$

Resolução (Rs):

A resolução é uma medida quantitativa da separação de dois picos consecutivos¹³, sendo determinada por dois fatores: $\Delta t_R = (t_{R2} - t_{R1})$ e w_b .

$$R = \frac{2\Delta t_R}{W_{b1} + W_{b2}} \quad \text{Equação 13}$$

Os valores de resolução acima de 1,5 significam que as substâncias têm uma separação até a linha de base. Valores menores significam que a separação do pico é somente parcial e, portanto, determinação da área do pico da substância se torna inexata e a análise quantitativa errônea.

Fator de retenção (k):

Medida adimensional e fundamental da retenção em cromatografia líquida. É definida como a razão entre o número de moléculas do soluto na fase estacionária e o número de moléculas do soluto na fase móvel. É independente do comprimento da coluna e da velocidade do fluxo da fase móvel e representa a razão molar do soluto na fase estacionária e na fase móvel, no equilíbrio entre essas duas fases¹¹⁵.

$$K = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{Equação 14}$$

Fator de separação ou seletividade (a):

O fator de separação(a) mede a seletividade da separação para duas bandas adjacentes, ou seja, é a relação existente entre o tempo que dois picos permanecem na fase líquida¹³.

O fator de separação ou seletividade é sempre calculado entre dois picos adjacentes:

$$a = \frac{t_{R2}}{t_{R1}} \quad \text{Equação 15}$$

Equação fundamental da resolução (Rs):

A otimização da resolução está relacionada com os parâmetros experimentais na equação fundamental da resolução (Rs), que representa termos relacionados à eficiência (representada pelo número de pratos teóricos) à distribuição dentro da coluna (representada pelo fator de separação (a)).

Mudanças nestes três termos geram mudanças na resolução e, portanto, na separação¹³.

$$R = \left(\frac{\sqrt{N}}{4} \right) \left(\frac{K}{k+1} \right) \left(\frac{a}{a+1} \right) \quad \text{Equação 16}$$

Todos estes parâmetros têm importância para se avaliar principalmente efeitos de co-migração muito comuns em análises cromatográficas entre os picos precisam está bem separado, isto mostra boa resolução estes são resolvidos pela escolhas da fase orgânica, a vazão do fluxo, a temperatura da coluna.

2.2.2 Validação do método LC para determinação de ácidos orgânicos em leites fermentados

Muitos métodos analíticos têm sido usados para detectar e quantificar ácidos orgânicos em leite fermentado. Mas a cromatografia tem sido a técnica mais largamente empregada para análise de compostos individuais.

Na cromatografia líquida (LC), os componentes de uma solução são separados pela migração diferencial de solutos em um fluxo líquido que percorre uma coluna empacotada com partículas sólidas¹¹⁶.

A fase estacionária em cromatografia líquida é constituída por partículas esféricas ou irregulares empacotadas em um tubo capilar de quartzo. Os tamanhos de partículas mais comumente usados em separações analíticas são de 3 ou 5µm, enquanto que as colunas utilizadas apresentam um diâmetro interno que varia de 4 a 6mm¹¹⁷.

Um sistema de LC é composto por um reservatório para o solvente, bombas, injetor, uma coluna e um detector¹¹⁸.

As principais vantagens da LC são:

- velocidade de separação; alta resolução; alta sensibilidade (detectores UV/Vis são muito sensíveis);
- é uma ótima técnica para análise de moléculas grandes e espécies iônicas;
- excelente técnica quantitativa; dentre outras¹¹⁹.

2.2.2.1. Validação de métodos

Existem dois tipos de validação de métodos: um denominado validação no laboratório ("in house validation") e outro validação completa ("full validation")¹²⁰. A validação completa envolve um estudo interlaborial, para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia. Na validação no laboratório, as etapas de validação são realizadas em um único laboratório, tanto para validar um

método desenvolvido localmente, quanto para verificar se um método externo adotado está sendo aplicado adequadamente.

Para validação de métodos de separação os parâmetros analíticos normalmente utilizados são: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação. Estes parâmetros servem para verificarmos se um determinado método é eficiente na análise quantitativa¹⁸.

Seletividade

É a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa.

A seletividade avalia o grau de interferência de espécies com outro ingrediente ativo, excipiente, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que, por ventura, possam estar presentes. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse.

Para obtenção da seletividade pode-se fazer:

- comparação entre a matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta substância padrão. Nenhum interferente deve eluir no mesmo tempo de retenção da substância de interesse;
- método de detecção com arranjo de diodos e espectrômetro de massas. Neste caso, faz-se uma comparação do espectro do pico obtido na separação com o de um padrão do analito;

-método de adição padrão: utilizado quando não é possível obter a matriz isenta da substância de interesse. Neste caso, faz-se uma curva de calibração da substância de interesse na amostra e compara com uma curva analítica sem a presença da matriz. Na comparação das curvas, ambas devem ser paralelas para confirmar a não interferência da matriz na determinação da substância de interesse, método é dito desta forma, seletivo;

- aplicação de outra técnica, que seja específica para a estrutura da substância de interesse, por exemplo: espectrometria de massa; ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho.

Linearidade e faixa de aplicação:

Avalia a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação^{13, 22,,121}.

Deve-se determinar empiricamente uma relação matemática entre o sinal e a concentração, ou massa da espécie de interesse, e expressar essa relação como uma equação da reta chamada de curva analítica ou curva de calibração²². A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear. Dos pontos experimentais pode-se calcular os coeficientes de regressão a, b e o coeficiente de correlação “r”. Quanto ao valor do r, quanto mais próximo de 1 menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO, um valor acima de 0,90^{122, 123,}

¹²⁴.

O intervalo entre o valor superior e o inferior do analito corresponde à faixa de aplicação, atendendo aos requisitos de precisão e exatidão. A faixa de aplicação é normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método. A literatura cita várias recomendações, a ANVISA especifica um intervalo compreendido entre 80-120% da concentração teórica para fármacos e medicamentos. A IUPAC recomenda duas faixas para o valor esperado 0-100% ou 50-150% dependendo de qual destas duas opções for mais adequada. A ANVISA e ICH recomendam dentro dos critérios estabelecidos para a faixa de aplicação que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes.

Precisão

Representa o grau de dispersão dos resultados, ou seja, mede o quão os resultados obtidos se assemelham entre si e é usualmente relatado como uma porcentagem do desvio padrão relativo. A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ^1), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s)

13, 18, 125.

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Equação 17

Onde:

$\bar{x}$: média aritmética de um pequeno número de medidas;

$$^1 s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

Onde: $\bar{x}$: media aritmética de um pequeno número de medidas; x_i : valor de cada medida; n : número de medidas.

x_i : valor de cada medida;

n : número de medidas

Outra forma de expressar a precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), conhecido também como coeficiente de variação (CV):

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = \frac{s}{x} \times 100$$

A comprovação da precisão pode ser estudada pela repetibilidade (precisão em medidas da replicata da mesma solução) e reprodutibilidade (precisão dos resultados de medidas de diferentes soluções)^{13, 19, 22, 27}.

Repetibilidade

Representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto intervalo de tempo. A repetibilidade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intra-ensaio ou intra-corrida e pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD). A ICH¹²⁶ e a ANVISA¹²⁷ sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações cobrindo o limite especificado do procedimento (três níveis, três repetições cada um), ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração similar ao valor esperado.

Reprodutibilidade

É o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudanças de operador, local, equipamentos, etc). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a

padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos, por exemplo, em farmacopéias, procedimentos do CODEX etc.

Exatidão

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão é sempre considerada dentro de certos limites, a um dado nível de confiança. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços. O número de ensaios varia segundo a legislação ou diretriz adotada e também com as características do método. O processo mais utilizado para avaliar a exatidão de um método é a recuperação.

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na matriz, e que pode ser extraída e quantificada.

A recuperação é determinada pela relação:

$$Recuperação(\%) = \frac{\text{valor obtido}}{\text{valor adicionado}} \times 100$$

Equação 18

A limitação do procedimento de recuperação é a de que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra. Isto pode implicar, por exemplo, a presença de substâncias adicionadas em uma forma que proporcione melhor detecção, ocasionando avaliações excessivamente otimistas da recuperação. Pelo fato de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos

componentes da matriz devem ser investigados. É importante considerar como a eficiência do método varia em função da concentração da substância em pelo menos três diferentes concentrações. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$. Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até 15% ²².

Limite de detecção

Representa a menor quantidade de analito que pode ser detectada nas condições experimentais estabelecidas, mas não necessariamente quantificada ^{13, 18, 22}. O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica. No método visual o limite de detecção utiliza a matriz com adição de concentrações conhecidas das substâncias de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração. O método relação sinal-ruído é aplicável àqueles métodos em que os procedimentos analíticos mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas dos compostos de interesse na matriz e um branco. É estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada. A relação sinal-ruído pode ser de 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

No método baseado na curva analítica, o limite de detecção pode ser expresso como:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$$

Equação 19

Onde:

s: é a estimativa do desvio padrão da resposta;

S: é inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica.

Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) representa a menor quantidade de analito em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.^{13, 22}. A determinação do LQ representa um compromisso entre a concentração, a precisão e a exatidão exigida. Isto significa que, quando decresce o nível de concentração do LQ, a medição torna-se menos precisa. Uma concentração maior deve ser registrada para o LQ. O método analítico e seu respectivo uso ditam esse compromisso.

O limite de quantificação (LQ) pode ser estabelecido usando os mesmos critérios do LD, pelos métodos já citados acima, sendo que para LQ a relação sinal-ruído é 10:1 e pode ser expresso pela equação abaixo:

$$LD = 10 \times \frac{s}{S}$$

Equação 20

Onde:

s: é a estimativa do desvio padrão da resposta;

S: é a inclinação ou coeficiente angular do curva analítica

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, é apresentado o levantamento bibliográfico acerca de determinação de ácidos orgânicos em amostras de leite e derivados de leite. Aplicando técnicas voltamétricas, cromatográficas e eletroforese capilar.

Determinação analítica de ácidos orgânicos em leite e derivados de leite

Os métodos analíticos mais usualmente aplicados para determinação de ácidos orgânicos em derivados de leite são técnicas HPLC com detecção UV e eletroforese capilar (CE). Para HPLC, esses estudos têm sido realizados em uma variedade de comprimento de onda (210nm, 275nm), diversos tipos de colunas e fases móveis, com métodos isocráticos ou com gradiente, enquanto para a CE os parâmetros mais importantes para as análises são comprimento do capilar, tipo de capilar, composição e pH do eletrólito.

Muitas técnicas têm sido usadas para a determinação de ácido orótico em leite e sistemas biológicos. Incluindo a cromatografia de troca iônica, ensaios microbiológicos, colorimetria, calorimetria e métodos enzimáticos e métodos microbiológicos. O método colorimétrico é o mais freqüentemente usado para o leite.

Tormo *et al.*¹²⁸ desenvolveram um método por RP-HPLC alternativo, em relação a HPLC a coluna de troca iônica, para a determinação simultânea de 11 ácidos orgânicos, em produtos derivados de leite e mais comumente citados na literatura, incluindo ácidos oxálico, cítrico, fórmico, succínico, orótico, úrico, pirúvico, acético, propiônico, láctico e butírico. Os métodos que utilizam coluna de troca iônica enfrentam um problema: além de a coluna ser cara, eles operam em temperatura

altas, o que diminui a vida útil da coluna e freqüentemente existe o problema de sobreposição de picos ou co-eluição.

Izco *et al.*¹²⁹ propuseram um método por CE para a determinação simultânea de ácidos oxálico, cítrico, fórmico, succínico, orótico, úrico, pirúvico, acético, propiônico, láctico e butírico.

Ahmed *et al.*¹³⁰ determinaram ácido orótico em leite comparando métodos cromatográficos de troca iônica com o método calorimétrico. Ambos os métodos confirmaram a alta concentração de ácido orótico em leite bovino. Em seus resultados, foi encontrada pouca quantidade de ácido orótico em manteiga, leite de cabra e nenhuma quantidade em leite humano. O procedimento do método calorimétrico envolve a conversão de ácido orótico em ácido barbitúrico e subsequente formação de compostos coloridos com o p-dimetilaminobenzaldeído. O colorido derivado é extraído para um solvente não miscível em água e a absorbância do extrato é determinada em um comprimento de onda específico. A quantidade de ácido orótico varia entre 6 e 10mg/100mL. A variação destes valores está relacionada a diversos fatores que incluem a raça do animal, nutrição, estágio de lactação, tempo de aleitamento, aquecimento aplicado para tratamento e finalmente variação do método analítico. A identificação do ácido orótico foi adotado pelo procedimento de cromatografia gasosa com detecção em massa. As separações foram sobre as mesmas condições de GLC previamente descrita para a quantificação do ácido orótico, exceto que o gás hélio foi gás de arraste. O espectro de massa foi aplicado em 70 eV.

Larson *et al.*¹³¹ analisaram o ácido orótico no leite de 11 espécies ruminantes e não ruminantes. Os produtos analisados foram leite integral, desnatado, sorvete, queijos e iogurtes. A quantidade de ácido orótico de 16 produtos

comerciais derivados de leite foram dependentes da quantidade sólido solúvel no soro e durante o processo de fermentação. O ácido orótico existe como ânion orotato ($pK_a = 2,4$) em leite e seu produto consumível como parte do constituinte solúvel no soro. Os resultados dessas análises fornecem evidência de que o leite produzido por espécies ruminantes contém mais ácido orótico que leite de outras espécies; ácido orótico em produtos derivados de leite é dependente da quantidade solúvel no soro e do grau de fermentação.

Rea *et al.*¹³² estudaram a estrutura de seis kefires irlandeses e analisaram seis amostras em microscopia eletrônica, a composição microbiológica e cinética de fermentação durante crescimento em leite desnatado em 21°C. A composição microbiológica de seis amostras foi similar, no final da fermentação, mas os níveis de bactéria ácida láctica e lactobacilos mostraram diferenças entre as amostras. Lactato foi o maior metabólito seguido, nesta ordem, por etanol, acetato e acetoína. A concentração final de L-lactato produzido foi 10 vezes maior que D-lactato. Análise química de lactato, etanol, acetato, acetoína foi realizada em HPLC e citrato em método calorimétrico. As condições de análises coluna aminex HPX-87H, fase móvel 0,005mol L⁻¹ H₂SO₄, fluxo 0,6 mL min⁻¹, t=60 °C e detector índice de refração.

Saidi *et al.*¹³³ utilizaram um método baseado em HPLC e técnicas de par iônico para determinar a concentração de ácido orótico em leite de vaca. O ácido orótico no leite foi estável no aquecimento, mas diminuiu durante a fermentação para a produção de iogurte. Foram feitas relações entre a perda de ácido orótico e o aumento da diminuição do pH durante a fermentação. Devido à importância do ácido orótico na saúde humana, no crescimento necessário de alguns microrganismos e em outras aplicações, neste estudo foi conduzido para estabelecer a confiabilidade

da RP-HPLC para a determinação de ácido orótico, para a avaliação da estabilidade no aquecimento do leite, para a determinação cinética de ácido orótico e perda durante a fermentação para a produção comercial de iogurte.

Harta *et al*¹³⁴ avaliaram o uso de vários carboidratos para estudar a produção de biomassa do kefir em ordem para prever a possibilidade do efetivo uso da fabricação de alimento industrial, baixo custo de fabricação de kefir e seu possível uso como cultura iniciadora. Etanol, ácido láctico e açúcares residuais foram determinados por HPLC, usando um detector de índice de refração, água filtrada como fase móvel em fluxo de 0,8mL min⁻¹, temperatura de 60°C e usando coluna de troca iônica.

Witthuhn *et al*.¹³⁵ determinaram a concentração de ácido láctico em leite fermentado pelo kefir analisando diversas formas de material para armazenar o kefir. Foram utilizados três diferentes tipos de materiais para armazenar os grãos por um período de três meses. Foi avaliado se a liofilização de grãos de kefir e subsequente armazenamento em filme de polietileno de baixa densidade (LDPE), em filme de poliéster orientado (OPET) e em filme de poliéster orientado metalizado (MOPET), em temperatura ambiente, por um período de 3 meses, conduz a mudanças na estrutura microbiológica dos grãos. Foram avaliados o impacto de diferentes materiais na atividade dos grãos de kefir, três diferentes materiais e sua habilidade para reter a viabilidade e atividade dos grãos sobre um extenso período de armazenamento. O impacto de diferentes embalagens e condições de armazenamento na população microbiológica do kefir foi também determinado. Grãos de kefir foram liofilizados, embalados em três diferentes materiais incluindo LDPE, OPET e MOPET e armazenados por três meses em temperatura ambiente. Teste de atividade, incluindo pH, acidez titulável, quantidade de lactose e ácido

lático sobre 10 e 18h de período de fermentação foram usados para avaliar a atividade de acidificação dos grãos liofilizados. A quantidade de ácido lático aumenta com 18h de fermentação, mas progressivamente diminui sobre três meses de armazenamento. A produção de ácido lático foi significativamente preservada no filme OPET e MOPET sobre os três meses de armazenamento comparado ao filme LDPE. A quantidade de lactose foi determinada calorimetricamente com a medida de absorbância em 540nm com uso de espectrofotômetro e a quantidade de ácido lático foi medido enzimaticamente com uso de “kit de teste de combinação de ácido lático D- L+ .

Garrote *et al.*¹³⁶ compararam dois métodos para avaliar a preservação dos grãos de kefir, a fim de serem empregados como cultura iniciadora e de se avaliar a atividade metabólica dos grãos quando crescidos em leite após armazenamento. Foi avaliada a atividade metabólica de grãos armazenados em freezer -20 e -80°C e 4°C. Observaram que grãos armazenados em -20 e -80°C mantêm sua microflora e aumenta seu peso em uma velocidade comparável àquela encontrada quando grãos não estão armazenados. Leite fermentado obtido com os grãos de kefir em -20 e -80°C mostrou a mesma microflora, comportamento reológico, acidez e quantidade de dióxido de carbono como leite fermentado obtido com grãos não armazenados. Grão armazenado em 4°C não aumenta seu peso e produtos obtidos não têm a acidez e viscosidade do produto padrão. Armazenar em -20°C é um bom método para preservar grãos para fabricação de leite fermentado.

Tormo *et al.*³⁰ desenvolveram um método cromatográfico em fase reversa para análise de ácidos orgânicos derivados de produtos de leite com simples tratamento da amostra: um método por gradiente com tampão fosfato pH 2,20 e

acetonitrila para separar compostos na coluna C18. O método apresenta excelente linearidade, com $R > 0,999$, boa precisão ($RSD < 5\%$) e recuperação próxima de 100%.

Izco *et al.* (2002) ³¹ propuseram um método por eletroforese capilar para determinação simultânea, em menos de 18min, de 11 ácidos orgânicos metabolicamente importantes em produtos de leite e mais comumente citados na literatura. Devido à pouca absorbância, utilizou-se sistema de eletroforese capilar com detector de arranjo de diodo com dois canais com 32 posições de saída e entrada.

Izco *et al.* (2002) ¹³⁷ utilizaram a técnica de eletroforese capilar e desenvolveram um método para separar simultaneamente 11 ácidos (ácidos oxálico, fórmico, cítrico, succínico, orótico, úrico, acético, pirúvico, propiônico, láctico e butírico) e 10 aminoácidos (asparginina, glutamina, tirosina, glicina, alanina, serotonina, leucina, phe, lisina e tripsina e lactose) em produtos derivados de leite. Repetibilidade e linearidade foram calculados para cada composto com valor de limite de detecção tão baixo quando para $0,2 \times 10^{-1} \text{ mmol L}^{-1}$. Os métodos foram aplicados para analisar iogurte e diferentes variedades de queijo comercial. Este método forneceu um padrão específico para uma variedade de queijo. Foi um método bastante sensível para medir pequenas mudanças na composição de alguns daqueles compostos em queijo fresco armazenado sobre amadurecimento acelerado.

Mullin *et al.* ¹³⁸ desenvolveram um método por HPLC para determinação de ácidos orgânicos, açúcares e queijo. Desenvolveram uma coluna à base de resina que reduziu a necessidade de limpeza da coluna da amostra. Eles são muito menos susceptíveis à redução da eficiência da coluna devido à adsorção de co-extratos semelhantes a proteínas, peptídeos, lipídeos ou ácidos graxos livres. Foi

usado um detector de condutividade para análise de ácidos orgânicos. Este método não foi sensível a outros extratos, então foi utilizado um detector amperométrico de pulso, que foi específico para açúcar em baixas concentrações e em amostra de queijo, mas mostrou-se insensível a ácidos orgânicos.

Marsili *et al.*¹³⁹, aplicando um método por cromatografia de alta performance, analisaram quantitativamente ácidos orgânicos em produtos de leite. Foram usados uma coluna aminex HPX-87, em 65°C, fase móvel H₂SO₄ 0,009N e um detector UV em 220 e 275nm. Ácidos orgânicos foram quantificados em leite integral, leite desnatado em pó, manteiga, vários queijos e iogurte. A recuperação de ácidos, adicionados na proporção de 90% para leite integral, foi de 86%, exceto o butírico. A quantificação foi baseada nas medidas de altura de pico. Análises no modo isocrático em fluxo de 0,7 mL min⁻¹ e temperatura de 65°C.

Fernandez-Garcia *et al.*¹⁴⁰ desenvolveram um método para determinar de ácidos orgânicos durante a fermentação e refrigeração de iogurte. Utilizaram um método HPLC isocrático para separar e quantificar ácidos orgânicos. Dois métodos de extração foram comparados: acetonitrila e água e 0,01N de H₂SO₄, foi obtido uma recuperação de 90% para ácidos orótico, láctico, acético e propiônico para ambos os métodos. Recuperação de ácidos cítrico, pirúvico, úrico, butírico e hipúrico não foi satisfatória com o método acetonitrila, mas foram aceitáveis usando o procedimento de extração com H₂SO₄. Iogurtes foram fabricados sob condições laboratoriais, e amostras foram analisadas durante a fermentação e após armazenamento em 4°C. Amostras foram analisadas para pH e ácidos orgânicos e exibiram variação de aumento e de diminuição durante a fermentação e o armazenamento. Ácidos fórmico e butírico não foram detectados sob estas condições de estudo.

Anastasi *et al.*¹⁴¹ propuseram um novo método que emprega uma reação enzimática. Este método foi aplicado em padrão e então testado em amostra de leite. As mesmas amostras foram testadas por meio de um conhecido método espectrofotométrico. Este novo método analítico para a determinação de ácido orótico é confiável, os resultados são mais exatos e mais precisos, se comparados com os métodos usuais, espectrofotométrico e calorimétrico, e mostra a mesma sensibilidade. As análises calorimétricas são mais rápidas e mais fáceis, devido ao fato de que nenhum tratamento de amostra é necessário.

Zeppa *et al.*¹⁴² determinaram açúcares (lactose, glicose e galactose), ácidos não voláteis (cítrico, orótico, pirúvico, láctico, oxálico e hipúrico) e alguns ácidos graxos livres (fórmico, acético, propiônico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico) diacetil e acetoína foram separados em coluna aminex HPX-87H usando um método isocrático HPLC e identificando o tempo de retenção com detectores UV e índice refração. Com o propósito técnico é possível avaliar o desenvolvimento microbiológico e ao mesmo tempo o grau de amadurecimento do queijo.

Guzel-Seydim *et al.*¹⁴³ determinaram ácidos orgânicos e substâncias voláteis em kefir durante a fermentação. Essas substâncias foram medidas durante a fermentação de cultura iniciadora. Amostras foram coletadas em 0, 5, 10, 15 e 22h de fermentação 9 em pH= 4,6). Amostras foram analisadas para determinação de ácidos orgânicos utilizando o HPLC. A produção de acetaldeídos, etanol, acetoína e diacetil foi monitorada usando equipamento GC equipado com “headspace autosampler”. Níveis de ácido orótico, cítrico e pirúvico diminuiu ligeiramente durante a fermentação. O ácido hipúrico foi totalmente consumido por 15h de incubação. Ácidos propiônico, acético, butírico e diacetil não foram detectados. A produção de etanol começou após 5h de incubação, enquanto acetaldeído e acetoína

aumentaram durante a fermentação. As condições de trabalho foram HPLC equipado com coluna alltech IOA-100 coluna para ácidos orgânicos (300mm x 7,8mm) mantida a 65 °C. Fase móvel H_2SO_4 0,009N usando detector UV em 275nm. Volume de injeção 10 μL . Análise de GC-MS usada para verificar o pico de identificação somente solução padrão de acetaldeído, acetoína, diacetil etanol preparado com água deionizada.

Daniele *et al.*¹⁴⁴ utilizaram ultramicroeletrodo de platina (25 μm) para analisar a eletroatividade do leite. O leite, por ser um fluido heterogêneo complexo, pode ser usado com ultramicroeletrodo, que é capaz de analisar matrizes complexas. Portanto, foi possível determinar espécies eletroativas presentes no leite sem pré-tratamento. Constituintes típicos foram detectados e reprodutibilidade do processo estudado foi satisfatório com RSD abaixo (2%) e medidas com eletrodo convencional mostrou em desvio de 10%. Devido às características do UMEs, como aumento do transporte de massa associado com suas dimensões micrométricas, foi possível diagnosticar a formação de precipitado de fosfato cálcio na superfície do eletrodo como uma consequência de um processo eletródico CEC (do inglês Chemistry – Eletrochemistry – chemistry) em -0,920V vs SCE (eletrodo de calomelano saturado) envolvendo prótons liberados por H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} formado na reação de eletrodo e Ca^{2+} . Também foi estudada a redução de grupos de caseínas, a oxidação de ascorbato e efeitos de oxigênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 99- KISSINGER, P.T.; HEINEMAN, W.R. Cyclic voltammetry. J. Chem. Educ. v.60, p. 702 – 706, 1983
- 100- MALAGUTTI, ANDRÉA RENATA. Estudo eletroquímicos e desenvolvimento de metodologia para a determinação eletroanalítica de flavanóides. São Carlos, 2005. 198f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- 101- MABBOT, G.A. An introduction to cyclic voltammetry. J. Chem. Educ. v.60, p.697-902, 1983
- 102- SULIK, K.; AMATORE, C.; MARECK, V.; KUTNER, W. Microelectrodes. Definitions, characterization and applications. Pure Appl. Chem. v.72, p.1483-1492, 2000.
- 103- CORREIA, A. N.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A. Ultramicroeletrodos. Parte 1: Revisão teórica e perspectiva. Quim. Nova, v. 18, p.475-480, 1995.
- 104- WIGHTMAN, R.M.; WIPF, D.O. Voltammetry at ultramicroelectrodes. In: BARD, A. J. Electroanalytical Chemistry: series of advances. New York, Marcel Dekker, 1984. v.14, p.267-353.
- 105- BOND, A. M. FLEISCHMANN, M.; ROBINSON, J. J. Electroanal. Chem. v.168, p. 299, 1984.
- 106- MONTENEGRO, M.I.; QUEIRÓS, M. A.; DASCHBACH, J.L. Microelectrodes: Theory and applications. Dordrecht, Kluwer Academic, 1991. p.198.
- 107- SHOUTHAMPTON ELETROCHEMISTRY GROUP. Instrumental Methods in Electrochemistry. Weinheim: VCH, 1994, p.718.
- 108- WANG, J. Analytical Electrochemistry. New York. John Wiley & Sons, 2000, 206p.
- 109- BRETT, A.M.O. Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações. Coimbra: Oxford University Press, 1993. 471p.
- 110- DIOAGONE, CRISTINA APARECIDA. Aplicação da cromatografia líquida capilar (μ -LC) na separação de monoterpenos presentes em citrus. São Carlos, 1997. 108f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.
- 111- LANÇAS, F. M. Cromatografia em Fase Gasosa. São Carlos: Acta, 1993. 254p.
- 112- BROWN, P.R.; HARTWICK, R.A. High Performance Liquid Chromatography. New York. John Wiley & Sons Ltd, 1989. 98p.

-
- 113- DONE, J.N.; KNOX, J.H. The performance of packing in high speed liquid chromatography. J. Chromatogr. Sci , v.10, p.606-615, 1972.
- 114- HUBER, J.F.K. High efficiency, high speed liquid chromatography in columns. J. Chromatogr. Sci., v. 7, p.85-, 1969.
- 115- MEYER, V.R. Practical High-Performance Liquid Chromatography. New York: John Wiley & Sons Ltd, 1988. 43p.
- 116- LOUGH, W.J.; WAINER, I.W. High Performance Liquid Chromatography – Fundamental Principles and Practice. 2 ed. London, Chapman & Hall, 1996. 276 p.
- 117- TITATO, GUILHERME MIOLA. Comparação entre métodos de extração (LLE, SPE e SFE) e análise (LC e m-LC) na determinação de PAHS em águas. 1999. 103f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.
- 118- SMITH, R. M. Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 1988. 211 p.
- 119- JOHNSON, E. L.; STEVENSON, R. Basic Liquid Chromatography. 2ed. Palo Alto, Varian Associates, Inc, 1978. 8p.
- 120- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Quím. Nova, v.27, p. 771-780, 2004.
- 121- SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. Validação de métodos cromatográficos. Pharm. Technol. v.2, p.12-20, 1998.
- 122- BARROS NETO, B.; PIMENTEL, M.F.; Recomendação para calibração em química analítica – parte I. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). Quim. Nova. v. 25, p. 856-865, 2002.
- 123- CUSTÓDIO, R.; de ANDRADE, J.C.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas aos dados experimentais. Quim. Nova. v. 20, p. 219-225, 1997.
- 124- CHUI, Q.S.H.; ZUCCHINI, R.R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso; determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama. Quim. Nova. v.24, p. 374-380, 2001.
- 125- MILLER, J.C.; MILLER, J.N. Statistics for analytical chemistry, 3ª ed., Ellis Horwood: Chichester, 1993. 233p.
- 126- Internacional conference on harmonisation (ICH); Validation of analytical procedure: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/5), 1995.
- 127- Agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA): Resolução RE no 899, de 29/05/2003.

128- TORMO, M.; IZCO, J.M. Alternative reversed-phase high-performance liquid chromatography method to analyse organic acids in dairy products. *J. Chromatog. A*, v. 1033, p. 305-310, 2004.

129- IZCO, J.M.; TORMO, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Development of a CE method to analyze organic acids in dairy products: application to study the metabolism of heat-shocked spores. *J. Agric. Food Chem.* v. 50, p. 1765-1773, 2002.

130- AHMED ASHOUD AHMED, G. A. Porter e R.D. McCarthy. Isolation, Quantification, and Biosynthetic origin of orotic acid in milk. *J. Dairy Sci.* v. 61, p. 39-43, 1987.

131- LARSON, B.L.; HEGARTY, H.M. Orotic acid in milks of various species and commercial dairy products. *J. Dairy Sci.* v.62, p. 1641-1644, 1979.

132- REA, M. C.; LENNARTSSON, T.; DILLON, P.; DRINAN, F. D.; REVILLE, W. J.; HEAPES, M.; COGAN, E. T.M. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. *J. Appl. Bacteriol.* v. 81, p. 83-94, 1996.

133- SAIDI, B.; J.J. WARTHESEN. Analysis and stability of orotic acid in milk. *J. Dairy Sci.* v. 72, p. 2900-2905, 1989.

134- HARTA, O.; ICONOMOPOULOU, M. BEKATOROU, I.; A; NIGAM, P.; KONTOMINAS, M.; KOUTINAS, A. A.. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chem.* v. 88, p. 237-242, 2004.

135- WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, E. T.J.. Isolation and characterization of the microbial population of different South. *Food Microbiol.* v. 22, p. 337-344, 2005.

136- GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A; ANTONI, G.L. de. Preservation of kefir Grains, A comparative study. *Lebensm. -Wiss.u. -Technol.* v. 33, p. 77-84, 1997.

137- IZCO, J.M.; TORMO, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Rapid simultaneous of organic acids, free amino acids, and lactose in cheese by capillary electrophoresis. *J. Dairy Sci.* v. 85, p. 2122-21290, 2002.

138- MULLIN, W.J.; EMMANS, D.B. Determination of organic acids and sugar in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Res. Int.* v. 30, p.147-151, 1997.

139- MARSILI, R.T.; OSTAPENKO, H.; SIMMONS, R.E.; GREEN, D.E. High Performance Liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *J. Food Sci.* v. 46, p. 52-57, 1981.

140- FERNANDEZ-GARCIA, E.; MCGREGOR, J.U. Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yogurt. J. Dairy Sci. v. 77, p. 2934-2939, 1994.

141- ANASTASI, G.; ANTONELLI, M.L.; BIONDI, A.; VINCI, G. Orotic acid: a milk constituent enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method. Talanta . v. 52, p. 947-952, 2000.

142- ZEPPA G.; CONTERNO, L.; GERBI, V. Determination of organic. Acids, sugar, diacetyl, and acetoin in cheese by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. v. 49, p. 2722-2726, 2001

143-.GUZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A.C.;GREENE, A.K.; BODINE,A.B. Determination of organic acids and volatile flavor substances inkefir during fermetantion. J. Food Comp. Anal., v. 13, p. 35-43, 2000.

144- DANIELE, S; BALDO, M. A.; UGO, P.; MAZZOCCHIN,G.A. Voltammetric probe of milk samples by using a platinum microelectrode. Anal. Chim. Acta. v. 238, p. 357-366, 1990.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Eletroquímica

As medidas eletroquímicas foram realizadas em Analisador Polarográfico PAR modelo 174AR acoplado a um microcomputador IBM-PC para coletar os voltamogramas, usando software AVOLM, e as medidas de pH em pH-metro da ANALION 608. Quando necessário, foi utilizado nitrogênio de procedência White Martins para desaerar as soluções. Como eletrodo de trabalho foi usado um ultramicroeletrodo (UME) de ouro de (10 μm) de diâmetro, platina (25 μm) e cobre (50 μm) e como eletrodo de referência o eletrodo de Ag/AgCl saturado, em célula de dois eletrodos.

3.1.1. Eletrodos

Os ultramicroeletrodos de Pt, Cu e Au quando fabricados foram selados diretamente no vidro. Antes de cada medida, os eletrodos foram polidos em lixas e alumina. O eletrodo de referência usado foi o eletrodo saturado de Ag/AgCl. A célula foi configurada para uso de dois eletrodos.

3.1.2. Voltametria cíclica usando ultramicroeletrodo (UMEs)

O UMEs têm ganhado cada vez mais interesse na química analítica devido às suas vantajosas propriedades, tais como baixa queda ôhmica e elevada relação corrente faradaica/corrente capacitiva, que permite serem estes eletrodos empregados em condições não convencionais, possibilitando estudos eletroquímicos de sistemas redox na ausência de eletrólito de suporte^{145, 146}.

3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento Shimadzu, com bombas binárias, detector em 210 nm operado com um software ClassVP 5032. A separação foi realizada em coluna C18 (StrodsII Peek) 250mm x 4,6 mmID, 5 μ m. A fase móvel (FM) foi composta de tampão fosfato $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ 20 mmol L^{-1} ajustado com ácido fosfórico a pH 2,20 contendo 1% de acetonitrila (ACN), como fase aquosa e ACN (fase orgânica); usando uma vazão de 0,9 mL min^{-1} . O volume de amostra injetado foi de 20 μ L. A temperatura usada na análise foi mantida a 35 °C que é importante para garantir a repetibilidade dos tempos de retenção.

Para a extração dos ácidos das amostras analisadas, um grama da amostra do leite fermentado foi diluído em 10 mL de ácido sulfúrico 4,5 mmol L^{-1} a qual foi vigorosamente agitada e misturada com um vortex. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min em uma centrífuga Refrigerated Centrifuge Himac CR20B2 Hitachi. Em seguida foi feito um procedimento de “clean-up” da amostra através da técnica de extração de fase sólida (SPE). Estas amostras foram usadas tanto nas análises por HPLC como para as medidas eletroquímicas.

3.2.1. Técnica de Extração em Fase Sólida (SPE)

Na extração em fase sólida o sorvente é colocado num tubo de polipropileno entre dois discos de polietileno, compactando esta fase.

Essa técnica de separação líquido-sólido é baseada nos mecanismos de separação da cromatografia clássica. Do ponto de vista prático, a SPE comporta-se como uma cromatografia líquida, empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho de extração, a qual contém a fase sólida. A solução contendo o analito de interesse é colocada no topo superior do cartucho e

aspirada com um pequeno vácuo ou pressionada levemente com uma seringa de forma a penetrar no cartucho. Após a fase líquida ter sido drenada, o analito retido é eluído com um pequeno volume de solvente de forma a coletar-se o analito em sua concentração já apropriada para análise¹⁴⁷.

3.2.2. Metodologia da Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida é uma das ferramentas mais poderosas e mais empregadas para a extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas. A extração de fase sólida emprega sorventes recheados em, cartuchos, nas formas de seringa, e os mecanismos de retenção são idênticos aqueles envolvidos em cromatografia líquida em coluna. Um cartucho típico é formado por um tubo de prolipropileno contendo cerca de 500 mg¹⁴⁸.

Os procedimentos de extração em fase sólida contêm as seguintes etapas: ativação do adsorvente, condicionamento, aplicação da amostra, remoção de interferentes "*clean-up*" e de água, eluição dos analitos adsorvidos.

Ativação do adsorvente: serve para deixar os sítios ativos disponível. Nesta etapa, o objetivo é assegurar o maior contato possível da fase líquida com a fase sólida (adsorvente hidrofóbicos). isto pode ser realizado pela passagem através da coluna ou cartucho de extração de uma certa quantidade de solvente orgânico apropriado.

Condicionamento do cartucho: é feito com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra. No procedimento dessa etapa, o solvente de ativação é removido com água para se obter um meio apropriado para a adsorção da amostra aquosa. É importante observar que, lavando com excesso pode produzir uma insuficiente secagem do adsorvente e, assim, reduzir a recuperação³.

Introdução da amostra: o volume da amostra aquosa deve ser escolhido em relação ao adsorvente utilizado e a concentração total do analito. Para prevenir a perda do analitos menos retidos, o volume da amostra e o fator de pré-concentração devem ser pequenos. Para se obter fatores de pré-concentração maiores, perdas de analitos com baixo valores de k (fator de retenção) são inevitáveis. Para resolver este problema, vários absorventes com seletividade e polaridades diferentes podem ser usados.

Limpeza do cartucho: importante para retirar os interferentes menos retidos que o analito.

Remoção de água: A água pode ser removida através de um fluxo de ar (com pressão positiva ou negativa) ou por um fluxo de nitrogênio. A remoção de água simplifica o passo de desorção dos analitos. Porém, a secagem total da coluna pode, algumas vezes, causar a diminuição na recuperação dos compostos analisados.

Remoção/Eluição dos analitos adsorvidos: em métodos de tipo "off-line", os analitos podem ser eluídos com um único solvente ou uma mistura de solventes. Nestes casos, a eluição é, geralmente, realizada através da passagem pelo cartucho de SPE de uma fase móvel apropriada, usando uma pressão negativa (vácuo) ou positiva (bomba seringa). Em métodos de tipo "on-line", a eluição é feita através da fase móvel proveniente do sistema de análise.

3.3. Cultivo do grão kefir em leite

Na preparação de kefir tradicional, uma cultura iniciadora foi produzida a partir de grãos de kefir. Os grãos de kefir foram adicionados ao leite e incubados com agitação de 100 rpm a 24-26 °C até o pH atingir valor entre 4,5 - 4,6. Após

incubação, os grãos de kefir foram removidos via peneira e foram reusados em subsequente preparação da cultura iniciadora¹⁴⁹. O leite utilizado neste trabalho foi o leite integral marca Parmalat.

3.4. Obtenção de polissacarídeo de kefir

O polissacarídeo de grãos de kefir foi obtido pelo rompimento de aproximadamente 20g de grãos em 200 mL de água destilada quente em um homogeneizador (Ultrassom Thorton) por 10 min. Em seguida foi feita a centrifugação em velocidade de 4000 rpm por 10 min. Após a centrifugação em “Refrigerated Centrifuge” Himac CR20B2 Hitachi, separaram-se células e fragmentos. O polissacarídeo foi precipitado a partir de um sobrenadante viscoso pela adição 150 mL de etanol e foi redissolvido em água quente. A precipitação com etanol foi repetida para purificar o kefirano. Após três semelhantes etapas de precipitação, nova purificação foi obtida pelo congelamento de uma solução 2% de kefirano seguida do descongelamento em temperatura ambiente¹⁵⁰.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

145- FLEISCHMAN, M.; PONS, S.; ROBSON, D.R; SCHMIDT, P.P. Ultramicroelectrodes. Datatech, Mergantown, 1987.

146- DANIELE, S.; BALDO, M.A.; UGO, P.; MAZZOCCHIN, E. Voltammetric probe of milk sample by using a platinum microelectrode. *Anal. Chim. Acta*, v. 238, p. 357-366, 1990.

147- TITATO, GUILHERME MIOLA. Comparação entre métodos de extração (LLE, SPE e SFE) e análise (LC e m-LC) na determinação de PAHS em águas. 1999. 103f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1999.

148- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C .H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova*, v.24, p.68-76, 2001.

149- FERNANDES-GARCIA, E.; MCGREGOR, J. U. Determination of Organic Acids During the Fermentation and Cold Storage of Yogurt. *J. Dairy. Sci.* v.77, p.2934-2939, 1994.

150- SHIOMI, M.; SASAKI,M.M.; AIBARA, K. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* v.35, p.75-80, 1982.

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo do pH do leite e do leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet

A influência do processo de acidificação com o tempo é mostrada na Figura 10. Foi observada diminuição no valor de pH durante o período de fermentação de 12 h para as duas espécies de grãos tibet e kefir analisadas, quando inoculadas no leite. O valor médio de pH do leite integral antes da inoculação com grãos de kefir foi de 6,7. O pH diminui progressivamente até completar a fermentação. Durante todo o processo de fermentação houve variação no valor de pH até que fosse atingido um valor de pH 4,5 para a espécie kefir. Segundo a literatura, para um determinado valor de pH há predominância de algumas bactérias durante o processo de fermentação para os grãos de kefir, ou seja, o pH favorece ou não o crescimento de determinada espécie de microrganismos e um valor de pH menor que 4,5 não é aconselhável para manter a integridade da microflora do kefir. Conforme citado na introdução deste trabalho, durante a fermentação há ativação de uma microflora muito diversificada, e isto é função do pH. Como, por exemplo, a presença de *Lactococcus* alcança níveis maiores na metade da fermentação e atinge níveis menores no final. Já os *Leuconostocs* crescem mais lentamente que *Lactococcus* atingindo uma quantidade 10 vezes mais baixa, mesmo no final da fermentação. O estudo citado por Rea et al. (1996)¹⁵¹ mostra que os *Lactococcus* no leite fermentado foram sensíveis a pH baixo, mas isso não afeta o lado interno do grão. Segundo a literatura, é possível que a matriz do grão exerça um efeito protetor nas células de *Lactococcus*. Estes resultados sugerem que, em condições de pH muito baixo, ocorra inibição tanto da produção de polissacarídeos como do crescimento de células de *Lactococcus* no leite. Diante destas informações finalizou-se a medida de pH até que

fosse atingido valor de pH 4,5, no intuito de manter a integridade da microflora e, por consequência, de seus produtos.

Figura 10 - Estudo do pH do leite integral (□), leite na presença de grão do Tibet (●) e grão Kefir (▼), durante tempo de 12 h. Massa de grão do Tibet 5,46g e massa de grão Kefir 5,46g em volume de 100 mL de leite

Os ácidos orgânicos são formados no leite durante a fermentação quando os grãos de kefir são inoculados no leite. Estes ácidos ocorrem em produtos de leite como um resultado da hidrólise de ácidos graxos, adição direta de acidulantes (ácidos cítricos, lácticos e propiônico) e processo metabólico bioquímico bovino normal (ácidos hipúrico, láctico, úrico e ascórbico). A determinação quantitativa desses ácidos em produtos do leite é importante no estudo do sabor, por razões nutricionais e como um indicativo de atividade bacteriana¹⁵². Os ácidos orgânicos são particularmente importantes para as propriedades finais de alimentos processados. Estes são significativos na preservação natural e para avaliar características sensoriais dos produtos¹⁵³. Os ácidos orgânicos que ocorrem em produtos do leite, como resultado da hidrólise, também informam sobre o

metabolismo bacteriano¹⁵⁴. Daí a importância do monitoramento do pH para avaliar qualitativamente a presença desses ácidos no leite.

Além dos ácidos orgânicos formados pelo processo metabólico da microflora dos grãos de kefir e do Tibet, outros compostos são formados, e estes estão relacionados também com a atividade antimicrobiana das bactérias ácidas lácticas. A atividade antimicrobiana das bactérias ácidas lácticas não está restrita aos principais produtos de sua função metabólica (os ácidos orgânicos). Ele depende também das condições de crescimento. O leite apresenta alguns ácidos orgânicos e o processo de fermentação produz outros compostos, que podem, além dos ácidos orgânicos, mostrar resposta nos eletrodos. Dentre esses compostos encontram-se os produtos formados no catabolismo celular (peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído, D-leucina), as enzimas bacteriolíticas, as bacteriocinas e outras substâncias como a reuterina e as antifúngicas¹⁵⁵.

4.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente utilizada para os estudos de eletroatividade de compostos orgânicos. Neste trabalho estudos preliminares de voltametria cíclica foram realizados a fim de se investigar processos redox, que ocorrem no leite e no leite fermentado pelos grãos de kefir e tibet, analisados sobre a superfícies dos UMEs de platina e ouro.

4.2.1. Teste de eletroatividade de compostos presentes no leite e leite fermentado em UMEs.

4.2.1.1. Ultramicroeletrodo de Platina ($d = 25 \mu\text{m}$)

O estudo preliminar da reação de oxidação dos ácidos orgânicos presentes no leite e no leite fermentado pelos grãos de kefir e do tibet consistiu em avaliar a

resposta voltamétrica nos ultramicroeletrodos de ouro e platina, com intuito de se determinar qual dentre os dois eletrodos apresentasse melhor sinal analítico para se fazer os estudos voltamétricos dos produtos formados na fermentação.

O leite é um fluido heterogêneo e complexo contendo muitos componentes em dispersão. Quando usado como solvente para estudos de processos eletroquímicos, algumas espécies eletroativas presentes no leite mostram propriedades principalmente em solução aquosa¹⁵⁶.

Inicialmente foi realizado teste de caracterização do eletrodo e em seguida análises das amostras. A Figura 11 mostra um perfil voltamétrico de formato sigmoidal para um sistema usualmente conhecido para uma solução de $K_3(FeCN)_6$ 1 mmol L⁻¹ em H₂SO₄ pH 2,3 para UME de Pt. A sigmoidal reflete um comportamento característico de UMEs indicando ausência de infiltração por trincas entre o metal e o vidro e as boas condições de pureza do eletrólito. Quando o UME é aliado à voltametria cíclica, o perfil voltamétrico obtido é uma curva sigmoidal e a corrente máxima é chamada de corrente-limite, devido à alta velocidade de difusão das espécies em função da contribuição esférica predominante nos UMEs.

Esta caracterização do UME de Pt foi realizada para testar o bom funcionamento do eletrodo e comparar com trabalhos já citados na literatura. O UME de Pt mostrou um perfil voltamétrico característico e concordante com diversos trabalhos.

Figura 11 - Voltamograma cíclico de caracterização do eletrodo de platina em solução ácida de $K_3(FeCN)_6$ 1 mmol L^{-1} em H_2SO_4 pH 2,3 em velocidade de 5 mV s^{-1} .

A Figura 12 mostra um voltamograma cíclico obtido com um UME de disco de platina em baixa velocidade de varredura de uma amostra de leite integral bovino. A região catódica mostra um pico de redução localizado em -850 mV , enquanto a região anódica mostra somente uma pequena onda que é caracterizada por um potencial de meia onda de -700 mV .

Figura 12 - Voltamograma cíclico de uma amostra de leite obtido utilizando-se um UME de Pt ($d = 25 \mu m$) a $10 mV s^{-1}$.

O ultramicroeletrodo de platina ($25 \mu m$) foi utilizado para analisar a eletroatividade do leite. O leite, por ser um fluido heterogêneo complexo, e o ultramicroeletrodo, ter capacidade de analisar matrizes complexas, permitiu a dispensa de pré-tratamento. Portanto, foi possível determinar espécies eletroativas presentes no leite sem pré-tratamento. Devido às características do UMEs, como aumento do transporte de massa associado com suas dimensões micrométricas, foi possível diagnosticar a formação de precipitado de fosfato cálcio na superfície do eletrodo como uma consequência de um processo eletródico. O mesmo resultado foi obtido por Daniele et al. utilizando um UME de Pt e eletrodo de referência de calomelano saturado. Nesses estudos foi identificado o processo eletródico CEC (do inglês Chemistry – Eletrochemistry – chemistry) em $-920 mV$ vs SCE (eletrodo de calomelano saturado) envolvendo prótons liberados por $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} formado na reação de eletrodo e Ca^{2+} . Também foi estudada a redução de grupos de caseínas, a oxidação de ascorbato e efeitos de oxigênio¹⁵⁷.

A Figura 13 mostra o voltamograma cíclico do leite fermentado pelo grão de kefir, este voltamograma mostrou-se mais alongado quando comparado com o perfil obtido com o leite. Esta diferença é atribuída provavelmente ao baixo valor de pH do meio, que foi originado pelo metabolismo bioquímico do grão de kefir, que pela formação de ácidos orgânicos, acarreta a redução no valor de pH. Também foi observada uma dependência entre o pH e a corrente de pico, o que sugere que as espécies responsáveis pelo pico I (Figura 12) podem ser os ácidos orgânicos, produzidos na fermentação por essas espécies de grãos. A corrente de pico obtida para a amostra de leite foi 45 nA (Figura 12), enquanto que para a amostra de leite fermentado foi de 50 nA (Figura 13).

Figura 13 - Voltamograma cíclico de uma amostra de leite fermentado pelo grão de kefir utilizando UME de Pt (25 μ m) a 10 mV.s^{-1} .

4.2.2 Variação da velocidade de varredura do leite e leite fermentado em UME de ouro.

A variação da velocidade de varredura de potencial foi estudada em uma faixa de 20 a 200 mV s^{-1} , para verificar a irreversibilidade do sistema eletroquímico. As Figuras 14, 15 e 16 mostram que os ácidos orgânicos oxidam-se em potencial 1120 mV, e até a velocidade de 200 mV s^{-1} não foram observados picos de varredura reversa de potencial indicando a irreversibilidade do processo de oxidação nas condições estudadas. Os parâmetros eletroquímicos I_p e E_p para o pico de oxidação foram extraídos dos voltamogramas cíclicos e são mostrados nas Tabelas 8, 9 e 10, para as amostras de iogurte comercial e leites fermentados pelos grãos kefir e do Tibet, respectivamente. Para tanto foram feitos estudos da variação da velocidade de varredura(?) de 20 a 200 mV s^{-1} .

Com o aumento da velocidade de varredura, os potenciais de pico deslocam-se para valores mais positivos, o que é característico de processos irreversíveis, em que o potencial de pico depende da velocidade de varredura.

Para todas as amostras estudadas, observou-se uma dependência linear entre a corrente de pico (I_p) e a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Foi verificada uma boa linearidade das curvas indicando que as correntes de pico são limitadas por difusão das substâncias analisadas (vide Figuras 14, 15 e 16). Os gráficos de I_p vs $v^{1/2}$ dão informações sobre o tipo de transporte de massa e informam também se o processo é controlado por difusão ou adsorção. Se a relação entre I_p vs $v^{1/2}$ for linear, o processo é adsorptivo, se a relação não for linear, o processo é difusional.

Figura 14 – (A): Voltamogramas cíclicos em solução 4,5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄ contendo 8g de amostra comercial de iogurte utilizando UME de ouro ($\varphi = 10 \mu\text{m}$) em diferentes velocidades. Velocidades (a) 20; (b) 50 (c) 100 e (d) 200 mV s⁻¹; (B): curva I_p vs. v e (C): curva I_p vs. $v^{1/2}$.

Figura 15 – (A): Voltamogramas cíclicos em solução $4,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de H_2SO_4 contendo 8 g de amostra de leite fermentado pelo grão de kefir utilizando UME de ouro ($r = 10 \text{ }\mu\text{m}$) em diferentes velocidades. Velocidades (a) 20; (b) 50 (c) 100 e (d) 200 mV s^{-1} ; (B): curva I_p vs. v e (C): curva I_p vs. $v^{1/2}$.

Figura 16 – (A): Voltamogramas cíclicos em solução 4,5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄ contendo 8g de amostra de leite fermentado pelo grão de tibet utilizando UME de ouro ($r = 10 \mu m$) em diferentes velocidades. Velocidades (a) 20; (b) 50 (c) 100 e (d) 200 $mV s^{-1}$; (B): curva I_p vs. ν e (C): curva I_p vs. $\nu^{1/2}$.

Tabela 8 – Valores de i_p e E_p para pico de oxidação dos voltamogramas cíclicos de leite fermentado pela amostra comercial de iogurte em H_2SO_4 4,5 mmol L⁻¹ variando a velocidade de varredura em UME de ouro ($r = 50\mu m$).

$v / mV s^{-1}$	i_p / nA	E_p / mV
20	0,81	1095
50	1,46	1110
100	1,94	1130
200	2,74	1142

Tabela 9 – Valores de i_p e E_p para pico de oxidação dos voltamogramas cíclicos de leite fermentado pelos grãos de kefir em H_2SO_4 4,5 mmol L⁻¹ variando a velocidade de varredura em UME de ouro ($r = 50\mu m$).

$v / mV s^{-1}$	i_p / nA	E_p / mV
20	0,94	1095
50	1,77	1116
100	2,78	1132
200	4,07	1149

Tabela 10 – Valores de i_p e E_p para pico de oxidação dos voltamogramas cíclicos de leite fermentado pelos grãos de tibet em H_2SO_4 4,5 mmol L⁻¹ variando a velocidade de varredura em UME de ouro ($r = 50\mu m$).

$v / mV s^{-1}$	$i_p (1) / nA$	$E_p (1) / mV$	$i_p (2) nA$	$E_p (2) mV$
20	0,10	714	0,79	1093
50	0,19	7330	1,39	1121
100	0,31	800	1,69	1138
200	0,44	812	2,59	1150

Em uma reação eletroquímica, o tipo de transporte de massa pode ser conhecido também por meio dos gráficos de $\log(I)$ vs $\log(\nu)$. Como citado pela literatura, o valor do coeficiente angular dos gráficos $\log(I)$ vs. $\log(\nu)$ para processos controlados por adsorção é igual a 1 e, para aqueles controlados por difusão, é igual a 0,5. As inclinações dos gráficos das Figuras 17, 18 e 19, para as amostras analisadas, foram: $\alpha_{\text{iogurte}} = 0,46$; $\alpha_{\text{kefir}} = 0,22$; $\alpha_{\text{tíbet}} = 0,45$. Estes valores informam que o transporte de material eletroativo para a superfície do UME de Au, na concentração estudada, dá-se por difusão, pois os valores estão próximos de 0,50, conforme é citado na literatura para esse tipo de processo, e também valores intermediários indicam que o processo é difusional, para o caso do kefir, que mostrou valor de α igual a 0,22.

Figura 17 – Curvas do logaritmo da corrente de pico anódica (I_{pa}) em função do logaritmo da velocidade de varredura para o grão de kefir

Figura 18 - Curvas do logaritmo da corrente de pico anódica (I_{pa}) em função do logaritmo da velocidade de varredura para o grão de tibet

Figura 19 - Curvas do logaritmo da corrente de pico anódica (I_{pa}) em função do logaritmo da velocidade de varredura para amostra comercial de iogurte Mix Vigor.

4.2.3. Variação da concentração de leite fermentado em H_2SO_4 4,5 mmol L^{-1} em eletrodo de ouro.

A resposta voltamétrica para oxidação de ácidos orgânicos foi estudada usando a voltametria cíclica. As Figuras 20, 21 e 22 mostram os voltamogramas cíclicos obtidos para amostras de leite fermentados pelos grãos do Tibet, iogurte comercial e pelo grão kefir, respectivamente, realizados usando o UME de ouro. Nessas Figuras, foram observados os picos de oxidação na faixa de 650 mV a 1500 mV e nenhum pico de redução foi observado nas condições estudadas. Isso indica que os ácidos orgânicos são irreversivelmente oxidados¹⁵⁸. Na Figura 20, para a amostra de 8 g de leite fermentado pelo grão do Tibet, foram observados três picos ($E_1=800$ mV (III), $E_2=1130$ mV (II) e $E_3=1330$ mV (I)), e a amostra de iogurte comercial apresenta três picos ($E_1 = 700$ mV (I), $E_2=1130$ mV (II) e $E_3=1280$ mV(III), ver a Figura 21, enquanto o leite fermentado pelo grão kefir mostra dois picos ($E_1=1130$ (II) mV e $E_2=1330$ mV (I), conforme a Figura 22,. Na Figura 20, observou-se que a corrente de pico aumentou linearmente no intervalo de 1 a 8 g mL^{-1} com o aumento da concentração do ácido orgânico presente no leite fermentado pelo grão do Tibet ($r=0,998$). Esses picos observados no mesmo valor de potencial demonstram que as amostras de leite fermentados pelos grãos kefir e tibet e amostra de iogurte contêm os mesmos ácidos e portanto a mesma espécie eletroativa (vide Figura 23).

Figura 20 – (A): Voltamograma de varredura linear para amostra de leite fermentado pelo grão do tibet utilizando UME de ouro ($r = 10\mu\text{m}$) 100 mV s^{-1} e (B): Corrente de pico vs. concentração.

Figura 21 – (A): Voltamograma de varredura linear para a amostra de iogurte comercial, utilizando UME de ouro de. $\varphi = 10\mu\text{m}$ a 100 mV s^{-1} e (B): Corrente de pico vs. concentração.

Figura 22 – (A):Voltamograma de varredura linear utilizando UME de ouro de amostra de leite fermentado pelo grão do kefir. $v = 10\mu m$ em $100 mV s^{-1}$ e (B): Corrente de pico vs. concentração.

Figura 23- Voltamogramas de varredura linear em solução 4,5 mmol L⁻¹ de H₂SO₄ contendo 8g de amostras de iogurte comercial, de leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet, utilizando UME de ouro ($\varnothing = 10\mu\text{m}$) a 100 mV s⁻¹.

4.2.4 Teste de Eletroatividade de Polissacarídeo kefirano em UMEs

4.2.4.1 Polissacarídeos detectados em ultramicroeletrodo de cobre ($\varnothing=50\mu\text{m}$)

O perfil voltamétrico do ultramicroeletrodo de Cu em solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH foi examinado registrando-se voltamograma na região de potencial entre -1000 mV e +1000 mV em velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹. E os resultados mostram que os picos na Figura 24(A) podem ser atribuídos aos vários estágios de oxidação do cobre em solução alcalina, como citados na literatura^{159, 160}. Uma onda anódica em -600 mV tem sido atribuída a adsorção de oxigênio. E uma onda anódica em -400 mV corresponde à oxidação de cobre metálico ao seu primeiro estado de oxidação, Cu(I). A oxidação desta espécie foi produzida até aproximadamente em -150 mV, onde nenhuma outra onda anódica foi observada¹⁶¹. A oxidação de cobre metálico, Cu(I) e Cu(II) foi observada em 50 mV, enquanto Cu(II) foi oxidado a Cu(III) próximo de 650 mV. A varredura catódica mostrou

correntes correspondentes à redução de Cu(III) a Cu(II), Cu(II) a Cu(I) e Cu(I) a cobre metálico em +600 mV, -500 mV e -800 mV, respectivamente¹⁶². A Figura 24(D) mostra o voltamograma para uma solução obtida de uma massa de polissacarídeo kefirano de 0,36 g dissolvida em 10 mL de NaOH 0,1 mol L⁻¹. Em um intervalo de potencial de -1000 a 800 mV, uma pequena onda demonstra provavelmente presença de carboidratos (a glicose ou galactose), o que é confirmado no voltamograma da Figura 24(B) e (C), o qual mostra um perfil de uma solução de glicose e galactose 1 mmol L⁻¹, respectivamente, que se assemelha ao obtido para o polissacarídeo do grão de kefir, na Figura 24D.

Figura 24 – Voltamograma cíclico obtido com eletrodo de cobre ($\varphi = 50 \mu\text{m}$) a 50 mV s^{-1} para: (A) solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹; (B) solução de galactose 1 mmol L⁻¹ em NaOH 0,1 mol L⁻¹; (C): solução de glicose 1 mmol L⁻¹; (D) solução de 0,36 g de polissacarídeo do grão de kefir em 10 mL em NaOH 0,1 mol L⁻¹ em velocidade de 50 mV s^{-1} .

O uso do eletrodo de cobre para determinar carboidratos^{163, 164} é um exemplo adequado no qual a escolha de um substrato apropriado exige critérios, pois carboidratos e aminoácidos mostram uma marcante reatividade na superfície de cobre. A oxidação de cobre em meio alcalino resulta na formação de uma camada de óxido de cobre insolúvel^{165, 166}. A presença de um analito capaz de complexar íons cobre serve para aumentar a solubilidade dessa camada. Isto induz à dissolução do substrato de cobre com o correspondente aumento na corrente oxidativa informando a quantidade de analito presente¹⁴. As Figuras 25(A) e (B) mostram a eletroatividade do UME de cobre, para uma solução padrão glicose e para o kefirano, respectivamente. Nessas Figuras é mostrado um perfil semelhante, comprovando, assim, voltametricamente, a formação de glicose pelo grão de kefir. É observada uma pequena diferença nestes perfis que deve ser, provavelmente atribuída a presença de galactose também presente no kefirano.

Figura 25 - Voltamograma cíclico obtidos com eletrodo de cobre ($A = 50 \mu\text{m}^2$), para: (A) solução padrão de glicose e (B): polissacarídeo de kefir em velocidade de 50 mV s^{-1} em diferentes quantidades de massa 0,09; 0,18; 0,32 e 0,72g em 10 mL de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.2.4.2 Polissacarídeos detectados em ultramicroeletrodo de ouro ($d = 10 \mu\text{m}$).

Um voltamograma cíclico do eletrodo de ouro em uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, é mostrado na Figura 26. A forma desse voltamograma é bem conhecida com formação de óxido de ouro em corrente máxima obtida numa faixa de potencial de 300 a 600 mV e a redução da camada de óxido em uma corrente máxima por volta de 100 mV. Estes processos são bem conhecidos e têm uma importante função para análises posteriores, pois, antes de cada nova análise, a integridade da superfície do eletrodo foi checada.

Figura 26 – Perfil voltamétrico de eletrodo de ouro em uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em a 100 mV s^{-1} .

A oxidação eletroquímica de açúcares tem sido estudada extensivamente há décadas ¹⁶⁷. E o eletrodo de ouro tem mostrado uma interessante atividade para oxidação de açúcares, principalmente a glicose em meio neutro ou alcalino¹⁶⁸. Estudos da eletrooxidação de muitos açúcares semelhantes à lactose¹⁶⁹, frutose, sacarose¹⁷⁰, têm indicado o ouro como o melhor catalisador para a oxidação de

açúcar. Foi mostrado que o ouro apresenta uma alta atividade catalítica para a oxidação de álcoois em meio alcalino¹⁷. Além disso, este metal nobre envenena menos que a platina, permitindo assim a obtenção de mais alta densidade de corrente.

A voltametria cíclica foi usada para comparar a reatividade de duas soluções-padrão de glicose e galactose com o polissacarídeo kefirano produzido pelo kefir (composto de glicose e galactose, em igual quantidade), utilizando eletrodo de ouro. Foi também investigada a eletroatividade deste polissacarídeo produzido pelo kefir. Inicialmente foi feita a voltametria cíclica de solução-padrão de glicose e galactose em eletrodo de ouro, mostrada nas Figuras 27 (A) e (B). Estes voltamogramas representam a oxidação de 52 mmol L⁻¹ de glicose e 100 mmol L⁻¹ de galactose, respectivamente, em eletrodo de ouro. E foram observados cinco picos, três de oxidação, denominados I, II, III obtidos durante a varredura positiva de potencial, e dois denominados IV e V, originados pela varredura negativa de potencial. O pico III corresponde a uma fraca oxidação de glicose e galactose obtido durante a formação de uma camada de oxigênio, e o pico IV aparece logo que as espécies oxigenadas são reduzidas.

Figura 27 - Voltamograma de varredura linear de solução de (A): glicose 52 mmol L⁻¹ e (B) galactose 100 mmol L⁻¹ (NaOH 0,1 mol L⁻¹) em eletrodo de ouro, $v=100$ mV s⁻¹.

A Figura 28 mostra resultados obtidos de solução de polissacarídeos dos grãos de kefir preparada em solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH. Pode-se verificar que a corrente de pico aumentou de forma proporcional ao aumento das massas de polissacarídeo em solução (0,05, 0,1, 0,2 e 0,5g). Este resultado está de acordo com o obtido para uma amostra comercial de complexo Ca-galactonato¹⁷¹ (galactonato é a forma oxidada da galactose), em que é mostrada uma corrente de pico no mesmo valor de potencial em torno de 300 mV, confirmando uma resposta eletroquímica da presença de galactose na solução. Uma interpretação dos efeitos de potencial nessa região de formação do óxido de ouro necessita de maiores detalhes, então serão realizadas mais investigações sobre esse resultado. O polissacarídeo, conhecido como “kefirano”, é composto por iguais quantidades de glicose e galactose (1:1,16). Portanto, o resultado obtido pode ser devido a essa composição.

Figura 28 - Voltamograma cíclico de uma solução de polissacarídeo do grão de kefir em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹ para diferentes massas de 0,05; 0,10; 0,20 e 0,50g, utilizando eletrodo de ouro à velocidade de 100mV s⁻¹.

4.3. Obtenção dos espectros de Absorção no UV dos Ácidos Orgânicos

A espectrofotometria é um processo instrumental de medição baseado nas propriedades de absorção e emissão de energia eletromagnética em alguma região do espectro eletromagnético. O objetivo do uso da espectrofotometria na região do UV nesses estudos foi para confirmar o comprimento de onda de absorção dos ácidos orgânicos. Na Figura 29, são apresentados os espectros de UV e o comprimento de onda máximo, obtidos na faixa de 200 a 340 nm para todos ácidos orgânicos estudados. Para tais medidas foi utilizado para tal fim um detector com arranjo de diodo. A grande maioria destes ácidos apresentou absorbância máxima em 210 nm, como mostrado na Figura 29. A maioria dos ácidos orgânicos mostrou λ_{max} em 210 nm, com exceção dos ácido cítrico e úrico, e isto ocorreu devido à baixa concentração desses ácidos, uma vez que esta é proporcional à absorbância, embora tenham mostrado uma área mensurável em seus tempos de retenção no HPLC, para a mesma concentração usada.

Figura 29 - Espectros de absorção na região do UV dos ácidos orgânicos em concentrações (mmol L^{-1}): pirúvico (0,50); cítrico (0,40); láctico (24,17); fórmico (8,52); acético (6,10); succínico (8,50); oxálico (0,16) e úrico (0,32).

A lei fundamental em que se baseia a fotometria de absorção é chamada Lei de Beer, expressa pela equação: $A = abC$, onde: A = absorvância; a = absortividade

do absorvente; b = caminho ótico e C = concentração). A absorvidade é uma constante que depende do comprimento de onda da radiação e da natureza do meio absorvente¹⁷².

4.4. Cromatografia Líquida

4.4.1. Aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) para quantificação de ácidos orgânicos em leites fermentados

Estudos por HPLC foram realizados para identificar os produtos de fermentação, sendo que oito ácidos orgânicos foram detectados e identificados na fermentação do leite pelos grãos kefir e do Tibet e em amostra comercial de iogurte. Os ácidos encontrados foram: oxálico, pirúvico, láctico, acético, cítrico, succínico e úrico. O ácido acético é um importante ácido orgânico detectado em iogurte, provavelmente formado como produto da fermentação da lactose e ácido cítrico¹⁷³.

Na eletroquímica é importante conhecer o grupo eletroativo de cada substância, e determinar assim, o potencial onde ocorre a reação de redução e/ou oxidação. Em cromatografia o equivalente é determinar o tempo de retenção de cada substância. Para o presente estudo foi importante conhecer o tempo de retenção de cada ácido orgânico. Para tanto, inicialmente uma solução padrão individual de cada ácido foi analisada separadamente para determinar a sua identidade, através de seu tempo de retenção. Em seguida uma mistura destes ácidos nas mesmas concentrações foi injetada para verificar alguns parâmetros importantes como: co-eluição e resolução dos picos.

Na Figura 30, é mostrado um cromatograma de uma mistura padrão contendo 8 ácidos, no qual foi identificado o tempo de retenção de cada ácido (ver Tabela 11).

Figura 30 - Cromatograma de uma mistura padrão de 8 ácidos orgânicos. FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; pH 2,2; $t = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$; $F = 0,9\text{ mL min}^{-1}$; volume de injetado $20\text{ }\mu\text{L}$; detecção UV 210 nm; identificação dos picos dos ácidos orgânicos em concentração mmol L^{-1} : (1) oxálico (0,32); (2) fórmico (8,5); (3) pirúvico (0,32); (4) láctico (12,0); (5) acético (14,0); (6) úrico (0,24); (7) cítrico (0,32) e (8) succínico (8,51).

Tabela 11 - Valores de tempos de retenção obtidos com soluções-padrão dos ácidos orgânicos. Condições: FM (100% tampão fosfato, pH (2,2); vazão FM (0,9 mL min⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm.

Ácidos Orgânicos	Concentração mmol L ⁻¹	Tempo de Retenção(t _R) min
Oxálico	0,32	3,38
Fórmico	8,5	4,08
Pirúvico	2,0	4,83
Lático	12,0	5,70
Acético	14,0	6,10
Úrico	0,24	7,00
Cítrico	5,0	8,01
succínico	8,5	9,67

Na Figura 31 é mostrado um cromatograma de uma amostra de leite integral na qual foi observado a presença dos ácidos oxálico, acético, úrico, cítrico e succínico. Neste experimento, 4g de leite foi pesado e em seguida extraído com H₂SO₄ 4,5 mmol L⁻¹, para ser injetado no cromatógrafo. Na Tabela 12 é demonstrado a concentração destes ácidos, que foi calculada a partir da equação de regressão linear, e como esperado estes ácidos existem no leite como resultado do metabolismo bioquímico bovino normal. O ácido láctico existe em maior concentração e o ácido acético em pouca quantidade.

Figura 31 - Cromatograma obtido por HPLC de amostra de leite integral (4g em 10 mL de H_2SO_4 4,5 mmol L^{-1} . Condições: FM (100% tampão fosfato, pH (2,2); vazão FM (0,9 mL min^{-1}); T. análise =35 °C; volume injetado (20 μL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.

Tabela 12 - Valores de concentração e tempos de retenção de ácidos orgânicos, obtidos de amostra de leite integral. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão F (0,9 mL min^{-1}); T. análise =35 °C; volume injetado (20 μL); detecção no UV à 210 nm.

Ácidos	Concentração mmol L^{-1}	Tempo de retenção <i>min</i>
Oxálico	0,13	3,50
Fórmico	n.d*.	n.d.
Pirúvico	0,13	4,79
Láctico	15,63	5,70
Acético	0,85	6,12
Cítrico	0,02	7,05
Úrico	0,94	7,80
Succínico	0,10	9,90

*n.d.: não detectado

Nas Figuras 32, 33 e 34, foram identificados os ácidos láctico, oxálico, pirúvico, acético, úrico, cítrico, succínico e fórmico. Esta identificação foi feita por comparação entre os tempos de retenção dos compostos nas amostras de leite fermentado com os tempos de retenção dos padrões dos ácidos injetados individualmente (Tabela 12).

Nas análises cromatográficas, observou-se que todas as amostras apresentaram grande quantidade de ácido láctico e pouca quantidade de ácido fórmico e succínico (Tabela 12). De acordo com estes resultados, os picos presentes na voltametria cíclica das Figuras 20, 21 e 22 podem ser atribuídos aos ácidos láctico, oxálico, acético, pirúvico, cítrico ou úrico, uma vez que todos contêm o mesmo grupo OH^- , responsável pela eletroatividade destas substâncias.

Figura 32 - Cromatogramas obtidos por HPLC de amostra: iogurte comercial (4 e 8g), respectivamente. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão FM (0,9 mL min⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados em todas as amostras: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.

Figura 33 - Cromatogramas obtidos por HPLC de leite fermentado pelo grão kefir (4 e 8g), respectivamente. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão FM (0,9 mL min⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados em todas as amostras: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.

Figura 34 - Cromatogramas obtidos por HPLC de leite fermentado pelo grão do Tibet (4 e 8g), respectivamente. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão FM (0,9 mL min⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm. Ácidos identificados em todas as amostras: oxálico; fórmico; pirúvico; láctico; acético; úrico; cítrico e succínico.

Nas Figuras anteriores não foi possível observar as proporcionalidades de concentrações dos ácidos presentes nas amostras. Portanto na Tabela 13, é demonstrado o aumento de concentração de ácidos orgânicos em função das massas 4 e 8g de leite fermentado e iogurte comercial. Estas concentrações foram determinadas utilizando a curva de calibração de cada ácido, em que, y foi tomado como a área e x, a concentração correspondente a esta área. Para o kefir foram observados, os ácidos oxálico, pirúvico, lático, cítrico e succínico com um valor coerente quando duplicou-se as massas, enquanto que para os ácidos fórmico, acético e úrico não houve alteração. Para o tibet, o mesmo comportamento foi observado para os ácidos oxálico, fórmico, acético e cítrico, mas para o ácido lático foi verificado um aumento da sua concentração em mais de cinco vezes. Para o iogurte não houve uma proporcionalidade nas concentrações destes ácidos, provavelmente devido a presença das cepas vivas nas amostras, continuando assim o metabolismo da lactose, como pode ser observado pela concentração do ácido lático que de 2 mmol L⁻¹ aumentou para 20 mmol L⁻¹, para as massas de 4 e 8g, respectivamente. Considerando ainda que, cada grama de iogurte contém até 5 bilhões de células, e levando em conta que a massa não tenha sido bem homogeneizada.

Tabela 13 - Determinação quantitativa de ácidos orgânicos em leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet e em amostras de iogurte comercial.

Ácido	Concentração dos Ácidos Orgânicos					
	m = 4 g / 20 mL de H ₂ SO ₄ 4,5mmol L ⁻¹			m = 8 g / 20 mL de H ₂ SO ₄ 4,5 mmol L ⁻¹		
	Kefir	Tibet	iogurte	Kefir	Tibet	iogurte
Oxálico	0,17	0,15	0,02	0,30	0,24	0,14
Fórmico	0,65	0,52	n.d.	0,14	1,04	4,01
Pirúvico	0,16	0,08	0,03	0,31	0,14	0,21
Lático	15,66	5,10	1,42	36,72	27,40	20,63
Acético	5,00	1,59	n.d*	5,58	3,03	7,20
Cítrico	0,55	0,85	0,04	0,93	1,36	0,26
Succínico	0,02	0,01	0,01	0,06	0,02	0,10
Úrico	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	n.d

*n.d.: não detectado

4.4.2. Proposta de uma metodologia para a determinação de ácidos orgânicos em amostras de leite fermentados pelos grãos kefir e do Tibet e amostra comercial de iogurte.

Um método analítico torna-se confiável e com dados interpretáveis quando sofre uma avaliação denominada validação¹⁷⁴, como já citado na fundamentação teórica. Em nossa metodologia os parâmetros investigados para a validação, foram: seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade ?inter-day? e ?intra-day? e recuperação.

4.4.2.1. Seletividade

Para testar a seletividade do método, foram analisados extratos brancos de leite fermentado e extratos fortificados com os ácidos orgânicos. No extrato branco, não foram observados picos de compostos endógenos interferentes da matriz no mesmo tempo de retenção dos ácidos orgânicos. Um pico com alta intensidade aparece em todos os cromatogramas, no tempo de retenção de 2,93 min, porém, nenhum dos ácidos orgânicos analisados mostram pico neste tempo de retenção. Foi verificado que tal pico pertence ao tampão fosfato (Figura 35).

Figura 35 – Cromatograma do tampão fosfato pH = 2,2. Condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão F (0,9 mL min⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm.

4.4.2.2. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

Na Tabela 13 são mostrados os intervalos de concentração estudados, as equações de regressão linear e o coeficiente de correlação (r) para os 8 ácidos orgânicos analisados. A linearidade do método foi estudada, dentro de uma faixa de concentração utilizando cinco valores de concentrações, usadas para construir a curva de calibração. Os gráficos de calibração para todos os ácidos orgânicos foram lineares, apresentando coeficiente de correlação (r) maiores que 0,998, demonstrando que para o intervalo de concentração estudado, a resposta do detector foi linear. O gráfico de calibração obtido, plotando as concentrações dos ácidos versus as áreas de pico, para os oito ácidos, é apresentado na Figura 36.

Figura 36 – Curva de calibração para solução padrão de ácidos orgânicos, usando as seguintes condições: FM (tampão fosfato, pH (2,2)100% com 1 % ACN; vazão F (0,9 mL min⁻¹); T. análise =35 °C; volume injetado (20 µL); detecção no UV à 210 nm.

O limite de detecção do método foi estabelecido experimentalmente através da análise da mistura padrão, contendo oito ácidos orgânicos. O LD do método proposto foi estabelecido como sendo a menor concentração do ácido orgânico

existente, em amostras de leites fermentados e amostra comercial de iogurte, calculada como sendo 3 vezes o valor do desvio padrão ($LD = 3 RSD$). O limite de quantificação, definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada experimentalmente, foi calculado como sendo 3 vezes o LD, ($LQ = 10 LD$). Os valores destes limites estão na Tabela 14. As soluções foram preparadas em concentração de 10 vezes o valor do desvio padrão relativo. O desvio padrão relativo foi mais baixo que 1,3 %. E este valor foi semelhante aos obtidos na literatura ¹⁷⁵. A diferença extrema no LD entre os ácidos oxálico ($0,001 \text{ mmol L}^{-1}$) e úrico ($0,0001 \text{ mmol L}^{-1}$), comparado aos demais, pode ser atribuída as diferenças de absorvidade molar destes ácidos orgânicos, pois ácidos orgânicos saturados têm as maiores absorvidades molares e então os mais baixos limites de detecção¹⁷⁶.

Tabela 14 - Equação da regressão para curva de calibração e análise da linearidade

Ácidos	Faixa de linearidade (mmol L^{-1})	Equação de regressão	r^2	LD (mmol L^{-1})	LQ (mmol L^{-1})
Oxálico	0,02 – 0,32	$y = 37,3280x + 0,0299$	0,998	0,001	0,003
Fórmico	0,05 – 3,00	$y = 0,3070x + 0,0101$	0,998	0,057	0,190
Pirúvico	0,10 – 0,50	$y = 6,4786x - 0,1569$	0,999	0,042	0,140
Lático	1,00 – 60,00	$y = 0,8903x + 0,6690$	0,999	1,300	4,329
Acético	1,20 – 9,00	$y = 0,6380x - 0,1025$	0,999	0,278	0,926
Cítrico	0,05 – 2,00	$y = 5,0496x + 0,1158$	0,999	0,040	0,133
Succínico	0,02 – 0,50	$y = 4,5440x + 0,0683$	0,999	0,026	0,086
Úrico	0,005 – 0,04	$Y = 82,6646x - 0,0569$	0,999	0,0001	0,0003

4.4.2.3 Repetibilidade “intra-day” e “inter-day”

A Tabela 15 mostra os resultados obtidos quando foi estudada a precisão do método. Foi observada uma alta sensibilidade para os ácidos fórmico, pirúvico, láctico e úrico na presença de 1% de acetonitrila, no tampão fosfato. O valor do desvio-padrão relativo (RSD) medido para o tempo de retenção (t_R) destes ácidos foram ligeiramente mais altos do que os outros, embora todos tenham demonstrado valor menor que 0,05%. Esta alta sensibilidade é a razão porque 15 min foram necessários para recondicionar a coluna entre as varreduras de maneira à assegurar a repetibilidade das análises. Uma mistura padrão ($n = 4$) foi usada para calcular a precisão da técnica analítica. Portanto, outra mistura-padrão similar analisada em triplicata durante três dias diretos ($n = 4$) foi usada para calcular a repetibilidade “inter-day”. Como esperado, o valor do desvio-padrão obtido quando estudada a repetibilidade “intra-day” foi mais baixo que o obtido pelo “inter-day”, embora o desvio tenha sido menor que 13%.

Tabela 15 - Resultado de repetibilidade da análise de “intra-day” (n = 4) e “inter-day” (n = 4)

Ácidos	Concentração (mmol L ⁻¹)	RSD para t _R	RSD para Área “intra-day”	RSD para Área “inter-day”
Oxálico	0,32	0,00287	2,62	10,17
Fórmico	3,00	0,037	0,037	8,00
Pirúvico	0,5	1,00	0,50	10,00
Lático	12,00	0,05	0,91	10,02
Acético	9,00	0,00975	0,51	11,22
Cítrico	1,00	0,005	3,13	9,30
Succínico	1,00	0,005	2,73	12,81
Úrico	0,50	0,0984	2,27	7,55

4.3.2.3. Recuperação

A exatidão do método foi determinada a partir da recuperação. A recuperação é uma medida do processo de isolamento do analito de interesse da matriz no qual se encontra presente. Os testes de recuperação foram feitos com amostras de leites fermentados e amostras de iogurte comercial, fortificados em 2 níveis de concentrações (nível médio e nível alto). Os resultados de recuperação obtidos para cada nível de fortificação testados são mostrados nas Tabelas 16 e 17, para as amostras de leite fermentado pelo tibet, nas Tabelas 18 e 19, para as amostras de leite fermentado pelo kefir e nas Tabelas 20 e 21, para a amostra comercial de iogurte.

As amostras foram fortificadas com concentrações conhecidas de ácidos orgânicos (oxálico, pirúvico, lático, acético e cítrico), em triplicata. A percentagem de

recuperação foi calculada a partir da concentração quantificada usando a curva de calibração versus a concentração adicionada ($y = ax + b$, onde y = área do cromatograma e x = concentração.) A percentagem de recuperação foi estabelecida a partir de um valor de resposta experimental [(branco + padrão) - branco] obtido de acordo com a curva de calibração e a concentração real do padrão adicionado. Obtendo valor de até 120% para a maioria dos ácidos (ver Tabela 16 a 21).

A recuperação do presente método foi determinada pelo uso da equação:

$$\% R = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor adicionado}} \times 100$$

Tabela 16 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do TIBET para um nível médio de concentração.

Ácidos	Tibet mmol L ⁻¹	Tibet Fortificado	Tibet Fortificado - Tibet	Padrão Adicionado	Recuperação (%)
Oxálico	0,15	0,17	0,02	0,012	106
Pirúvico	0,07	0,57	0,50	0,50	98
Lático	11,18	26,99	15,81	15,50	101
Acético	1,15	4,54	3,39	3,50	97
Cítrico	0,84	1,25	0,45	0,50	93

Tabela 17 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do TIBET para um nível alto de concentração

Ácidos	Tibet mmol L ⁻¹	Tibet Fortificado	Tibet Fortificado - Tibet	Padrão Adicionado	Recuperação (%)
Oxálico	0,15	0,17	0,02	0,02	100
Pirúvico	0,07	0,85	0,78	0,84	92
Lático	11,18	38,47	27,29	26,00	103
Acético	1,15	6,30	5,15	6,00	88
Cítrico	0,84	1,23	0,39	0,80	75

Tabela 18 – Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do KEFIR para um nível médio de concentração

Ácidos	Kefir mmol L ⁻¹	KefirFortificado	Kefir Fortificado - Kefir	Padrão Adicionado	Recuperação (%)
Oxálico	0,22	0,23	0,01	0,012	68
Pirúvico	0,84	1,35	0,51	0,50	101
Lático	13,34	30,87	17,53	15,50	107
Acético	3,97	7,39	3,42	3,50	99
Cítrico	0,50	0,78	0,28	0,50	78

Tabela 19 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do KEFIR para um nível alto de concentração

Ácidos	Kefir mmol L ⁻¹	Kefir Fortificado	Kefir Fortificado - Kefir	Padrão Adicionado	Recuperação (%)
Oxálico	0,22	0,27	0,05	0,02	112
Pirúvico	0,84	1,76	0,92	0,84	107
Lático	13,34	44,19	30,85	26,00	112
Acético	3,97	8,97	5,00	6,00	90
Cítrico	0,50	0,94	0,44	0,80	72

Tabela 20 – Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do IOGURTE

para um nível médio de concentração

Ácidos	logurte mmol L ⁻¹	logurte Fortificado	logurte Fortificado - logurte t	Padrão Adicionado	Recuperação (%)
Oxálico	0,45	0,43	0,02	0,012	93
Pirúvico	0,15	0,66	0,51	0,50	101
Lático	24,95	41,95	17,01	15,50	104
Acético	7,09	10,03	2,94	3,50	95
Cítrico	0,93	1,11	0,18	0,50	78

Tabela 21 - Percentagem de recuperação de ácidos orgânicos adicionados ao leite fermentado pelo grão do IOGURTE

para um nível alto de concentração

Ácidos	logurte t mmol L ⁻¹	logurte Fortificado	logurte Fortificado - logurte	Padrão Adicionado	Recuperação (%)
Oxálico	0,45	0,40	0,05	0,02	85
Pirúvico	0,15	1,51	1,36	0,84	126
Lático	24,95	63,06	38,12	26,00	124
Acético	7,09	14,26	7,17	6,00	108
Cítrico	0,93	1,46	0,53	0,80	84

4.5. Avaliação do tempo de armazenamento de leite fermentado pelos grãos kefir e do Tibet, através do monitoramento da presença de ácidos orgânicos por HPLC e pela avaliação do pH.

Do ponto de vista do tempo de armazenamento, a qualidade dos alimentos é definida por parâmetros fisiológicos, valores nutricionais e atributos sensoriais como cor, sabor, textura ou consistência. A diminuição da qualidade e a redução de vida-de-prateleira podem ser conseqüências do efeito de uma ou mais destas propriedades¹⁷⁷. No desenvolvimento de novos produtos, um ponto chave é a determinação do tempo de armazenamento, sendo que esta pode ser definida como o tempo decorrido entre a produção e a embalagem do produto até o ponto em que este se torna inaceitável ao consumo¹⁷⁸.

As análises do tempo de armazenamento realizadas no leite fermentado pelos grãos kefir e tibet consistiu na avaliação do pH e avaliação da quantidade de ácidos orgânicos utilizando HPLC, no decorrer de 0, 7, 14 e 21 dias, como diversos pesquisadores tem sugerido.

Nos resultados destes estudos, não houve diferença significativa no valor médio de pH durante 21 dias de armazenamento (temperatura de 4 °C). Em 0 dia, a média de pH para o kefir foi 4,56 e 4,33 para o tibet, e, durante os 21 dias, 4,54 para kefir e 4,39 para o tibet. Em outros produtos fermentados, como o iogurte, sobreacidificação é um problema durante o armazenamento. Nestes estudos, a produção de ácido é significativa (ver Tabela 22) e, então, uma diminuição de pH durante o armazenamento tanto do kefir como do tibet, parece ser impedida, como pode ser observado na Figura 37. Um mesmo comportamento foi obtido por Guzel-Seydim et al. (2000) em kefir de origem turca.

O pH não varia significativamente durante o armazenamento, a população de bactéria ácida láctica diminuiu com o tempo, razão pela qual o kefir não tornou-se

mais ácido. Além disso, alguns pesquisadores citam que o nível de lactose mantém-se praticamente constante durante todo o armazenamento. Em outros leites fermentados, tais como iogurte, o pH diminuiu com o tempo de armazenamento, devido à quebra da lactose pelas culturas de bactérias. O pH do kefir não variou durante o armazenamento devido à presença de leveduras. Em leite fermentado contendo leveduras, a multiplicação e produção de ácidos láctico e acético pelas bactérias é muito mais lento do que aquelas de culturas puras¹⁷⁹.

Figura 37 – Variação de pH durante dias de armazenamento: 0, 7, 14 e 21 dias

O ácido cítrico é um ácido orgânico de sabor agradável, facilmente assimilável pelo organismo humano e de pequena toxicidade. Devido a estas características, é amplamente utilizado na indústria alimentícia como acidulante, agente para intensificar o sabor, antioxidante para inibir o ranço em óleos e gorduras, como agente tamponante em geléias e gelatinas e como estabilizante. O efeito antibacteriano do ácido cítrico está associado não somente à sua ação acidulante, mas também à sua atividade quelante de íons Ca^{+2} ¹⁸⁰.

As Figuras 38 e 39 mostram mudanças nas concentrações de lactato, citrato, piruvato e acetato para o kefir e o tibet.

A concentração de citrato variou muito pouco durante o período de armazenamento de 0 a 21 dias.

A produção de acetato foi menos variável que outros produtos no leite fermentado. Pouco aumento ocorreu nas primeiras 7h de armazenamento, ocorrendo um acréscimo entre 7 e 14h, atingindo uma concentração máxima de 15,40 mmol L⁻¹ para kefir e 12,95 mmol L⁻¹ para o tibet. O acetato produzido durante a fermentação teve comportamento muito semelhante para kefir e tibet, Figuras 38 e 39. O acetato foi provavelmente produzido de citrato e lactose pela LAB. Outra possibilidade é que o acetato pode ser produzido da oxidação de etanol pela AAB (bactéria ácida acética) e encontrada na fermentação do leite pelos grãos. Em estudos realizados por Haflinger (1990), e relatados por Rea (1999), verificou-se que 10⁸ mL⁻¹ de AAB são necessários para que seja medido e sensorialmente detectável a atividade metabólica, no entanto, observou-se que este nível é improvável de ocorrer em preparações de kefir.

A literatura informa que a concentração final de lactato total, D-lactato, ácido acético e etanol em kefir, são diferentes, para uma grande maioria, principalmente no que se refere aos lactatos D e L. Para Rea, o L-lactato foi 10 vezes maior que o D-lactato em seis amostras de kefir irlandês. Além disso, o atual nível de D-Lactato foi muito mais baixo que aqueles informados por outros pesquisadores. Estudos realizados por Thompson (1990) em amostra de kefir, também irlandês, mostrou que a concentração de D-Lactato foi 4 vezes maior que o isômero L e o pH final foi de ~3,2. Em estudos realizados por Rea, todas as amostras foram estudadas em pH

4,4. A quantidade de *Lactococci* que produziu L-lactato foi 10 vezes maior que aquelas de *Leuconostoc*, que produz o D-isômero somente, e o número de *Lactobacilli* foi baixo (máximo $5 \times 10^6 \text{ g}^{-1}$), indicando que a amostra de kefir estudada por Thompson et al. (1990) foi totalmente diferente daquela estudada por Rea.

Lactato foi o principal produto formado durante a fermentação e são produzidos por *Lactococci* e *Leuconostoc*. As formas isômeras D e L são produzidas respectivamente por *Lactococci* e *Leuconostoc*. De um modo geral, a quantidade de isômero L produzida foi maior que a de isômero D, que foi tanto maior quanto a produção de *Lactococci* em relação a *Leuconostoc*. O *Lactococci* produz duas vezes mais ácido láctico que *Leuconostoc* a partir de uma mesma quantidade de leite e kefir. O *Leuconostoc* não cresce no leite, mas seu crescimento é estimulado pelos *Lactococci* e por adição de leveduras no leite, no caso de kefir, pelo crescimento de suas próprias leveduras¹.

Figura 38 – Concentração de citrato, lactato, piruvato e acetato durante o armazenamento de kefir (n=3)

Figura 39 - Concentração de citrato, lactato, piruvato e acetato durante o armazenamento de tibet (n=3)

A Tabela 22 mostra as concentrações destes ácidos produzidos durante a fermentação. Observa-se que tanto o leite fermentado pelo kefir como pelo tibet não mostrou nenhuma ou pouca quantidade de ácidos úrico, succínico e fórmico.

Tabela 22. Acompanhamento da produção de ácidos orgânicos (mmol L⁻¹) durante tempo de armazenamento (0, 7, 14 e 21 dias)

Ácidos	Kefir				Tibet			
	0	7	14	21	0	7	14	21
Oxálico	0,12	0,04	0,03	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04
Fórmico	n.d.	3,09	n.d.	0,14	n.d.	n.d.	n.d.	0,11
Pirúvico	0,14	0,18	2,34	2,64	0,11	0,17	0,11	2,61
Lático	23,24	18,22	15,24	12,47	21,60	16,14	13,45	11,31
Acético	2,10	2,04	15,40	13,04	2,30	2,64	12,95	10,69
Úrico	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01
Cítrico	0,82	0,63	0,71	0,68	0,60	0,36	0,45	0,46
Succínico	n.d.	0,07	n.d.	0,06	0,10	0,03	0,07	0,06
Ph	4,56	4,27	4,49	4,53	4,33	4,12	4,27	4,41

4.6 Influência da temperatura na concentração de ácidos orgânicos por HPLC.

A Figura 40 mostra o tempo de fermentação que os grãos kefir e do tibet necessitaram para fermentar o leite em quatro diferentes valores de temperatura (10, 20, 30 e 40°C). Na Tabela 23 é mostrado a variação das concentrações dos ácidos obtidos com essas temperaturas. O tempo foi monitorado até que fosse atingido um valor de pH 4,5 – 4,6. Uma análise entre kefir e tibet mostra que o tibet necessitou de mais tempo para atingir o valor de pH ideal comparado ao kefir. Provavelmente o kefir deve ter uma microflora mais diversificada (podendo ser em quantidade ou qualidade) do que o tibet, fazendo com que a sua cinética de fermentação seja mais rápida embora ambos tenham apresentado comportamento similar em muitos experimentos. Ou mesmo o aumento de temperatura pode dar condições de

determinada espécie acelerar o seu metabolismo. Como esperado, quanto maior a temperatura menor o tempo necessário para atingir pH de 4,5. Uma análise concomitante entre a microbiologia e estes resultados facilitaria nossas conclusões, entretanto, alguns estudos aplicados à fabricação de iogurte comercial, que utilizaram as mesmas cepas existentes no kefir, contribuíram para uma análise mais completa destes resultados e estabelecem que a temperatura ótima para o grão kefir é relativamente baixa, entre 18-20 °C .

A produção de iogurte envolve, basicamente, uma cultura láctica mista composta por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Ambas são homofermentativas, produtoras de ácido láctico. O *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* apresenta-se como bastonetes, unidos em cadeias longas, com crescimento ótimo em temperatura entre 45 °C e 50 °C, mas crescem em temperatura de até -15 °C. *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* apresenta-se como cocos unidos, geralmente em cadeias curtas, e seu melhor crescimento se dá à temperatura entre 37 °C e 45 °C¹⁸¹.

A temperatura ideal de incubação da cultura láctica é de 42 °C, de acordo com muitos autores¹⁸². Radk et al.^{183, 184} verificaram que as cepas de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* obtiveram maior número de células que o *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* às temperaturas de 37 °C, 42 °C e 45 °C, em 93,3% das culturas mistas testadas. As temperaturas ótimas de crescimento não exercem influência sobre o crescimento da cultura mista composta pelos organismos em questão, porém, a temperatura influenciou a compatibilidade das culturas, porque determinou a concentração ou tipos de fatores estimulantes produzidos pelo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* .

Com estas análises, pode-se concluir que as cepas têm uma temperatura ótima entre 30 e 40 °C e quanto mais ideal a temperatura das espécies tanto maior será a produção de ácidos orgânicos pelos grãos. Por exemplo, o kefir para atingir um pH de 4,5, em 40 °C necessitou apenas de 5h, enquanto o tibet levou mais do dobro desse tempo. Isto deve-se provavelmente as diferenças das microflora existentes nesses grãos.

Figura 40 – Influência da temperatura no pH e no tempo de fermentação para leite fermentado pelos grãos de kefir e do tibet

Tabela 23. Acompanhamentos da produção de ácidos orgânicos em diferentes temperaturas (10, 20, 30, e 40 °C) pelos grãos kefir e do Tibet

Ácidos	Kefir				Tibet			
	10	20	30	40	10	20	30	40
Oxálico	0,06	0,12	0,23	0,09	0,09	0,13	0,23	0,09
Fórmico	2,87	n.d.	n.d.	3,62	2,74	n.d.	n.d.	4,10
Pirúvico	0,78	0,62	0,96	0,20	0,36	0,10	0,34	0,20
Lático	15,29	14,55	33,78	21,96	18,70	12,66	22,41	19,97
Acético	20,49	15,88	21,43	22,70	23,72	19,60	25,83	22,72
Úrico	0,02	0,02	0,04	0,03	0,02	0,01	0,03	0,03
Cítrico	0,78	0,64	0,92	1,00	1,08	0,72	1,18	1,03
Succínico	0,06	0,06	0,10	0,11	0,02	0,11	0,11	0,13
pH	4,75	3,55	4,10	4,45	4,33	4,00	4,54	4,56

O bom desenvolvimento durante o processo de fermentação do leite para a produção de iogurte se deve, basicamente, à capacidade simbiótica (protocooperação) das bactérias em questão. O crescimento de *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* é estimulado pelos aminoácidos livres e peptídeos liberados pelos lactobacilos a partir de proteínas do leite. Por outro lado, a produção de ácido fórmico pelos lactobacilos é estimulada por compostos produzidos pelos *Lactococcus*, na ausência ou baixa concentração de oxigênio. O ácido fórmico produzido limita o crescimento dos lactobacilos, juntamente com o dióxido de carbono produzido pelos *Lactococcus*¹⁸⁵.

Os *Lactococcus* e os *Lactobacillus* apresentam, ainda, resistência à degeneração, poder acidificante médio, e produzem substâncias responsáveis pela viscosidade, sabor e aroma, características do iogurte¹⁸⁶.

E pelos resultados obtidos nessas Figuras e Tabela 22 pode-se observar que a faixa de temperatura ideal para obter maior concentração de ácidos láctico, pirúvico, cítrico e acético varia entre de 20 a 30 °C, tanto para o kefir quanto para o tibet. Como ser visto nas Figuras 41 e 42.

Figura 41 – Influência da temperatura na concentração de ácidos láctico, acético, pirúvico e cítrico para o leite fermentado pelos grãos de kefir

Figura 42 - Influência da temperatura na concentração de ácidos láctico, acético, pirúvico e cítrico para o leite fermentado pelos grãos de tibet

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- Pelo estudo de pH, pode-se comparar que após 12h de inoculação, o grão de kefir produz muitas espécies ácidas, comparada ao grão do Tibet
- Os resultados obtidos comprovaram que os polissacarídeos obtidos através do kefir podem ser detectados por meio da Voltametria Cíclica, tanto em UMES (ouro) quanto em eletrodo de cobre.
- Foi verificada a presença de ácidos orgânicos através de ambos os métodos analíticos utilizados.
- Ácidos orgânicos produzidos no leite fermentado pelos grãos kefir, do tibet e iogurte mostraram eletroatividade em UME de ouro, nas condições estudadas, confirmando a formação de ácidos durante a fermentação.
- De acordo com os resultados da curva da corrente de pico pela raiz quadrada da velocidade de varredura, todos os resultados foram lineares, demonstrando um processo difusional para todas as amostras.
- Os resultados obtidos por HPLC comprovaram a presença de 8 ácidos orgânicos em todas as amostras analisadas e em grandes quantidades para 5 dos ácidos detectados (ácidos: láctico, oxálico, acético, pirúvico, cítrico e úrico).
- Foi observado para ambas as espécies de grãos que, após sete dias de armazenamento, ocorreu uma acidificação mais acentuada. O mesmo resultado foi obtido para leites fermentados por *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.
- Os resultados apresentados para a precisão e exatidão dos ácidos orgânicos em leites fermentados pelos grãos de kefir e tibet, mostraram que o desempenho do método desenvolvido apresentam concordância com a literatura para um método quantitativo.

TRABALHOS FUTUROS

1. Estudo da distribuição da microflora do grão de kefir e do tibet por microscopia de varredura eletrônica
2. Realizar estudos de eletroforese capilar do leite e do leite fermentado pelos grãos de kefir e do tibet
3. Fazer LC-MS dos leites fermentados pelos grãos kefir e tibet

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- 151- REA, M.C.; LENNARTSON, T.; DILLON, P.; DRINAM, F.D.; REVILLE, W.J., HEAPES, M.; COGAM, T.M.. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **J. Appl. Bacteriol.** v. 81, p.83-94, 1996.
- 152- MARSILI, R.T.; STAPENKO, H. O.; SIMMONS, R.E.; GREEN, D.E.; High Performance Liquid Chromatographic Determination of Organic Acids in Dairy Products. **J. Food Sci.** v. 54, p.52-57, 1981.
- 153- ESTRELLA FERNANDES-GARCIA E JOHN U. MCGREGOR. Determination of Organic Acids During the Fermentation and Cold Storage of Yogurt. **J. Dairy Sci.** v. 77, p.2934-2939, 1994.
- 154- GUZEL-SEYDIM, Z.B.; SEYDIM, A. C.; GREEN, A.K.; BODINE, E A.B. Determination of Organic Acids and Volatile Flavor Substances in Kefir during Fermentation. **J. Food Comp. Anal.** v. 13, p.35-43, p.2000.
- 155- MORENO, I.; LERAYER, A.L.; VIALTA, A.; SOUZA, G. Características gerais de bacteriocinas de bactérias lácticas. **Indústria de Laticínios.** v. 5, p.57-60, 2000.
- 156- DANIELE, S.; ANTONIETTA, B. M.; UGO, P.; MAZZOCHIN, G.A. Voltammetric probe of milk samples by using a platinum microelectrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 238, p. 357-366, 1990.
- 157- DANIELE, S.; ANTONIETTA, B. M.; UGO, P.; MAZZOCHIN, G.A. Voltammetric probe of milk samples by using a platinum microelectrode. **Anal. Chim. Acta**, v. 238, p. 357-366, 1990.
- 158- FU, C.; WANG, L.; FANG, Y. Determination of oxalic acid in urine by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection. **Talanta.** v. 50, p. 953-958, 1999.
- 159- DROOG, J.M.M; ALDERLIENSTEN, C.A.; ALDERLIENSTEN, P.T.; BOOTSMA, G.A. The Mechanism of silver(I) oxide to silver(II) oxide formation on polycrystalline silver electrodes in 8M KOH solution. **J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.** v. 111, p.61-70, 1980.
- 160- BURKE, L.D.; AHERN, M.J.G.; RYAN, T.G. An investigation of the anodic behavior of copper and its anodically produced oxides in aqueous solution of high pH. **J. Electrochem. Soc.** v. 139, p. 553-561, 1990.
- 161- COLÓN L. A.; REJEEV, D.; RICHARD, N.Z. Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a copper microelectrode. **Anal. Chem.** v. 65, p. 176-181, 1993.

-
- 162- PYUN, C.H.; PARK, S.M. In situ spectroelectrochemical studies on anodic oxidation of copper in alkaline solution. **J. Electrochem. Soc.** v. 133, p. 2024-2030, 1986.
- 163- FITSEV, I.M.; BAKANINA, Y.; ABDULLIN, N.; BUDNIKOV, I.F. Voltammetric flow-injection determination of glucose in blood serum. **Ind. Lab.** v. 64, p. 426-427, 1998.
- 164- BAKANINA, Y.N.; ABDULIN, I.F.; BUDNIKOV, G.K.; FITSEV, I.M.; KHABIBULLIN, M. D. Voltammetric determination of sugar in wines and wine materials using a copper electrode. **Ind. Lab.**, v. 65, p. 350-351, 1999.
- 165- ENGSTROMSILVERMAN, C.E.; EWING, A. G. Copper wire amperometric detector for capillary electrophoresis. **J. Microcolumn Sep.** v. 3. p. 141-145, 1991.
- 166- STULIK, K.; PACAKOVA, V. L.; ENNISSEN, H. B. Amperometric flow detection with a copper working electrode response mechanism and application to various compounds. **Talanta**, v. 36, p. 455-460, 1988.
- 167 LAREW, L.A.; JOHNSON, D.C. Concentration dependence of the mechanism of glucose oxidation at gold electrodes in alkaline media. **J. Electroanal. Chem.** v.262, p.167-, 1989.
- 168 HSIAO, M.W.; ADZIC, R.R.; YEAGER, E.B. Electrochemical oxidation of glucose on single crystal and polycrystalline gold surface in phosphate buffer. **J. Electrochem. Soc.** v.143, p. 759, 1996.
- 169 DRULIOLLE, H.; KOKOH, K.B.; HAHN, F.; LAMY, C.; BEDEN B. On some mechanistic aspects of the electrochemical oxidation of lactose at platinum and gold electrodes in alkaline medium. **J. Electroanal. Chem.** v.426, p. 103-115, 1997.
- 170 PARPOT, P.; KOKOH, K.B.; BEDEN, B.; LAMY, C. Electrocatalytic oxidation of saccharose in alkaline medium. **Electrochim. Acta.** v.38, p. 1679-, 1993.
- 171- WEBER, G.; ALT, F.; MESSERSCHMIDT, J. Characterization of low-molecular-weight metal species in plant extracts by using HPLC with pulsed amperometric detection and cyclic voltammetry. **Fresenius J. Anal. Chem.** v. 362, p. 209-214, 1998.
- 172- WILLARD, H.; MERRIT Jr., L.; DEAN, J. **Análise Instrumental**. 2a ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 986p.
- 173- IZCO, J.M.; TORMO, M.; JIMÉNEZ-FLORES, R. Rapid Simultaneous Determination of Organic Acids, Free Amino Acids, and Lactose in Cheese by Capillary Electrophoresis. **J. Dairy Sci.** v. 85, p. 2122-2129, 2002.
- 174- RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

-
- 175 Van HEES, P.A.W.; DAHLEN, J.; LUNDSTROM, U.S.; BOREN, H.; ALLARD, B. Determination of low molecular weight organic acids in soil solution by HPLC. **Talanta**, v. 48, p.173-179, 1999.
- 176 CAWTHRAY, G. R. An improved reverse-phase liquid chromatographic method for the analysis of low-molecular mass organic acids in plant root exudates. **J. Chromatogr. A** , v. 1011, p.233-240, 2003.
- 177- PFEIFFER, C.; D'AUJOURD'HUI, J.W.; NUESLI, J.; ESCHER, F. Optimizing food packaging and shelf life. **Food Technol.** v.53, p.52-59, 1999.
- 178- ELLIS, M.J. **Shelf life evaluation of foods**. London: Black Academic & Professional, 1996. 321p.
- 179- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. **Food Chem.** v.90, p.613-620, 2005.
- 180- DEMAİN, A.L. Microbial technology . **Trens Biotechnol.** v. 18, p.26-31, 2000.
- 181- DELLAGIO, F.; TORRIANI, S.; VLAEMINCK, G. Specific characteristics of microorganism used for fermented milks. **Bulletin International Dairy Federal.** v. 277, p. 4-16, 1992
- 182- LOEWENTEIN, M.; EPSCK, S.J.; BARNHART, H.M. et al. Research on goat milk products: a review. **J. Dairy Sci.** v. 63, p. 1631-1648, 1980.
- 183- NEIROTTI, E.; OLIVEIRA, A.J. Produção de iogurte pelo emprego de culturas lácticas mistas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**.v. 22, p. 1-16, 1988.
- 184- RADKE-MICHELL, L. C.; SANDINI, W.E. Infuence of temperature on associative growth of streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus. **J. Dairy Sci.** v. 69, p. 2558-2568, 1986.
- 185- DRIESSEN, F.M; KINGMA, F.; STADHOUDERS, J. Evidence that *Lactobacillus bulgaricus* in yogurt is stimulated by carbon dioxide produced by *Streptococcus thermophilus*. **Netherlands Milk Dairy Journal.** v.36, p. 135-144, 1982.
- 186- SOUZA, G. Iogurte: tecnologia, consumo e produção em alta. **Leite e Derivados.** v. 5, p. 44-54, 1996.