

Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete.

Yeasts: Diversity in Kefir, probiotic potential and possible use in ice cream.

Daniela Buzatti Cassanego¹, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards²,
Marcio Antonio Mazutti³, Maurício Ramírez-Castrillón⁴

¹Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
danybuzatti@yahoo.com.br

^{2,3,4}Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.
neilarichardsprof@gmail.com; marciomazutti@gmail.com; mauriciogeteg@gmail.com

Resumo

O kefir é um produto elaborado a partir da fermentação simbiótica de diferentes micro-organismos, resultando em um produto com características microbiológicas, físico-químicas e sensoriais inigualáveis. Bactérias, principalmente as do gênero *Lactobacillus*, e leveduras são os principais micro-organismos que dão origem a este produto. Os gêneros *Kluyveromyces* e *Saccharomyces* são os maiores representantes das leveduras encontradas na microbiota do kefir. Em relação ao potencial probiótico das leveduras, a única comercializada, em forma de medicamento via oral, é a *Saccharomyces boulardii*, entretanto, pesquisas vêm demonstrando que outros gêneros, outras espécies e novas cepas de leveduras também apresentam promissor potencial probiótico, porém as pesquisas não relatam a aplicação destas novas leveduras probióticas em alimentos. O objetivo desta revisão envolveu a realização de uma revisão bibliográfica sobre diferentes espécies e cepas de leveduras encontradas em amostras de kefir por diferentes autores à nível mundial. O potencial probiótico de leveduras também foi estudado, bem como a potencialidade de micro-organismos probióticos serem adicionadas ao sorvete. Com conclusão pode-se afirmar que inúmeras cepas de leveduras estão presentes no complexo simbiótico do kefir e, alguma destas possivelmente apresente potencial probiótico, podendo ser incorporada á sorvetes, uma vez que o alimento tem ampla aceitação de consumo e não utiliza o processo de fermentação na sua elaboração.

Palavras-chave: Kefir. leveduras. probiótico. *Saccharomyces boulardii*. sorvete.

Abstract

Kefir is a product made by the symbiotic fermentation of different microorganisms, resulting in a product with microbiological characteristics, physicochemical and sensory unparalleled. Bacteria, mainly of the gene *Lactobacillus*, and the yeasts are the main microorganisms that give rise of this product. The genres *Kluyveromyces* and *Saccharomyces* are the largest representatives of the yeasts found at Kefir's microbiot. In relation of the probiotic potential of the yeasts, the one sold in drug form by mouth, is the *Saccharomyces boulardii*, however, researches are showing that other genres, other species and new strains of yeasts also had promising probiotic potential, but the researches don't tell the application of this new probiotic yeasts in food. The aim of this review involved the achievement of a bibliographic review about different species and strains of yeasts found at Kefir's samples by different authors at the global level. The probiotic potential of yeasts was also studied, as well as the capability of probiotic microorganisms being added to ice cream. With conclusion it can be said that countless strains of yeasts are present in the Kefir's symbiotic complex and, some of this possibly submit probiotic potential, that could being incorporated into ice cream, once the food have wide consumer acceptance and don't uses the fermentation process in it's preparation.

Key-words: Kefir. Yeast. Probiotic. *Saccharomyces boulardii*. Ice cream.

Recebido: 30/09/2015 Aceito: 13/10/2015

* danybuzatti@yahoo.com.br

1 Introdução

O kefir é uma solução viscosa, acidificada e ligeiramente alcoólica, produzido através da fermentação de leite por meio de grãos como cultura starter (FAO/WHO, 2003).

Os principais produtos finais da fermentação do kefir são o ácido láctico, acetaldeído, etanol, acetoina, diacetil e dióxido de carbono (ERTEKIN & GUZEL-SEYDIM, 2009; FERREIRA et al., 2010), esta diversidade refere-se ao fato do produto ser elaborado a partir da relação simbiótica de bactérias ácido lácticas (BAL), ácido acéticas e leveduras, sendo também, considerado um recurso probiótico e com elevado valor nutricional (YANG et al., 2008).

Existem várias definições para o termo probiótico, porém, a mais aceita é de que são micro-organismos vivos, os quais administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Os probióticos também têm sido associados a prevenção de câncer através de mecanismos como a estimulação do sistema imunológico, diminuindo a incidência de infecções, regulando a inflamação intestinal e a ligando-se a compostos tóxicos (MALEKI et al., 2016).

A maioria dos probióticos são bactérias, sendo que as bactérias ácido lácticas (BAL) são as mais conhecidas e utilizadas em muitos alimentos, tais como leites fermentados, queijos e alimentos à base de vegetais (CHEN et al., 2014).

Cepas probióticas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* possuem um extenso histórico de segurança para o seu consumo pela população saudável, de modo geral, sendo consideradas GRAS (General Recognized as Safe) (SAAD et al., 2011).

Saccharomyces boulardii é praticamente a única levedura comercializada na medicina com função probiótica (MARTINS et al., 2005a), entretanto, outras leveduras de origem ambiental ou agroindustrial com propriedades bioterapêuticas similares ou até melhores, certamente existem, principalmente considerando a biodiversidade encontrada nos ecossistemas microbianos brasileiros (MARTINS et al., 2005b).

McFarland (2010) afirma que outras cepas de *Saccharomyces* podem conter propriedades probióticas, mas evidências clínicas da eficácia para outras cepas de leveduras ainda são deficientes.

No caso das leveduras, a capacidade de aglutinar patógenos, resistir ao pH ácido e aos sais biliares do trato gastrointestinal estão entre os mais importantes critérios para sua pré-seleção como probióticos (GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2012).

O veículo alimentício escolhido para a incorporação de cepas probióticas deve ser cuidadosamente estudado, particularmente em relação aos produtos fermentados, os quais a multiplicação de micro-organismos probióticos pode resultar em características não peculiares ou mesmo indesejáveis ao produto (KOMATSU, et al. 2008).

Apesar do congelamento e descongelamento causar injúrias às células dos micro-organismos probióticos, Saad e colaboradores (2011), afirmaram que a incorporação de bactérias probióticas em sorvetes é vantajosa, pelo fato dessa categoria de alimentos ser rica em nutrientes e consumida pelo público em geral, porém, esse produto não é consumido diariamente, e o lançamento de sorvetes probióticos deve ser seguido a campanhas educacionais, no sentido de estimular o consumo constante dos mesmos (CRUZ et al., 2009).

Tendo em vista estes fatos e o interesse pelo estudo de probióticos, o artigo teve como objetivo a realização de uma revisão bibliográfica envolvendo a diversidade das leveduras presentes em kefir, o estudo do potencial probiótico de diversas cepas de leveduras e a possível aplicação das mesmas na matriz sorvete.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Kefir

O consumo do kefir é estimulado pela sua longa história de efeitos benéficos à saúde (CHIFIRIUC et al., 2011), o alimento ocupa um importante lugar na dieta humana, principalmente no Sudoeste da Ásia, Europa

América do Norte, Japão, Oriente Médio, África do Norte e Rússia (SARKAR, 2007). No Brasil, o kefir ainda é pouco conhecido, sendo elaborado à nível caseiro, principalmente por descendentes de países onde seu consumo é tradição (FARNWORTH, 2005; MIGUEL et al., 2010).

A origem do kefir ainda é incerta, autores afirmam que trata-se de uma bebida originária das montanhas do Cáucaso (WITTHUHN et al., 2005; LOPITZ-OTSOA et al., 2006), entretanto o kefir pode ter surgido, independentemente, em diferentes regiões, resultando populações microbianas específicas e distintas, que produziam bebidas com diferentes propriedades sensoriais e microbiológicas (MIGUEL et al., 2010). Em estudo realizado por Yang et al. (2014), foram encontrados vestígios de kefir em tumbas no cemitério de Xiaohé na China, os autores evidenciaram a utilização do kefir nos anos de 1980-1450 A.C., no estudo, há relatos que as tribos locais consumiam o kefir como uma alternativa ao leite, já que as mesmas apresentavam intolerância à lactose.

Wang et al. (2012) investigaram os micro-organismos envolvidos na biossíntese do grão de kefir em Taiwan, os resultados demonstraram que a formação do grão começou com a auto-agregação de *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Saccharomyces turicensis*, resultando em pequenos grânulos, a partir daí o *Lactobacillus kefir* aderiu-se à superfície dos grânulos, co-agregando-se com outros micro-organismos e componentes no leite, para formar os grãos de maior diâmetro. Em sub-cultura, mais organismos anexam-se aos grãos, resultando em crescimento do mesmo.

Geralmente, o kefir é elaborado a partir de leite de vaca, porém muitos tipos de leites, tais como cabra, ovelha, égua, búfala e camela também podem ser utilizados (SURIASIH et al., 2012).

Tamime et al. (2001) relataram diferenças significativas nas quantidades de sólidos totais, proteínas, carboidratos e cinzas entre kefir elaborados com diferentes tipos de leites (caprino, bovino e ovino) sendo que a maior diferença foi encontrada em relação às proteínas, de forma que o kefir de leite ovino apresentou o maior teor proteico entre as bebidas avaliadas no estudo. Há relatos que o kefir possui 1,98 g.L⁻¹ de dióxido de carbono e 0,48% de álcool, sendo que o conteúdo de CO₂ aumenta com a elevação da concentração de grãos de kefir (SARKAR, 2007).

O kefir é o único produto lácteo cultivado devido a combinação de fermentação láctica e alcoólica (TAS et al., 2012), sendo elaborado a partir da atividade microbiológica dos “grãos de kefir” (GUZEL-SEYDIM et al., 2011), segundo Plessas et al. (2005) os grãos podem ser definidos como aglomerados de micro-organismos, onde os mesmos são mantidos unidos por uma matriz de polissacárideo e apresentam uma relação simbiótica entre bactérias e leveduras (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Nambou et al. (2014) realizaram estudo no qual combinaram seis espécies de micro-organismos isolados para a elaboração de kefir, os resultados indicaram que apenas algumas das culturas iniciadoras concebidas eram consistentes com a produção de bebidas com características aproximando-os de kefir tradicional como relatado na literatura, confirmando que, embora métodos utilizando cultura iniciadora composta por bactérias e leveduras isoladas e selecionadas para a produção de kefir tenham sido sugeridos (SARKAR, 2007) até hoje, a reconstrução de grãos de kefir de leite a partir de uma mistura de isolados microbiológicos não foi possível, demonstrando que a relação simbiótica dos grãos de kefir é de fundamental importância para o desenvolvimento da bebida (STADIE et al. 2013).

A composição microbiana dos grãos de kefir varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação (WITTHUHN et al., 2004). Incluem-se, na composição microbiológica do kefir, bactérias ácido lácticas, leveduras e alguns fungos miceliais (WITTHUHN et al., 2005), estima-se que entre 65 e 80% dos micro-organismos presentes nos grãos representam o gênero *Lactobacillus* (WOUTERS et al., 2002).

Embora a maior parte dos micro-organismos presentes nos grãos de kefir sejam representados por bactérias, as leveduras são importantes para o equilíbrio microbiológico e desenvolvimento das características físico-químicas e sensoriais do produto final. Conforme Farnworth (2005) as leveduras desempenham um papel importante na preparação de kefir, fornecendo nutrientes essenciais para o crescimento das bactérias ácido lácticas, tais como aminoácidos e vitaminas, e

liberando metabólitos que contribuem para o sabor e sensação do kefir, como etanol e CO₂.

Análises da microbiota de três diferentes kefir do Brasil, por PCR-DGGE, realizadas por Leite et al. (2012) mostraram que *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefiri* foram as espécies de bactérias mais encontradas nas três amostras e que a comunidade de leveduras foi majoritariamente representada pela *Saccharomyces cerevisiae*.

Outro estudo, também realizado no Brasil, com objetivo de identificar o perfil microbiológico de uma amostra de Kefir cultivada em solução aquosa de açúcar mascavo encontrou as seguintes espécies de leveduras: *S. cerevisiae*, *Candida colliculosa*, *Toruspola delbruechii*, *Candida inconspicua*, *Candida magnoliae*, *Kloekera* sp., *Candida famata*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* e *Candida kefir* (BERGMANN et al., 2010).

Uraz et al. (2012) isolaram leveduras provenientes do kefir da Turquia, encontraram, ao total, 66 diferentes espécies destes micro-organismos sendo que 51% das leveduras encontradas eram da espécie *Candida kefyr*, 33% representavam a espécie *Candida famata* e apenas 2% das leveduras presentes no kefir avaliado eram da espécie *S. cerevisiae*. Outro trabalho realizado identificando micro-organismos provenientes do kefir em regiões diferentes da Turquia encontrou as espécies *K. marxianus* e *K. dobzhanskii* como maiores representantes das leveduras (TAS et al., 2012), *K. marxianus* foi a espécie de levedura mais encontrada, também, em kefir Tibetano (JIANZHONG et al., 2009).

Autores isolaram e identificaram micro-organismos presentes em kefir de Bali, em um total de 115 isolados, 68,7% representavam as bactérias ácido lácticas e 31,3% eram as leveduras, sendo a *Candida famata* a maior representante das mesmas (SURIASIH et al., 2012).

A diversidade microbiana de kefir elaborado a partir de uma mistura de água, figos desidratados, limão e sacarose foi estudada por Gulitz et al. (2011), os autores encontraram a levedura *Zygorhynchus florentina* como sendo a predominante nesse tipo de cultivo.

Através de sua composição microbiológica e química, o kefir pode ser considerado um produto probiótico complexo, possuindo em sua composição micro-organismos vivos capazes de

melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome (WESCHENFELDER et al., 2009).

Diversos estudos confirmam os efeitos benéficos do kefir, como a capacidade de modular a resposta imune da mucosa intestinal em ratos, aumento da atividade fagocitária de macrófagos peritoneais e pulmonares e, além disso, capacidade de aumentar a imunidade da mucosa em locais distantes (tecido dos brônquios) (VINDEROLA et al., 2005a; VINDEROLA et al., 2005b). Em trabalho também realizado por Vinderola et al. (2006), os autores observaram que diferentes componentes de kefir apresentavam um papel *in vivo*, como substâncias bioterapêuticas orais capazes de estimular células do sistema imunológico e promover respostas imunes mediadas por células contra tumores e também contra infecções intracelulares patogênicas.

Uma grande variedade de micro-organismos com potencial de utilização como probióticos têm sido isolados de grãos de kefir, porém, bactérias são as mais estudadas (GOLOWCZYC et al., 2011).

Entretanto, Romanin et al. (2010) avaliaram a atividade antiinflamatória de 21 leveduras, sendo que as dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia*, isoladas do kefir, foram 100% eficientes para a inibição da inflamação no epitélio intestinal, confirmando a importância em se estudar as leveduras que fazem parte da flora microbiana do kefir.

Leveduras isoladas de Kefir Argentino foram identificadas e avaliadas em relação ao seu potencial probiótico, 34 estirpes foram isoladas e identificadas por meio de métodos microbiológicos clássicos e genética molecular clássica, destas, 13 isolados apresentaram-se resistentes aos sais biliares. Além da resistência, *K. marxianus* CIDCA 8154 e *S. cerevisiae* CIDCA 8112 também apresentaram capacidade de adesão às células epiteliais do intestino e a sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal de ratos Balb/c. Os autores concluíram que mais estudos devem ser realizados, mas os resultados obtidos devem, no entanto, ser útil para o desenvolvimento de novos produtos probióticos com base nas diferentes cepas de levedura isoladas de kefir (DIOSMA, et al. 2013).

2.2 Leveduras probióticas

Os primeiros relatos clínicos na literatura para a aplicação de probióticos foram feitos em relação ao tratamento de doenças infecciosas, de origem viral ou bacteriana, diarreia associada a antibióticos, alívio de doenças inflamatórias intestinais crônicas, imuno-modulação, redução do colesterol, diminuição do risco de câncer de cólon, melhora na digestão da lactose, redução de alergias, e efeito sobre a microbiota intestinal (SAAD et al., 2013).

Dentre os probióticos, as bactérias ácido lácticas (BALs), como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, compreendem os gêneros de micro-organismos mais importantes e estudados, porém algumas leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* também podem ser utilizadas para essa finalidade (SAAD et al., 2013).

Nas últimas décadas, as leveduras têm sido consideradas como um dos micro-organismos que apresentam potencial probiótico, porém, apresentando foco maior na produção animal (FLEET, 2007; JACQUES & CASAREGOLA, 2008). As leveduras são micro-organismos eucarióticos unicelulares que podem ser isoladas de muitos alimentos (ARROYO-LÓPEZ et al., 2012).

Os parâmetros mais importantes para a seleção de leveduras com potencial probiótico e starter devem ser os seguintes: viabilidade tecnológica (crescimento em função da temperatura, do pH, teor de sal, atividades enzimáticas e performances tecnológicas) e características funcionais (sobrevivência em pH baixo e em presença de sais biliares, resistência a antibióticos, adesão e/ou a permanência no intestino) (BEVILACQUA et al., 2009).

A levedura *Saccharomyces boulardii* é a representante mais importante destes micro-organismos probióticos, sendo uma das primeiras e praticamente a única comercializada na medicina humana, onde é utilizada na forma liofilizada (PERITI & TONELLI, 2001). Esta levedura foi descoberta por um microbiologista francês, Henri Boulard em 1920, quando estava na Indo-China em busca de novas linhagens de leveduras que poderiam ser utilizadas em processos fermentativos. O pesquisador, durante um surto de cólera na região, notou que algumas

pessoas bebiam um chá especial e não desenvolviam a doença. Esse chá era elaborado com frutas, Lichia e manga, na qual micro-organismos foram isolados e, uma nova linhagem de levedura foi encontrada, sendo então, denominada *Saccharomyces boulardii* (MCFARLAND, 2010).

A levedura *S. boulardii* tem sido utilizada há anos como agente bioterapêutico, administrado via oral, no tratamento de uma gama de distúrbios diarreicos tais como a diarreia associada ao uso de antibióticos, gastroenterite aguda em adultos e crianças, diarreia em pacientes alimentados por sonda, diarreia crônica em pacientes HIV-infectados e, tem sido considerado útil contra agentes enteropatogênicos (MARTINS et al., 2005a; CZERUCKA et al. 2007; FLEET, 2007; PENNACCHIA et al., 2008). Alguns dos exemplos de ação da *S. boulardii* é no lúmen intestinal, onde a mesma tem a capacidade de interferir em toxinas patogênicas, preservar a fisiologia celular, interferir com o patógeno, interagir com microbiota normal ou ajudar no restabelecer os níveis de ácidos graxos de cadeia curta. A *S. boulardii* também pode atuar como um imune regulador, tanto dentro do lúmen como sistemicamente (MCFARLAND, 2010).

Pesquisas recentes, realizadas no Brasil, demonstraram o efeito positivo do uso de *S. boulardii* na recuperação de ratos infectados com doenças parasitárias como a toxocaríase (ÁVILA et al., 2012).

Martins et al. (2013) avaliaram a proteção da levedura *S. boulardii* contra *Salmonella typhimurium*, os resultados mostraram que a levedura pode ser útil como adjuvante em ratos doentes, infectados com febre tifóide, mesmo quando iniciada após o aparecimento da doença, uma possibilidade que deve ser testada em ensaios clínicos bem controlados.

Outras aplicações da levedura *S. boulardii* estão sendo avaliadas; estudo recente demonstrou a capacidade de microencapsulação de proteína de soro contendo *S. boulardii*, por spray dryer, o resultado positivo desta técnica demonstra alto potencial de sobrevivência da levedura estudada, bem como o posterior uso destas microcápsulas em alimentos (DUONGTHINGOC et al, 2013).

Thomas et al. (2014) encapsularam *S. boulardii* através da técnica camada por camada (*layer-by-*

layer), utilizando polieletrólitos de cargas opostas, quitosana e sulfato de dextrano para proteger a levedura da degradação durante seu trânsito gastro-intestinal. Os resultados demonstraram que a técnica de encapsulação utilizada apresentou proteção eficaz e pode ser potencialmente utilizada para melhorar aplicações terapêuticas da levedura.

Embora a maioria dos estudos estejam relacionados à levedura *S. boulardii*, Martins et al. (2005b) asseguraram que outras linhagens de *Saccharomyces* spp. ou outros gêneros de leveduras devem, provavelmente, possuir atividade probiótica similar ou melhor que a *S. boulardii*. Arroyo-López et al. (2012) afirmaram que atualmente existe um grande interesse em encontrar outras cepas de leveduras com características probióticas.

Estudos vêm demonstrando que diferentes gêneros de leveduras apresentam potencial probiótico, García-Hernández et al. (2012) estudaram o potencial probiótico, *in vitro*, de nove leveduras isoladas a partir da excreta de frangos, os resultados provaram que a levedura *Wickerhamomyces anomalus* LV-6 apresentou potencial probiótico em relação aos testes realizados.

Pedersen et al. (2012) identificaram e avaliaram o potencial probiótico de leveduras isoladas de “fura”, um cereal fermentado da África. Avaliou-se a sobrevivência das leveduras em sais biliares, pH baixo, crescimento em células epiteliais e a resistência elétrica transepitelial e, como resultado, novas leveduras com potencial probiótico foram encontradas no estudo, sendo que as espécies avaliadas e caracterizadas como probióticas foram a *Candida krusei*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida tropicalis*, *Candida rugosa* e *Trichosporon asahii*.

Silva et al. (2011) avaliaram o potencial probiótico de leveduras isoladas de azeitonas portuguesas sendo que as espécies *Pichia membranaefaciens* e *Candida oleophila* apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando-se como as leveduras mais promissoras e como possíveis probióticos no estudo.

Uma nova linhagem de *S. cerevisiae*, denominada como UFMG 905, foi isolada da cachaça brasileira e avaliada em relação ao seu potencial probiótico por Martins et al. (2005b), os resultados demonstraram que a levedura foi

capaz de colonizar e sobreviver no trato gastrointestinal de ratos e protegê-los contra infecções experimentais por *Salmonella* enterica sorotipo *typhimurium* e *Clostridium difficile*. Posteriormente, em novo estudo realizado pelos mesmos autores, resultados mostraram que *S. cerevisiae* UFMG 905 foi capaz de reduzir a translocação de *Salmonella typhimurium* e estimular o sistema imunológico de ratos (MARTINS et al., 2007).

Perricone et al. (2014) isolaram leveduras provenientes de Altamura (região sul da Itália) e, resultados satisfatórios foram encontrados quando os autores testaram a capacidade probiótica das mesmas, 18 isolados foram submetidos à seleção para verificar suas características probióticas (sobrevivência em pH 2,5 enriquecido com sais biliares, resistência à antibióticos, atividade antimicrobiana para patógenos de origem alimentar, propriedades hidrofóbicas e produção de biofilme), entretanto, apenas dois isolados (*Saccharomyces cerevisiae* estirpe 2 e *Saccharomyces cerevisiae* estirpe 4) foram selecionados e avaliadas em relação a simulação do trânsito gastrointestinal, estes isolados mostraram uma tendência semelhante à *S. boulardii* em relação ao seu potencial probiótico.

Os resultados satisfatórios das avaliações de novas leveduras com potenciais probióticos demonstram uma nova tendência de mercado em relação à estes micro-organismos, entretanto, a maioria das pesquisas não contemplam uma adequada aplicação destes novos probióticos em alimentos.

2.3 Sorvete

Devido ao grande interesse na utilização de probióticos hoje em dia e, também, pelo estímulo da Organização Mundial da Saúde na utilização dessa alternativa ao uso dos antibióticos, grandes laboratórios e centros de pesquisas vem investindo nesta linha de pesquisa (MARTINS et al., 2013).

Derivados lácteos, como iogurtes e leites fermentados, constituem 90% dos produtos no mercado probiótico (COUSIN et al., 2012). No entanto, novos produtos estão sendo introduzidos no mercado internacional como fontes de probióticos, sobremesas à base de leite, leite em pó para recém-nascidos, sorvetes,

manteiga, maionese, vários tipos de queijos, produtos sob a forma de cápsulas ou em pó para ser dissolvido em bebidas geladas e alimentos fermentados de origem vegetal são alguns exemplos de alimentos que podem conter probióticos (CHAMPAGNE et al., 2005; KOMATSU et al., 2008; SAAD, 2006).

Vários fatores que afetam a viabilidade dos probióticos têm sido relatados em produtos lácteos fermentados, incluindo a acidez titulável, o valor de pH e peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, a interação com outros micro-organismos contidos nos produtos, a concentração de ácido láctico e acético, além da concentração de proteínas (CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

A recomendação brasileira para alimentos probióticos baseia-se na porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC (unidade formadora de colônia) (ANVISA, 2008).

Para a obtenção desse valor, as leveduras podem ser administradas liofilizadas, sendo as mesmas rapidamente eliminadas após interrupção da terapia e não são afetadas pelo uso de medicamentos antibacterianos, sendo estas, as vantagens de se trabalhar com esse tipo de micro-organismo (MARTINS et al., 2005).

Outra alternativa é a microencapsulação desses micro-organismos, em estudo realizado por Arslan et al. (2015) os autores testaram a microencapsulação da levedura *Saccharomyces boulardii* com seis diferentes materiais de parede (gelatina, concentrado proteico de soro de leite, amido modificado, maltodextrina, isolado de proteína de ervilha e goma arábica) e em temperaturas diferenciadas, os resultados mostraram que o maior rendimento de produto foi obtido com concentrado proteico de soro e goma arábica. A sobrevivência da *S. boulardii* não se alterou com os materiais de parede, a sobrevivência em um teste de solução gástrico simulado a diferentes níveis de pH e durações mostrou que a goma arábica é o melhor material de parede, seguido por gelatina e proteína de ervilha. As microcápsulas produzidas pelo valor mais elevado da temperatura de secagem (125°C) apresentaram uma resistência mais elevada à solução gástrica do que aqueles da temperatura de secagem inferior (80°C).

A matriz de sorvete pode ser um bom veículo para culturas probióticas, devido à sua composição, que inclui proteínas do leite, gorduras e lactose, bem como outros compostos (vitaminas e sais minerais). Além disso, o fato de ser um produto congelado certamente contribui para a viabilidade dos micro-organismos (CRUZ et al., 2009).

Pesquisas vêm demonstrando que o sorvete pode ser um veículo adequado para micro-organismos probióticos, um exemplo são os estudos realizados por Alamprese et al. (2002, 2005) onde avaliaram a influência de *Lactobacillus johnsonii* La1 e de *L. rhamnosus* GG em sorvetes com diferentes formulações, com variações nas quantidades de açúcar e de gordura. Elevadas taxas de sobrevivências dos probióticos durante o armazenamento dos produtos foram encontradas, por, respectivamente, oito meses e 365 dias, sem decréscimo na população inicialmente inoculada (7 e 8 log UFC g^{-1} , respectivamente). As propriedades tecnológicas não foram influenciadas pela presença dos probióticos em ambos os estudos.

Basyigit et al. (2006) também estudaram o sorvete como veículo de probióticos, os autores testaram uma mistura de cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *L. agilis* e *L. rhamnosus* de origem humana e verificaram que a viabilidade dos probióticos não foi alterada durante o armazenamento de sorvete, por até seis meses, independentemente da presença de açúcar ou aspartame como edulcorantes.

Homayouni et al. (2008) elaboraram dois tipos de sorvetes simbióticos contendo *Lactobacillus casei* (Lc-01) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) na forma livre e encapsulada. Os resultados mostraram que quando as bactérias probióticas foram encapsuladas houve um aumento de 30% na sobrevivência dos probióticos quando comparadas com os micro-organismos livres, durante o mesmo período de armazenamento na mesma temperatura.

Em trabalho realizado por Silva et al. (2015) as características físico-químicas, comportamento fusão e propriedades sensoriais de sorvete de leite de cabra produzidos com e sem a bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 foram analisados, após 120 dias de armazenamento congelado, uma taxa de sobrevivência de 84,7% das bactérias foi registrado, os autores concluíram que o sorvete

de leite de cabra é um veículo adequado para a entrega probiótico *B. animalis* bactérias..

Aliados a este aspecto, a ampla aceitação dos sorvetes, tanto por parte do público infantil, infante-juvenil e adulto quanto do público da terceira idade, e o crescimento do seu consumo interno, estimulam a continuidade de estudos visando ao desenvolvimento de sorvetes funcionais (CRUZ et al., 2011).

3. Declaração de Direito Autoral

Declaramos que o presente artigo é original e não foi submetido à publicação em qualquer outro periódico nacional ou internacional, quer seja em parte ou na íntegra. Declaramos ainda, que após publicado pela Ciência e Natura, ele jamais será submetido a outro periódico. Também temos ciência que a submissão dos originais à Ciência e Natura implica transferência dos direitos autorais da publicação digital e impressa e, a não observância desse compromisso, submeterá o infrator a sanções e penas previstas na Lei de Proteção de Direitos Autorais (nº9610, de 19/02/98).

4. Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.

5. Conclusões

Inclua suas conclusões aqui. Morbi luctus, wisi viverra faucibus pretium, nibh est placerat odio, nec commodo wisi enim eget quam. Quisque libero justo, consectetuer.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos revisores, colaboradores e agências de foment como CAPES e CNPQ.

Referências

ALAMPRESE, C. et al. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream.

International Journal Dairy Technol., v.58, p.200-206, 2005.

ALAMPRESE, C. et al. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. *International Dairy Journal*, v.12, p.201-208, 2002.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos: lista de alegações de propriedades funcionais aprovadas.** Atualizado em julho de 2008. Disponível em:http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acessado em 02/09/2015.

ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.

ARROYO-LÓPEZ, F. N. Yeasts in table olive processing: Desirable or spoilage microorganisms? *International Journal of Food Microbiology*, v.160, p. 42–49, 2012.

BEVILACQUA, A. et al. Technological and spoiling characteristics of the yeast microflora isolated from Bella Di Cerignola table olives. *International Journal of Food Science and Technology*, v. 44, p. 2198-2207, 2009.

BASYIGIT, G. et al. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. *Journal Microbiology Biotechnology*, v.33, p.796-800, 2006.

BERGMANN, R. S. O. et al., Microbial profile of a kefir sample preparations – grains in natura and lyophilized and fermented suspension. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 4, p. 1022-1026, 2010.

CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with

- whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v.113, p.186-193, 2012.
- CHAMPAGNE, C. P. et al. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61–84, 2005.
- CHIFIRIUC, M. C. et al. *In vitro* assay of the antimicrobial activity of kephir against bacterial and fungal strains. **Anaerobe**, v.17, p.433-435, 2011.
- CHEN, P. et al. Screening for potential new probiotic based on probiotic properties and α -glucosidase inhibitory activity. **Food Control**, v. 35, p. 65-72, 2014.
- COUSIN, F. J. et al. The first dairy product exclusively fermented by *Propionibacterium freudenreichii*: A new vector to study probiotic potentialities in vivo. **Food Microbiology**, v. 32, p. 135-146, 2012.
- CRUZ, A. G. et al. Sorvetes probióticos e prebióticos. In: SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. (Org.). **Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela. cap 15, p. 359-388. 2011.
- CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1239, 2009.
- CZERUCKA, D. et al. Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 26, n. 767–778, 2007.
- DIOSMA, G. et al. Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. **World Journal Microbiol Biotechnol.** p. 1-11, 2013.
- DUONGTHINGOC, D. et al. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1782-1788, 2013.
- ERTEKIN, B.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Effect of fat replacer on kefir quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 90, p. 543-548, 2009.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **CODEX Standard for Fermented Milks**. Codex Stan, second ed. 2003.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2002. 34p.
- FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-17, 2005.
- FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 27-31, 2010.
- FLEET, G. H. Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.18, p. 170–175, 2007.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, Y. Identification and *in vitro* screening of avian yeasts for use as probiotic. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 798–802, 2012.
- GOLOWCZYC, M. A., et al. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v.144, p. 556–560, 2011.
- GULITZ, A. The microbial diversity of water kefir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011.
- GUZEL-SEYDIM, Z. et al. Review: functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 261–268, 2011.
- OMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, p. 50–55, 2008.

- JIANZHONG, Z. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26, p. 770–775, 2009.
- JACQUES, N.; CASAREGOLA, S. Safety assessment of dairy microorganisms: The hemiascomycetous yeasts. **International Journal Food Microbiology**, v. 126, p. 321–326, 2008.
- KOMATSU, T. R. et al. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, 2008.
- LEITE, A. M. O., et al., Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food Microbiology**, v. 31, p.215-221, 2012.
- LOPITZ-OTSOA, F. et al. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev Iberoamerican Micology**, v. 23, p. 67-74, 2006.
- MALEKI, D. et al. **Probiotics in Cancer Prevention, Updating the Evidence**. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion 2016, Pages 781–791.
- MARTINS, F. S. et al. Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. **Journal Gen. Appl. Microbiol**, v. 51, p. 83-92, 2005a.
- MARTINS, F. S.; et al. Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro*. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 5, p. 14-20, 2005b
- MARTINS, F. S. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. **Journal Med. Microbiology**, v. 56, p. 352–359, 2007.
- MARTINS, F. S., et al. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 15, p. 270-279, 2013.
- MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal Gastroenterology**, v. 16, n. 18, p. 2202-2222, 2010.
- MIGUEL, M. G. C. P. et al. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v. 42, p. 1523-1528, 2010.
- NAMBOU, K. et al. A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**, v. 34, n. 2, p. 237-246, 2014.
- PEDERSEN, L. L. et al. Biodiversity and probiotic potential of yeasts isolated from Fura, a West African spontaneously fermented cereal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, p. 144–151, 2012.
- PENNACCHIA, C., et al. Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different food matrices and their preliminary selection for a potential use as probiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1919-1928, 2008.
- PERITI, P.; TONELLI, F. Preclinical and clinical pharmacology of biotherapeutic agents: *Saccharomyces boulardii*. **J Chemother**, v. 13, p. 473–493, 2001.
- PERRICONE, M. Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products. **Food Microbiology**, v. 38, p. 26-35, 2014.
- PLESSAS, S. et al. Bread making using kefir grains as baker's yeast. **Food Chemistry**, v. 93, p. 585–589, 2005.
- ROMANIN, D. et al. Downregulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **Int J Food Microbiology**, v. 140, p. 102–108, 2010.

- SAAD, S. M. I. Probiotics and prebiotics: The state of the art. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 1–16, 2006.
- SAAD, S. M. I. et al. **Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. Ed. São Paulo, Livraria Varela, 2011.
- SAAD, N. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic Field. **LWT - Food Science and Technology**. v. 50, p. 1-16, 2013.
- SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. **British Journal of Nutrition**, v. 109, p. 280-290, 2007.
- SILVA, P. D L da et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk: Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**. v. 62, n. 1, part 2, 2015, p. 452–457, 2015.
- SILVA, T. et al. Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behavior. **LWT- Food Science and Technology**, v. 44, p. 1349–1354, 2011.
- STADIE, J. et al. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. **Food Microbiology**, v. 35, p. 92-98, 2013.
- SURIASIH, K. Microbiological and Chemical Properties of Kefir Made of Bali Cattle Milk. **Food Science and Quality Management**. v. 6, 2012.
- TAMIME, A. Y. et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 34, p. 251-261, 2001.
- TAS, T. B. K. K. et al. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 126-131, 2012.
- THOMAS, M. B. et al. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. **Journal of Food Engineering**, v. 136, p. 1–8, 2014.
- URAZ, G. et al. Isolation of yeast from microflora of kefir. **Abstracts / Journal of Biotechnology**. v. 161S, p. 19–48, 2012.
- VINDEROLA, C. G. et al. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal Dairy Reserch**, v.72, p.195-202, 2005a.
- VINDEROLA, C. G. et al. Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response. **European Journal Inflamm.** v. 3, p. 63–73, 2005b.
- VINDEROLA, C. G. et al. Effects of kefir fractions on innate immunity. **Immunobiology**, v. 211, p. 149–156, 2006.
- WANG, S-Y., et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, v. 32, p. 274-285, 2012.
- WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 34, n 367/368, p. 48-55, 2009.
- WITTHUHN, R. C. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, v.22, p.337-344, 2004.
- WITTHUHN, R.C. et al. Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v.15, p. 383–389, 2005.
- WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 91–109, 2002.
- YANG, Z. et al. Symbiosis between microorganism from Kombucha and Kefir: Potential significance to the enhancement of

kombucha function. **Applitive Biochemical and Biotechnology**, v. 107, p. 8361–8366. 2008.

YANG, Y. et al. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. **Journal of Archaeological Science**. v. 45, p. 178-186, 2014.