

LUCIANA NOGUEIRA GONTIJO

AVALIAÇÃO DO CONSUMO CRÔNICO DE LEITE E KEFIR SOBRE OS  
NÍVEIS PRESSÓRICOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RENAIIS DE  
RATOS SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) INDUZIDOS À SÍNDROME  
METABÓLICA

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência da Nutrição, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

**T**

G641a  
2014  
Gontijo, Luciana Nogueira, 1983-  
Avaliação do consumo crônico de leite e kefir sobre os níveis pressóricos, parâmetros bioquímicos e renais de ratos SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) induzidos à síndrome metabólica. / Luciana Nogueira Gontijo. – Viçosa, MG, 2014. xv, 72f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Hipertensão. 2. Leite fermentado - Consumo.  
3. Insuficiência renal. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Nutrição e Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciência da Nutrição. II. Título.

CDD 22. ed. 616.132

LUCIANA NOGUEIRA GONTIJO

AVALIAÇÃO DO CONSUMO CRÔNICO DE LEITE E KEFIR SOBRE OS  
NÍVEIS PRESSÓRICOS, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E RENAIS DE  
RATOS SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) INDUZIDOS À SÍNDROME  
METABÓLICA

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Viçosa, como parte das  
exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência da Nutrição, para  
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 27 de fevereiro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
Solange Mara Bigonha

  
\_\_\_\_\_  
Ana Iris Mendes Coelho  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Maria do Carmo Gouyeia Peluzio  
(Orientadora)

*À minha mãe Vanilda e ao meu pai Azis, pelo incentivo aos estudos e exemplo de dedicação.*

*Ao meu querido Márcio Mattiello, pelo amor desses anos.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por me conceder a vida, saúde e discernimento para que eu concluísse mais essa etapa.*

*À “mãe” e ao “pai”, pelo amor, apoio e ensinamentos.*

*À minha orientadora, Professora “Carminha”, por ter aceitado esse desafio na orientação, pelos ensinamentos técnicos, ensinamentos de vida, pela confiança depositada em mim e pela compreensão nos momentos de dificuldade. Sou eternamente grata a você.*

*À Professora Ana Íris, por toda a disponibilidade, atenção, pelas sugestões, pelas colaborações científicas e pelo carinho com que olhou para mim e meu trabalho.*

*Ao Professor Clóvis, pelo apoio e pela disponibilidade na coorientação deste trabalho.*

*À Dra. Solange, por ter aceitado o convite, pela disponibilidade e contribuição científica ao avaliar este trabalho.*

*Ao Professor Carlos Augusto Cabral (Guto), pelas oportunidades de aprendizado, conselhos, pelo exemplo de conduta profissional e, principalmente, pelo estímulo contínuo à pós-graduação.*

*À Zita, pelo cuidado, carinho e pela atenção!*

*Ao grupo do Laboratório de Bioquímica Nutricional, por terem me recebido de braços abertos e contribuírem dia após dia para o desenvolvimento deste trabalho. Nathane, Mayra, Natália Tafuri, Flávia, Carol, Sandra, Mary, Letícia, Patrícia, Manoela, Toninho e Solange, vocês estão em meu coração!*

*À colega de laboratório Damiana, por toda assistência, pelos ensinamentos, pela paciência e parceria no dia a dia de laboratório. Você foi “peça” fundamental nesse quebra cabeça. Muito obrigada!*

*À colega Lisiane, por toda dedicação, atenção, pela paciência em seus ensinamentos e por ter acreditado tanto quanto eu que “ela está lá”, rs!!! Enfim, por toda ajuda durante essa jornada!*

*À “garota morcego” Jerusa, pela recepção, pelo exemplo de dedicação, pelos ensinamentos metodológicos e pela grande ajuda e amizade. Meu muito obrigada!*

*À colega Camila Chagas, pelo carinho, atenção e pelo comprometimento ao me auxiliar em mais uma etapa. Você é 10!*

*Aos funcionários, membros e parceiros do Laboratório de Nutrição Experimental (DNS/UFV), em especial a Fabiana e Renata, por toda atenção e disponibilidade.*

*Aos funcionários e membros do Laboratório de Associação de Micorrizas (DMB/UFV), por toda atenção e disponibilidade para a conclusão de mais uma etapa deste trabalho. Em especial, à Professora Catarina e aos estudantes Marliane e Bruno.*

*Aos técnicos do Laboratório de Fertilidade do Solo (DPS/UFV), principalmente ao Professor Mattiello e aos alunos Wedisson e Patrícia.*

*Ao Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde – UFV, e principalmente ao Alexandre, por ter disponibilizado espaço para a realização das análises laboratoriais, parte essencial deste trabalho. À Emília, pela confiança e compreensão nos dias em que precisei “sair mais cedo”, rs.*

*Ao colega de trabalho Paulo, pelo apoio e pelas sugestões. À colega de trabalho “Cida Palhacinha” e “Flávia Gláucia”, pela atenção e responsabilidade na realização das análises laboratoriais.*

*Ao programa REUNI e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.*

*A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste trabalho.*

*Meus sinceros agradecimentos!*

## **BIOGRAFIA**

LUCIANA NOGUEIRA GONTIJO, filha de Azis Nogueira Gontijo e Vanilda Nogueira Gontijo, nasceu em 5 de agosto de 1983, em Divinópolis - MG.

Em dezembro de 2001, concluiu o ensino médio no Centro de Ensino Integral, Divinópolis - MG.

Em maio de 2002, ingressou na Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em Educação Física em outubro de 2006.

Em março de 2007, ingressou no curso de Nutrição nesta mesma universidade, graduando-se em julho de 2011.

Em março de 2012, iniciou o mestrado em Ciência da Nutrição na Universidade Federal de Viçosa, sob orientação da Professora Maria do Carmo Gouveia Peluzio, concluindo-o em fevereiro de 2014.

## SUMÁRIO

<i>Lista de Figuras</i> .....	viii
<i>Lista de Tabelas</i> .....	viii
<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i> .....	ix
<i>Resumo</i> .....	x
<i>Abstract</i> .....	xiii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. <i>Objetivo Geral</i> .....	4
2.2. <i>Objetivos Específicos</i> .....	4
3. REFERÊNCIAS.....	5
4. <b>CAPÍTULO 1:</b> Produção e caracterização do kefir produzido a partir de leite com diferentes concentrações de lipídeo.....	7
4.1. <i>Resumo</i> .....	7
4.2. <i>Abstract</i> .....	9
4.3. INTRODUÇÃO.....	10
4.4. METODOLOGIA.....	13
4.4.1. <i>Obtenção do kefir de leite</i> .....	13
4.4.2. <i>Contagem de bactérias ácido-lácticas totais (BAL) e de leveduras totais</i> .....	14
4.4.3. <i>Composição centesimal do leite e do kefir de leite</i> .....	14
4.4.4. <i>Acidez e pH</i> .....	15
4.4.5. <i>Extração de lipídeos totais</i> .....	15
4.4.6. <i>Saponificação e Esterificação</i> .....	16
4.4.7. <i>Identificação dos ésteres metílicos</i> .....	16
4.5. RESULTADOS.....	17
4.6. DISCUSSÃO.....	19
4.7. CONCLUSÕES.....	24
4.8. REFERÊNCIAS.....	25
5. <b>CAPÍTULO 2:</b> Avaliação da influência do consumo crônico de kefir sobre níveis pressóricos e parâmetros renais de ratos SHR induzidos à síndrome metabólica.....	29
5.1. <i>Resumo</i> .....	29
5.2. <i>Abstract</i> .....	31
5.3. INTRODUÇÃO.....	33



5.4. METODOLOGIA.....	35
5.4.1. <i>Produção do kefir</i> .....	35
5.4.2. <i>Modelo Experimental</i> .....	36
5.4.2.1. <i>Modelo animal</i> .....	36
5.4.2.2. <i>Período neonatal e lactação</i> .....	37
5.4.2.3. <i>Desenvolvimento da síndrome metabólica</i> .....	37
5.4.2.4. <i>Avaliação da pressão arterial</i> .....	38
5.4.2.5. <i>Glicemia de jejum</i> .....	38
5.4.2.6. <i>Crescimento</i> .....	38
5.3.2.7. <i>Eutanásia</i> .....	39
5.3.2.8. <i>Amostras de sangue</i> .....	39
5.3.2.9. <i>Dissecação dos órgãos</i> .....	39
5.4.2.10. <i>Análise de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL séricos</i> .....	40
5.4.3. <i>Procedimentos analíticos para avaliação da função renal</i> .....	40
5.4.3.1. <i>Dosagem de ureia</i> .....	40
5.4.3.2. <i>Dosagem de creatinina</i> .....	40
5.4.3.3. <i>Microalbuminúria</i> .....	41
5.4.3.4. <i>Dosagem de sódio e potássio</i> .....	41
5.4.4. <i>Análise da atividade enzimática renal</i> .....	41
5.4.4.1. <i>Catalase (CAT)</i> .....	41
5.4.4.2. <i>Superóxido dismutase (SOD)</i> .....	42
5.4.4.3. <i>Glutathione S-Transferase (GSH)</i> .....	42
5.4.5. <i>Análise Histológica do rim</i> .....	43
5.4.5.1. <i>Procedimento Histológico</i> .....	43
5.4.5.2. <i>Fotomicrografia</i> .....	43
5.4.5.3. <i>Análise morfométrica do rim</i> .....	43
5.4.6. <i>Análises estatísticas</i> .....	44
5.5. RESULTADOS.....	44
5.6. DISCUSSÃO.....	53
5.7. CONCLUSÕES.....	61
5.8. REFERÊNCIAS .....	62

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fluxograma para a produção de kefir de leite de vaca.....	<b>37</b>
<b>Figura 2.</b>	Consumo alimentar total dos animais durante o período experimental (10 semanas).....	<b>45</b>
<b>Figura 3.</b>	Evolução ponderal dos animais alimentados com dieta comercial, recebendo leite e kefir derivado. Resultados estão expressos em média do peso em gramas.....	<b>46</b>
<b>Figura 4.</b>	Coeficiente de eficiência alimentar (CEA).....	<b>46</b>
<b>Figura 5.</b>	Microalbuminúria nos tempos inicial e final.....	<b>51</b>
<b>Figura 6.</b>	Área glomerular.....	<b>53</b>
<b>Figura 7.</b>	Tecido renal incluído em parafina e corado com HE (hematoxilina e eosina).....	<b>54</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Análise microbiológica de duas amostras de leite e do kefir derivado.....	<b>18</b>
<b>Tabela 2.</b>	Composição centesimal (100 mL), ácido láctico e pH de duas amostras de leite e do kefir derivado.....	<b>19</b>
<b>Tabela 3.</b>	Perfil de ácidos graxos de duas amostras de leite e do kefir derivado.....	<b>20</b>
<b>Tabela 4.</b>	Valores de pressão arterial e parâmetros bioquímicos de ratos SHR submetidos ao consumo crônico de leite e kefir derivado.....	<b>48</b>
<b>Tabela 5.</b>	Parâmetros bioquímicos renais.....	<b>50</b>
<b>Tabela 6.</b>	Enzimas do estresse oxidativo (catalase, superóxido dismutase e glutatona S-transferase).....	<b>52</b>
<b>Tabela 7.</b>	Concentração de sódio e potássio da urina e soro de ratos submetidos ao consumo crônico de leite e kefir derivado.....	<b>53</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BAL – Bactérias do ácido láctico

CAT – Catalase

Grupo Kefir B – grupo de animais que consumiram kefir produzido com leite (3,5 % lipídeo)

Grupo Kefir A – grupo de animais que consumiram kefir produzido com leite (5,5 % lipídeo)

Grupo Leite A – grupo de animais que consumiram leite (5,5 % lipídeo)

Grupo Leite B – grupo de animais que consumiram leite (3,5 % lipídeo)

Grupo controle (MSG+Sal) – grupo controle de animais que foram induzidos com glutamato monossódico e receberam solução salina

GSH – Glutathione S-transferase

K<sup>+</sup> - potássio

Kefir B – Kefir de leite (3,5 % de lipídeo)

Kefir A – Kefir de leite (5,5 % de lipídeo)

Leite B – Leite (3,5 % de lipídeo)

Leite A – Leite (5,5 % de lipídeo)

Na<sup>2+</sup> - sódio

PAD – Pressão arterial diastólica

PAS – Pressão arterial sistólica

SHR – Spontaneously Hypertensive Rats

SM – Síndrome metabólica

SOD – Superóxido Dismutase

## RESUMO

GONTIJO, Luciana Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Avaliação do consumo crônico de leite e kefir sobre os níveis pressóricos, parâmetros bioquímicos e renais de ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) induzidos à síndrome metabólica.** Orientadora: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Coorientadores: Ana Íris Mendes Coelho e Clóvis Andrade Neves.

**Objetivo:** Avaliar a influência do consumo crônico de leite e kefir sobre os níveis pressóricos, parâmetros bioquímicos e renais de ratos machos SHR induzidos à SM. **Metodologia:** Inoculou-se 5 g de grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca pasteurizado com diferentes teores de lipídeos (5,5 % e 3,5 %), a 4 °C. As amostras foram incubadas em estufa a temperatura controlada de 25 ± 2 °C, por 24 horas. Nessas amostras foram determinadas a umidade, o teor de cinzas, proteínas, carboidratos, lipídeos totais, o pH e a acidez. A determinação do perfil de ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa, após extração, saponificação e esterificação. A contagem de bactérias lácticas e leveduras totais foi feita pelo método de plaqueamento em superfície, a partir de diluições decimais sucessivas das amostras. Foram utilizados 35 ratos machos SHR. Do 2º ao 7º dia de vida, os filhotes foram submetidos ao protocolo de indução da SM. Injeções subcutâneas foram administradas na região cervical, na concentração de 4 mg MSG/g de peso corporal. Após 12 semanas, para confirmação da SM, os animais foram submetidos à avaliação da pressão arterial, glicemia de jejum e à pesagem. Posteriormente, os animais foram subdivididos em cinco grupos: Leite A (leite com 5,5 % de lipídeo), Kefir A (kefir de leite com 5,5 % de lipídeo), Leite B (leite com 3,5 % de lipídeo), Kefir B (kefir de leite com 3,5 % lipídeo) e grupo controle (MSG+Sal). Em seguida, os animais foram transferidos para gaiolas individuais, passando a receber a dieta comercial e kefir (1 mL/animal) via gavagem, diariamente, por 10 semanas. O ganho de peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram registrados semanalmente. Ao final do período experimental, os animais foram dessensibilizados com isoflurano e eutanasiados com tiopental. O sangue foi coletado por punção na artéria aorta abdominal, e os rins foram removidos para análises. Colesterol total, fração HDL-colesterol e triglicerídeos foram determinados por meio do método enzimático colorimétrico. Para análise

bioquímica da função renal, foram determinadas as concentrações de ureia, creatinina, microalbuminúria, sódio e potássio. Foram determinadas as atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GSH) citosólica. Para análise histológica, os rins foram submetidos às etapas de fixação, desidratação, inclusão em parafina e, após a microtomia, corados com hematoxilina e eosina (HE). **Resultados:** A caracterização microbiológica do leite e do kefir evidenciou expressivo crescimento microbiano com o processo de fermentação: de aproximadamente cinco ciclos log para BAL e dois para leveduras. A umidade do Kefir A e do Kefir B foi maior do que a do Leite A ou Leite B. Com o processo de fermentação, houve redução dos teores de proteínas e lipídeos e elevação dos teores de ácido láctico, o que promoveu redução do pH do kefir. Observou-se redução de 17,5 % dos teores de carboidratos para o Kefir B e de apenas 2,3 % para o Kefir A. O perfil lipídico das amostras de leite e do kefir revelou a presença de 15 ácidos graxos. As amostras de kefir apresentaram níveis mais elevados para a maioria dos ácidos graxos (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1t, C18.1c ω9). As amostras de leite apresentaram maiores teores de ácidos graxos C20:2, C20:4, assim como os ácidos graxos essenciais linoleico (C18.2c ω6 – Leite A) e α-linolênico (C18.n3 ω3 – Leite B). O consumo alimentar e o ganho de peso foram similares entre os grupos ao longo do período experimental. Contudo, o coeficiente de eficiência alimentar foi significativamente maior no grupo Kefir B ( $p < 0,05$ ). Ao final do período experimental, observou-se redução da PAS no grupo Leite B e elevação dos níveis de glicemia sanguínea nos grupos Leite A e Kefir A. Os níveis de colesterol total e HDL-colesterol apresentaram-se mais elevados no grupo controle (MSG+Sal). Os níveis de triglicerídeos, a concentração de creatinina plasmática e o *clearance* de creatinina não diferiram significativamente entre os grupos. A concentração de ureia plasmática foi maior no grupo Leite A e menor no grupo Leite B. Houve redução na concentração de microalbumina urinária nos grupos Leite A, Kefir A e Kefir B e aumento no grupo controle (MSG+Sal). A atividade da SOD foi maior nos grupos Leite B e Kefir B. O consumo de leite e kefir não influenciou significativamente a atividade da CAT. A excreção de  $\text{Na}^{+2}$  não diferiu entre o grupo controle e aqueles que consumiram leite e kefir, porém a excreção de  $\text{K}^{+}$  foi maior no grupo controle (MSG+Sal). Em relação à

análise histológica dos rins, observou-se aumento significativo da área glomerular nos animais do grupo controle (MSG+Sal). **Conclusão:** O kefir apresentou características de um produto fermentado com potencial probiótico e considerando suas características nutricionais como baixo teor de lipídeos, controle da ingestão alimentar, ganho de peso e pressão arterial, e a não alteração nos parâmetros renais que evidenciasse quadro patológico, pode ser considerado um alimento adequado para o consumo, como parte de uma dieta saudável.

## ABSTRACT

GONTIJO, Luciana Nogueira, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2014. **Evaluation of chronic consumption of milk and kefir on blood pressure levels, biochemical and renal parameters of SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) induced metabolic syndrome.** Adviser: Maria do Carmo Gouveia Peluzio. Co-advisers: Ana Íris Mendes Coelho e Clóvis Andrade Neves.

**Objective:** To evaluate the influence of chronic consumption of milk and kefir on blood pressure levels, biochemical and renal parameters of Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) induced the metabolic syndrome (SM). **Methodology:** 5 g of kefir grains were inoculated in 100 mL of pasteurized cow milk with different lipids content (5.5% and 3.5%), at 4 °C. Samples were incubated at a controlled temperature of  $25 \pm 2$  °C, during 24 hours. In these samples were determined moisture, ash, protein, carbohydrates, total fat, pH and acidity. Fatty acid profile was determined by gas chromatography after extraction, saponification and esterification. The lactic acid bacteria count and total yeast was performed by surface plating method from successive decimal dilutions of samples. The assay was carried out with 35 SHR rats. Puppies of SHR male rats with two days of life underwent induction protocol of the MS. Subcutaneous injections, corresponding to a dose of 4 mg of monosodium glutamate (MSG) /g of body weight 2nd to 7th day of life. After weaning (30 days), the animals were kept in collective boxes (4 animals per cage), where now receive Nuvilab® commercial feed and water ad libitum for a period of 12 weeks. After 12 weeks, to confirm the SM, the animals were evaluated for blood pressure, fasting glucose and weighing. Subsequently the animals were divided into 5 groups: Milk A (milk with 5.5% lipid), Kefir A (milk kefir with 5.5% lipid), Milk B (milk with 3.5% lipid), Kefir B (kefir milk with 3.5% lipid), control group (MSG + Sal). Subsequently the animals were transferred to individual cages starting to receive commercial diet and kefir (1 mL / animal) by gavage daily for 10 weeks. The body weight gain and food intake of the animals were recorded weekly. At the end of the experimental period the animals were desensitized with isoflurane and euthanized with thiopental. Blood was collected by puncturing the artery abdominal aorta and kidneys removed for analysis. Total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were determined by the enzymatic

colorimetric method. Biochemical analysis of renal function were evaluated by concentrations of urea, creatinine, microalbuminuria, sodium and potassium. Enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and cytosolic activities of glutathione S-transferase (GSH) were determined. For histological analysis, kidneys were subjected to the steps of fixation, dehydration, paraffin embedding, and after a microtome, stained with hematoxylin and eosin (HE).

**Results:** Microbiological characterization of milk and kefir showed significant microbial growth in the fermentation process of approximately 5 log cycles for BAL and 2 for yeasts. The humidity of Kefir A and Kefir B was higher than that of Milk A or Milk B. The protein and lipids decreased with the fermentation process, and the levels of lactic acid elevated, which promoted pH decrease kefir. There was a reduction of 17.5% of the levels of carbohydrates for Kefir B and only 2.3% for Kefir A. The lipid profile of the samples of milk and kefir revealed the presence of 15 fatty acids. Kefir samples had higher for most fatty acids (C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0, C16: 0, C18: 0, C18: 1T, C18.1c ω9). The milk samples showed higher levels of C20:2, C20:4 fatty acids, as well as the essential fatty acids linoleic (ω6 C18.2c – Milk A) and α-linolenic acid (ω3 C18.n3 – Milk B). Food intake and weight gain were similar between groups throughout the experimental period. However, the coefficient of feed efficiency was significantly higher in group Kefir B (p <0.05). At the end of the experimental period, there was a reduction in SBP in group Milk B and elevated levels of blood glucose in groups Milk A and Kefir A. The levels of total cholesterol and HDL were higher in the control group (MSG + Sal). Triglyceride levels, serum creatinine concentration and creatinine *clearance* did not differ significantly between groups. The concentration of plasma urea was higher in group Milk A and lower in group Milk B. There was a reduction in the concentration of urinary microalbumin in groups Milk A, Kefir A and Kefir B and increased in the control group (MSG + Sal). The consumption of kefir increased SOD activity in groups Milk B and Kefir B, but did not influence significantly the activity of CAT. The excretion of Na did not differ between the control group and those who consumed milk and kefir, but the excretion of K<sup>+</sup> was higher in the control group (MSG + Sal). Regarding the histological analysis of the kidneys, there was significant increase in glomerular area in the control group (MSG + Sal).

**Conclusion:** The kefir has characteristics of a product fermented with



probiotic potential considering its nutritional characteristics, such as low-fat, control of food intake, and body weight and blood pressure. No change in renal parameters was observed. Kefir can be considered an appropriate food for consumption as part of a healthy diet.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A síndrome metabólica (SM) é uma doença contemporânea, multifatorial, caracterizada por obesidade abdominal, resistência à insulina ou diabetes, aumento da pressão arterial e dislipidemia (CHANG et al., 2009; GLUBA et al., 2012).

A definição da SM proposta pelo *Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults* (NCEP-ATP III) é, atualmente, a mais utilizada na prática clínica, por sua simplicidade e praticidade. De acordo com essa definição, são classificados como portadores de SM indivíduos que apresentam três ou mais dos seguintes critérios: circunferência abdominal (CA) elevada, aumento dos níveis de triglicerídeos (TG) séricos (>150 mg/dL), redução da HDL-colesterol (< 40 mg/dL para homens e < 50 mg/dL para mulheres), hipertensão arterial sistêmica (HAS) (>130/85 mmHg) e hiperglicemia de jejum (>100 mg/dL) (I DBSM, 2005). Juntos, esses fatores atuam elevando o risco de danos cardiovascular e renal (HUANG, 2009).

A SM é um problema comum de saúde pública em diversos países (LOCATELLI et al., 2006; GLUBA et al., 2012). No Brasil, estima-se que aproximadamente 28,5 % dos homens e 40,5 % das mulheres apresentem alterações nos parâmetros utilizados para caracterizar a SM (I DBSM, 2005).

A presença da SM é um forte preditor de eventos cardiovasculares. Em pacientes diagnosticados com SM é comum identificar alterações vasculares, como atrofia tubular, fibrose intersticial, esclerose arterial e o diagnóstico da presença de lesão vascular (GLUBA et al., 2012). Em 40 % dos hipertensos com SM tem sido descrita alta prevalência de lesões de órgãos-alvo (KORHONEN et al., 2009), como hipertrofia ventricular esquerda, enrijecimento arterial e aumento da excreção urinária de proteínas (BANACH, RYSZ, 2010).

A obesidade é responsável por 65 a 75% do risco de hipertensão arterial, levando a alterações estruturais nos rins, como a perda da função dos néfrons e, conseqüentemente, disfunção renal e aumento da pressão arterial (HALL et al., 2003). A hiperatividade simpática também contribui para alterações hemodinâmicas e dano glomerular (ISEKI, 2008). Em situações de resistência à insulina e hiperinsulinemia, o sistema nervoso simpático e o

sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) são ativados (BANACH; RYSZ, 2010).

Em estudo desenvolvido por Chen et al. (2004) com indivíduos americanos adultos foi identificada uma forte relação, positiva e significativa, entre a SM risco para a doença renal crônica e a microalbuminúria. O risco para a doença renal crônica e microalbuminúria foi proporcional ao número de componentes da SM.

Estudos epidemiológicos sugerem que consumo de produtos lácteos está inversamente relacionado com o risco de hipertensão. Estudos do *National Health and Nutrition Survey* (NHANES I, 1975) mostraram que o menor consumo de produtos lácteos está associado à maior incidência de hipertensão (JAKALA et al., 2009; CÁNOVAS et al., 2011).

O efeito anti-hipertensor dos produtos lácteos tem sido associado a proteínas do leite (caseínas e soro) e aos produtos de sua degradação, os peptídeos. Quando as proteínas são hidrolisadas, por enzimas digestivas ou por proteases sintetizadas por lactobacilos durante a fermentação láctea, fragmentos de peptídeos biologicamente ativos são formados. Bactérias do ácido láctico com atividade proteolítica (por exemplo, *Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis*) são utilizadas nos processos de fermentação láctea (JAKALA et al., 2009).

Peptídeos bioativos são definidos como pequenos peptídeos, compostos por 3 a 20 aminoácidos, que são liberados durante o processo de fermentação ou durante a digestão (SHAHIDI, ZHONG, 2008; CÁNOVAS et al., 2011). Peptídeos bioativos derivados de diferentes fontes de proteínas de origem animal e vegetal exercem efeitos imunomoduladores *in vitro* e *in vivo* (CÁNOVAS et al., 2011).

Os peptídeos bioativos podem exercer o seu efeito no sistema cardiovascular, digestivo, imunológico e nervoso (KORHONEN, PIHLANTO, 2003), atuando como fatores de crescimento e neurotransmissores (ROBERT; ZALOGA, 1994; CÁNOVAS et al., 2011).

A inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) é o mecanismo anti-hipertensivo de atuação dos peptídeos bioativos mais estudado. A ECA é uma enzima que catalisa a conversão da angiotensina I

(decapeptídeo) em angiotensina II (octapeptídeo), a qual consiste em um composto de elevada capacidade vasoconstritora (CÁNOVAS et al., 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram o efeito modulador dos peptídeos bioativos na inibição da ECA. Um grande número de peptídeos inibidores da ECA é encontrado em produtos lácteos (CÁNOVAS et al., 2011). Os tripeptídeos IPP (isoleucina-prolina-prolina) e VPP (valina-prolina-prolina), isolados a partir da fermentação de um meio à base de leite por *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus helveticus*, inibiram a ação da ECA em ensaio *in vitro* (NAKAMURA et al., 1995; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). A redução na atividade da ECA também foi verificada em estudo com ratos SHR submetidos ao consumo crônico com leite fermentado (60-75 mL/rato/dia), por oito semanas, contendo esses peptídeos (2,8 – 5,2 mg/kg) (JAKALA et al., 2009).

Kefir é um leite fermentado originado no Cáucaso. O que distingue o kefir dos leites fermentados tradicionais é sua composição a partir de grãos de kefir compostos por leveduras e bactérias (LOPITZ-OTSO et al., 2006). Em países soviéticos, o kefir foi informalmente recomendado para o consumo por pessoas saudáveis, a fim de diminuir o risco de doenças crônicas. Também foi fornecido para pacientes em tratamento clínico de doenças gastrointestinais e metabólicas, hipertensão, doença isquêmica cardíaca e alergia (FARNWORTH, 1999; CHEN et al., 2008).

O efeito hipotensor dos potenciais peptídeos inibidores ECA depende da capacidade de atingirem, intactos, os órgãos onde irão realizar sua função. Existem evidências de que peptídeos com atividade inibidora da ECA possam ser absorvidos no trato digestivo e transportados para a corrente sanguínea sem ser hidrolisados por proteases (VERMEIRSEN et al., 2004; CÁNOVAS et al., 2011).

A atividade dos peptídeos anti-hipertensivos presentes nos alimentos, bem como ação fisiológica, nem sempre é avaliada e comprovada em sistemas de modelo animal e humanos. A maioria dos estudos é baseada na mensuração da capacidade inibitória da atividade da ECA *in vitro*, porém sem efeito anti-hipertensivo *in vivo*. Por exemplo, o peptídeo de caseína AS1-f possui ação inibitória da ECA *in vitro*, mas não tem efeito hipotensor

significativo em animais SHR (MARUYAMA et al., 1987). Logo, são necessários estudos baseados em rigorosos ensaios clínicos e experimentais.

Nos últimos anos, a venda de alimentos com alegações funcionais aumentou consideravelmente. Assim, a identificação e a comprovação da eficácia fisiológica dos peptídeos bioativos presentes em derivados lácteos possibilitam a elaboração e oferta de uma dieta personalizada e diversificada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a influência do consumo crônico de leite e kefir de leite sobre os níveis pressóricos e parâmetros renais de ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) induzidos à síndrome metabólica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Caracterizar o leite e o kefir de leite quanto aos macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídeos), umidade e cinzas.
- Caracterizar o kefir considerando os pré-requisitos para classificação de produto fermentado: contagem de bactérias do ácido láctico (BAL) e leveduras, grau de acidez e pH.
- Determinar o perfil lipídico das amostras de leite e kefir de leite.
- Avaliar os níveis pressóricos dos ratos SHR induzidos à síndrome metabólica ao início e final dos tratamentos.
- Avaliar os parâmetros bioquímicos dos animais experimentais.
- Avaliar o potencial antioxidante do leite e kefir de leite sobre os rins dos animais.
- Avaliar histologicamente os rins dos animais experimentais.

### 3. REFERÊNCIAS

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I DBSM). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 84, n. 1, p. 1-28, 2005.

BANACH, M.; RYSZ, J. Current problems in hypertension and nephrology. *Expert Opinion Pharmacother*, v. 11, p. 2575–2578, 2010.

CÁNOVAS, J. M.; RENTERO, P. Z.; ADELA MARTÍNEZ-CACHÁ MARTÍNEZ, A. M-C.; HERNÁNDEZ, M. L.; ALEMÁN, J. A. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, v. 23, p. 219-227, 2011.

CHANG, I. H.; HAN, J. H.; MYUNG, S. C.; KWAK, K. W.; KIM, T. H.; PARK, S. W.; NAK YOUNG CHOI, N. Y.; CHUNG, W. H.; AHN, S. H. Association between metabolic syndrome and chronic kidney disease in the Korean population. *Nephrology*, v.14, n.3, p.321–326, 2009.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, v. 25, p. 492-501, 2008.

FARNWORTH, E.R. Kefir: from folklore to regulatory approval. *Journal Nutraceut Functional & Medical Food*, v.1, n. 4, p. 57- 68, 1999.

GLUBA, A.; MIKHAILIDIS, D. P.; LIP, G.Y.H.; HANNAM, S.; BANACH, J. R. M. Metabolic syndrome and renal disease. *International Journal of Cardiology*, v. 164, p.141-150, 2012.

HALL, J.E.; KUO, J.J.; DA SILVA, A.A.; DE PAULA, R.B.; LIU, J.; TALLAM, L. Obesity-associated hypertension and kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v.12, p.195–200, 2003.

HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DEL MAR CONTRERAS, M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 165, 23–35, 2011.

HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, v. 2, p. 231-237, 2009.

ISEKI, K. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: a Japanese perspective on a worldwide problem. *Journal of Nephrology*, v. 21, p.305–12, 2008.

JAKALA, P.; HAKALA, A.; TURPEINEN, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Casein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro attenuate the development of hypertension and improve endothelial function in salt-loades Goto-Kakizaki rats. *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 4, p.366-374, 2009.

KORHONEN, P.; AARNIO, P.; VESALAINEN, R.; SAARESRANTA, T.; KAUTIAINEN, H.; JÄRVENPÄÄ, S. et al. Hypertensive women with the metabolic syndrome are at risk of renal insufficiency more than men in general population. *Journal of Human Hypertension*, v. 23, n. 2, p.197-104, 2009.

LOCATELLI, F.; POZZONI, P.; DEL VECCHIO, L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *Journal of the American Society Nephrology*, v.17, p.81–85, 2006.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 23, p. 67-74, 2006.

MARUYAMA, S.; MITACHI, H.; AWAYA, J.; KUNORO, M.; TOMIZUKA, N.; SUZUKI, H. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of the C-terminal hexapeptide of as1-casein. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 51, p.2557–2561, 1987.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO N, SAKAI, K.; TAKANO, T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, p.1278-1253, 1995.

ROBERT, P.R.; ZALOGA, G.P. Dietary bioactive peptides. *New Horizons*, v.2, p. 237-243, 1994.

SHAHIDI, A.; ZHONG B. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, v. 91, p. 914-931, 2008.

VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, v. 92, p.357-366, 2004.

## 4. CAPÍTULO 1: Produção e caracterização do kefir produzido a partir de leite com diferentes concentrações de lipídeo

### 4.1. Resumo

**Objetivo:** Caracterizar o leite e o kefir considerando os pré-requisitos para classificação de produto fermentado mediante contagem de bactérias do ácido láctico, leveduras, determinação do grau de acidez e pH. Determinar a composição centesimal (proteína, carboidrato e lipídeos), umidade, cinzas e perfil lipídico. **Metodologia:** Os grãos de kefir foram obtidos na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Foram inoculados 5 g de grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca pasteurizado com diferentes teores de lipídeos (5,5 e 3,5 %), a 4 °C. As amostras foram incubadas em estufa em temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C, por 24 horas. A contagem de bactérias lácticas e leveduras totais foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície, a partir de diluições decimais sucessivas das amostras. Nessas amostras foram determinados a umidade, o teor de cinzas, proteínas, carboidratos e lipídeos totais, o pH e a acidez. O perfil de ácidos graxos foi determinado após extração, saponificação e esterificação. A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa. **Resultados:** A caracterização microbiológica do leite e do kefir evidenciou expressivo crescimento microbiano com o processo de fermentação de aproximadamente 5 ciclos log para BAL e 2 para leveduras. A umidade do Kefir A e do Kefir B foi maior do que do Leite A e Leite B. Com o processo de fermentação, houve redução dos teores de proteínas e lipídeos e elevação dos teores de ácido láctico, o que promoveu redução do pH do kefir. Também foi observada redução de 17,5 % dos teores de carboidratos para o Kefir B e de apenas 2,3 % para o Kefir A. O perfil lipídico das amostras de leite e kefir revelou a presença de 15 ácidos graxos. As amostras de kefir mostraram níveis mais elevados para a maioria dos ácidos graxos (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1t, C18:1c  $\omega$ 9). As amostras de leite apresentaram maiores teores de ácidos graxos C20:2, C20:4, assim como os ácidos graxos essenciais linoleico (C18:2c  $\omega$ 6 – Leite A) e  $\alpha$ -linolênico (C18:n3  $\omega$ 3 – Leite B). **Conclusão:** O kefir apresentou características de um produto fermentado com potencial probiótico, de acordo com o



recomendado pela legislação, com predomínio de BAL em relação às leveduras. Considerando suas características nutricionais, o kefir pode ser considerado um alimento adequado para o consumo, como parte de uma dieta saudável.

**Palavras-chave: Leite fermentado, bactérias do ácido lático, leveduras, perfil lipídico.**

## **Production and characterization of kefir produced from milk with different concentrations of lipid**

### **4.2. Abstract**

**Objective:** To characterize the milk and kefir considering the prerequisites for classification of fermented product by count of lactic acid bacteria and yeasts, determining the acidity and pH. Chemical composition (protein, carbohydrates and lipids), moisture, ash and lipid profile. **Methodology:** Kefir grains were obtained in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 5 g of kefir grains was inoculated into in 100 ml of pasteurized cow milk with different levels of lipids (5.5% and 3.5%), at 4 °C. The samples were incubated at a controlled temperature of  $25 \pm 2$  °C for 24 hours. The lactic acid bacteria count and total yeast was performed by surface plating method from successive decimal dilutions of samples. These samples were determined moisture, ash, protein, carbohydrates, total fat pH and acidity. The fatty acid profile was determined after extraction, saponification and esterification. The identification of fatty acid methyl esters was done by gas chromatography. **Results:** Microbiological characterization of milk and kefir, showed significant microbial growth in the fermentation process of approximately 5 log cycles for BAL and 2 for yeasts. The humidity of Kefir A and Kefir B was higher than Milk A and Milk B. With the fermentation process decreased the protein and lipids, and elevated levels of lactic acid, which generated a reduced pH of kefir. Also there was a reduction of 17.5% of the levels of carbohydrates for Kefir B and only 2.3% for Kefir A. The lipid profile of the samples of milk and kefir revealed the presence of 15 fatty acids. Kefir samples have higher levels for most fatty acids (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1t, C18:1c  $\omega$ 9). The milk samples showed higher levels of C20:4, C20:2 fatty acids as well as the essential fatty acids linoleic ( $\omega$ 6 C18:2c – Milk A) and  $\alpha$ -linolenic acid ( $\omega$ 3 C18.n3 – Milk B). **Conclusion:** The kefir showed characteristics of a fermented product with probiotic potential, according to the recommendations of the legislation, predominance of BAL in relation to yeasts. Considering the nutritional characteristics, kefir may be considered an appropriate food for consumption as part of a healthy diet.

**Keywords:** fermented milk, lactic acid bacteria, yeast, lipid profile.

### **4.3. INTRODUÇÃO**

O kefir é feito a partir de grãos considerados “culturas mãe” (CHEN et al., 2008). Os grãos se assemelham a pedaços de couve-flor e variam de 3 a 20 mm de diâmetro. Possuem aparência gelatinosa branca ou amarelada. São descritos como uma associação simbiótica de bactérias lácticas, bactérias do ácido acético, leveduras e matriz de polissacarídeos (HALLÉ et al., 1994; OTLES; CAGINDI, 2003).

A organização global de micro-organismos nos grãos não está completamente elucidada. A matriz de grãos é constituída por um complexo de proteína (13 % em peso seco), 24 % de polissacarídeo, além de componentes celulares desconhecidos (HALLÉ et al. 1994; OTLES; CAGINDI. 2003).

O principal polissacarídeo, conhecido como kefiran, é uma substância solúvel em água. Várias espécies de *Lactobacillus*, incluindo *L. homofermentativa kefiranofaciens* e *L. kefir*, produzem esse polissacárideo (OTLES, CAGINDI, 2003). Os processos metabólicos que conduzem à produção de kefiran não são completamente compreendidos, porém sabe-se que o ele é composto de polissacarídeos e, principalmente, glicose e galactose (GUZEL-SEYDIM et al., 2005).

O kefir originou-se nas montanhas caucasianas da ex-União Soviética; a fabricação e o consumo de kefir se espalharam para muitas partes do mundo. Na Noruega, o kefir é produzido comercialmente desde 1930 (GRØNNEVIK et al., 2011). A palavra kefir é derivada da palavra turca "perda de tempo", que pode ser traduzida para o bom sentimento experimentado após o consumo.

Os grãos de kefir foram passados de geração em geração entre as tribos do Cáucaso e eram considerados uma fonte de riqueza das famílias. Nos dias atuais, o tradicional kefir pode ser preparado por meio do cultivo dos grãos em leite fresco ou pasteurizado nos domicílios de todo o mundo (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

O método tradicional doméstico de produção do kefir é realizado a partir da inoculação dos grãos (2 a 10 %) ao leite. O tipo de leite utilizado pode variar a critério do consumidor (LOPITZ-OTSOA et al., 2006). O processo de fermentação se desenvolve à temperatura de aproximadamente 25 °C durante 24 horas (OTLES; CAGINDI, 2003). Após esse período, o leite fermentado é filtrado para separar e recuperar os grãos de kefir. Os grãos de kefir são um

complexo ecossistema vivo que pode ser preservado enquanto houver substrato para o cultivo. Assim, ocorre aumento da complexa massa biológica dos grãos (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Outra forma de preparo do kefir é com água e açúcar mascavo (2 a 10 %). Essa bebida é muito consumida no México, sendo conhecida como bebida d'água (ULLOA et al., 1994).

A legislação brasileira caracteriza o kefir como leite fermentado. A fermentação do kefir é realizada com cultivos ácido-lácticos, como *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. São constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* sp. e *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (BRASIL, 2007). Entretanto, o kefir tem sido descrito na literatura como um probiótico, por apresentar variedade de alegações de saúde, além de sua composição nutricional. Vinderola et al. (2005) demonstraram que o consumo de kefir induziu resposta de Th2 típica, aumento do número de IL-4 e IL-6 e IL-10 e produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ .

Segundo a FAO/WHO, probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus* são os gêneros mais comuns de micro-organismos considerados probióticos, incluindo, ainda, alguns tipos de fungos e bacilos (OYETAYO; OYETAYO; 2005; SINGH et al., 2011).

Segundo Fuller (1989), as bactérias lácticas são as mais comuns entre os organismos listados como espécies utilizadas na preparação de probióticos. *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* e espécies de *Bifidobacterium* também possuem propriedades probióticas.

Na Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. A quantidade mínima viável de probióticos

deve estar situada na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC), na recomendação diária do produto pronto para o consumo. Valores menores podem ser aceitos, desde que sua eficácia seja comprovada pelo fabricante (ANVISA, 2002).

Os micro-organismos podem também conferir indiretamente características probióticas aos alimentos aos quais estão associados, por meio da produção de metabólitos bioativos (referidos como substâncias biogênicas) durante o processo de fermentação (TAKANO, 2002).

Diversos alimentos fermentados são considerados funcionais devido à liberação de peptídeos bioativos após digestão enzimática. Os peptídeos com propriedades inibidoras da enzima conversora de angiotensina (ECA) possuem efeito anti-hipertensivo e têm sido isolados a partir de digestões enzimáticas de proteínas de vários alimentos, como leites fermentados e fórmulas infantis. Outras propriedades atribuídas aos peptídeos bioativos incluem ação antimicrobiana, redução do colesterol e função imunomoduladora (YAMAMOTO et al., 2003; STANTON et al., 2005).

Algumas bactérias em especial, *L. helveticus* têm sido utilizadas para produzir peptídeos bioativos durante a fermentação do leite, os quais possuem propriedades anti-hipertensivas antimicrobianas e imunomoduladoras (SEPPO et al., 2003).

Em 100 g de kefir de leite, fornece aproximadamente 65 kcal de energia, sendo 3,5 g de gordura, 3,3 g de proteína, 2 g de lactose (MAGALHÃES et al., 2010), 0,12 g de cálcio, 0,10 g de fósforo, 0,12 g de magnésio, 0,15 g de potássio, 0,05 g de sódio, 1 g de ácido láctico, 13 mg de colesterol e 5 µg de manganês. O kefir possui ainda aminoácidos essenciais (0,05 g de triptofano, 0,34 g de leucina, 0,21 g de isoleucina, 0,17 g de treonina, 0,27 g de lisina e 0,22 g de valina), vitaminas lipossolúveis (0,06 mg de vitamina A, 0,08 mg de vitamina D e 0,11 mg de vitamina E) e vitaminas hidrossolúveis (1 mg de vitamina C) e do complexo B (0,04 g de vitamina B1 e 0,5 mg de vitamina B12). O kefir de leite é considerado uma boa opção de alimento para indivíduos intolerantes à lactose. O conteúdo de lactose é reduzido no kefir, e o nível de galactosidase é aumentado, como resultado da fermentação (OTLES; CAGINDI, 2003).

Em alguns países soviéticos recomenda-se o consumo de kefir por pessoas saudáveis, visando minimizar o risco de doenças crônicas. Além disso, nesses países, o kefir é fornecido para pacientes em tratamento clínico gastrointestinal e com alterações metabólicas, como hipertensão e doença cardíaca isquêmica (FARNWORTH, E. R; 1999; St-ONGE et al. 2002).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar o controle microbiológico mediante a contagem de BAL e leveduras, bem como determinar a composição centesimal e o perfil lipídico; a acidez e o pH de amostras de leite e kefir produzido com leite pasteurizado integral e desnatado.

#### **4.4. METODOLOGIA**

##### **4.4.1. Obtenção do kefir de leite**

O ensaio foi realizado com grãos de kefir obtidos de culturas de consumo doméstico na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados dois tipos de leite de vaca previamente pasteurizados com diferentes concentrações de lipídeos, sendo o Leite A (5,5 % de lipídeo) e Leite B (3,5 % de lipídeo).

Inicialmente, inoculou-se 5 g de grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca pasteurizado, a 4 °C, em recipiente de vidro previamente higienizado. As amostras foram incubadas em estufa em temperatura controlada de  $25 \pm 2$  °C, em condição aeróbia, por 24 horas, segundo o protocolo de Ferreira (2010).

Após o período de fermentação, foi realizada a tamisagem, em peneira, sob assepsia, separando-se os grãos de kefir do kefir (produto da fermentação dos grãos de kefir em leite). Os grãos retidos na tamisagem foram novamente inoculados em nova alíquota de leite, repetindo-se as etapas anteriormente descritas.

O leite e kefir foi utilizado para análise química e microbiológica.

A produção e manipulação do leite e do kefir foi realizada no Laboratório de Bioquímica Nutricional, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.

#### **4.4.2. Contagem de bactérias ácido-lácticas totais (BAL) e de leveduras totais**

Foi realizada análise microbiológica do leite (5,5 e 3,5 % de lipídeo) e do kefir produzido a partir desses dois tipos de leite. A contagem de BAL e leveduras foi realizada pelo método de plaqueamento em superfície, a partir de diluições decimais sucessivas das amostras. Para a contagem de BAL, foi inoculado 0,2 mL das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  na superfície de cada placa de Petri contendo aproximadamente 20 mL de ágar MRS (Man, Rogosa & Sharpe, Acumedia, Michigan, USA). Posteriormente, as placas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C em estufa incubadora do tipo BOD modelo Tecnal - TE 390, durante 48 horas (AZADNIA et al., 2011).

Para a contagem de leveduras, inoculou-se 0,2 mL das diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  na superfície de cada placa de Petri contendo aproximadamente 20 mL meio BAD (Ágar Batata Dextrose, Himedia). As placas foram incubadas a  $28 \pm 2$  °C em estufa incubadora do tipo BOD modelo Tecnal - TE 390, durante cinco a sete dias (MAPA, 2003).

#### **4.4.3. Composição centesimal do leite e do kefir de leite**

As determinações da composição centesimal do leite e do kefir foram realizadas em triplicatas pelos métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemist – AOAC (1989, 2005), que compreendem: umidade por secagem direta da amostra em estufa a 105 °C, determinação do teor de cinzas, realizado por incineração em mufla a 550 °C e posterior resfriamento em dessecador até a temperatura ambiente.

A quantificação dos lipídeos totais foi feita por secagem da amostra em estufa a 105 °C, seguida por extração com éter, em extrator do tipo Soxhlet, e posterior remoção do solvente, por destilação (AOAC, 1990).

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC, 1990). A quantificação de carboidratos foi determinada pelo cálculo da diferença percentual, subtraindo-se do total da soma de umidade, cinzas, lipídeos e proteínas.

#### 4.4.4. Acidez e pH

O pH de 10 mL de amostras de Leite A, Kefir A, Leite B e Kefir B foi determinado em potenciômetro modelo Instrutherm PH-1900, em temperatura ambiente, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras, conforme método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). Foram feitas três determinações, com três repetições. Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão.

A acidez foi determinada por titulação potenciométrica. Inicialmente, diluiu-se 10 g da amostra em 10 mL de água destilada. Foram feitas três determinações, com três repetições. Os resultados foram expressos em média e desvio-padrão. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol/L, sob agitação contínua, até atingir o ponto de viragem (IAL, 2005). Para o cálculo da acidez titulável, utilizou-se a seguinte equação:

$$AT = \frac{V \times f \times 0,9}{M}$$

Em que:

AT: acidez titulável (% ácido láctico).

V: volume de solução de NaOH 0,1 mol/L gasto na titulação (mL);

f: fator de correção da solução de NaOH 0,1 mol/L;

0,9: fator de conversão para ácido láctico e

M: massa da amostra (g).

#### 4.4.5. Extração dos lipídeos totais

Para extração de lipídeos totais das amostras de leite e kefir, utilizou-se a técnica proposta por Folch et al. (1957). Inicialmente, foram utilizados 200 mg de Leite A (5,5 % de lipídeo), Kefir A (5,5 % de lipídeo), Leite B (3,5 % de lipídeo) e Kefir B (3,5 de % lipídeo) previamente liofilizados. A amostra foi previamente pesada em tudo de ensaio, ao qual foi adicionado 1,9 mL de clorofórmio:metanol (2:1), e a mistura foi homogeneizada em vórtex. Posteriormente, adicionou-se 0,4 mL de metanol puro e centrifugou-se por 15 minutos a 3.400 rpm em centrífuga Quimis®. O sobrenadante foi retirado e



transferido para um tubo seco, previamente pesado. Assim, adicionou-se 0,8 mL de clorofórmio e 0,64 mL de solução NaCl 0,73 %, homogeneizou-se e novamente centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos. A fase superior foi descartada, e a parede do tubo, lavada três vezes com 0,3 mL de solução de Folch, sendo esta composta por clorofórmio (3 %), metanol (48 %), NaCl (2 %) e água destilada (47 %). O sobrenadante foi novamente descartado. O tubo de ensaio foi seco em estufa a 40 °C e após secagem, novamente pesado. Assim, determinou-se a massa dos lipídeos das amostras analisadas por gravimetria.

#### **4.4.6. Saponificação e Esterificação**

O procedimento de saponificação foi realizado de acordo com a técnica descrita por Hartman e Lago (1973). A partir de 15 mg de amostra extraída e retida no tubo de ensaio, adicionou-se ao tubo 4 mL do reagente de saponificação (NaOH metanólico a 50%). O tubo de ensaio foi agitado em vórtex e deixado em banho-maria a 80 °C por 15 minutos e, posteriormente, resfriado em temperatura ambiente até atingir 40 °C. Após o resfriamento, foram adicionados ao tubo 5 mL de cloreto de sódio (20%) e 0,5 mL de hexano (grau HPLC). Agitou-se em vórtex por 30 segundos. Transferiu-se o sobrenadante para um frasco âmbar. O conteúdo do frasco âmbar foi seco em nitrogênio, para eliminar o solvente, e posteriormente refrigerado a -20 °C até análise cromatográfica.

#### **4.4.7. Identificação dos ésteres metílicos**

A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por meio de cromatografia gasosa, utilizando o modelo CG-17 A Shimadzu/Class, equipado com coluna capilar de sílica fundida de biscianopropil polysiloxane (SP-256), medindo 100 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro, com detector de ionização em chama. A programação das análises foi feita em temperatura inicial de 150 °C, isotérmica, por 10 minutos e posterior aquecimento de 4 °C por minuto até 250 °C, permanecendo nesta temperatura por 40 minutos. A temperatura do vaporizador foi de 240 °C, e a do detector de 260 °C. O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio em 24 cm/s, a 175 °C. Os

picos foram identificados por comparação dos tempos de retenção de uma mistura de metil ésteres conhecidos (FAME mix Supleco<sup>®</sup>, EUA) e quantificados por áreas de integração automática; e os resultados foram expressos em percentual.

#### 4.5. RESULTADOS

O kefir utilizado ao longo do experimento apresentou características de textura cremosa, sabor acidificado e cor amarela esbranquiçada.

Por meio da caracterização microbiológica do leite e do kefir, verifica-se o expressivo crescimento microbiano com o processo de fermentação de aproximadamente 5 ciclos log para BAL e 2 para leveduras (Tabela 1).

A caracterização centesimal do leite e do kefir é apresentada na Tabela 2. As umidades do Kefir A e do Kefir B foram maiores do que do Leite A e B. Com o processo de fermentação houve redução dos teores de proteínas e lipídeos, principalmente, e elevação dos teores de ácido láctico, o que promoveu redução do pH do kefir. Em média, o pH do leite pasteurizado foi de 6,76, e o kefir, de 3,89 (Tabela 2). Observou-se também redução de 17,5 % dos teores de carboidratos para o Kefir B e de apenas 2,3 % para o Kefir A.

O perfil lipídico das amostras de leite e kefir revelou a presença de 15 ácidos graxos (Tabela 3). Neste estudo, a mesma amostra de leite utilizada para as análises do perfil lipídico foi usada no processo de inoculação para a fermentação e produção do kefir. Observa-se que as amostras de kefir apresentaram níveis ligeiramente mais elevados para a maioria dos

**Tabela 1** - Análise microbiológica de duas amostras de leite e do kefir derivado

<b>Micro-organismos</b>	<b>Leite A</b>	<b>Kefir A</b>	<b>Leite B</b>	<b>Kefir B</b>
BAL (UFC/mL)	$3,05 \times 10^2$	$4,05 \times 10^7$	$1,83 \times 10^2$	$3,63 \times 10^7$
Leveduras (UFC/mL)	$1,94 \times 10^2$	$3,42 \times 10^4$	$1,22 \times 10^2$	$1,23 \times 10^4$

**Tabela 2** - Composição centesimal (100 mL), ácido láctico e pH de duas amostras de leite e do kefir derivado

<b>Componentes</b>	<b>Leite A</b>	<b>Kefir A</b>	<b>Leite B</b>	<b>Kefir B</b>
Umidade (%)	78,9	82,5	81,2	88
Cinzas (%)	1,3±0,03	1,2 ± 0,02	1,1±0,01	0,8 ± 0,02
Lipídeos (%)	5,6±0,6	4,2 ± 0,04	3,8±0,4	1,4 ± 0,42
Proteínas (%)	5,5±0,4	4,9 ± 0,37	5,8±0,3	3,2 ± 0,03
Carboidratos (%)	8,7	7,2	8,0	6,6
Ácido Láctico (%)	0,18±0,18	0,87±0,05	0,16±0,01	0,86±0,01
pH	6,75+0,05	3,89+0,15	6,77+0,20	3,89+0,19

ácidos graxos (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1t, C18.1c ω9), em relação às amostras de leite. As amostras de leite analisadas apresentaram maiores teores de ácidos graxos C20:2, C20:4, ácidos graxos essenciais linoleico (C18.2c ω6 - LA) e α-linolênico (C18.n3 ω3 – KB).

As amostras de Kefir A obtiveram boa relação (<3,0) ω6/ω3 (2,2:1), ao passo que as amostras de Kefir B alcançaram alta relação ω6/ω3 (5,6:1).

**Tabela 3** - Perfil de ácidos graxos de duas amostras de leite e do kefir derivado

Ácidos Graxos		Percentual relativo (%)			
		Leite A	Kefir A	Leite B	Kefir B
<b>C 8.0</b>	<b>Caprílico</b>	-	0,35	-	-
<b>C10.0</b>	<b>Cáprico</b>	-	1,53	3,92	-
<b>C12.0</b>	<b>Láurico</b>	-	2,58	-	-
<b>C14.0</b>	<b>Mirístico</b>	8,64	10,66	6,07	8,14
<b>C16.0</b>	<b>Palmítico</b>	4,71	35,71	-	37,96
<b>C18.0</b>	<b>Estearico</b>	3,53	11,96	-	15,30
	<b>SFA</b>	<b>16,88</b>	<b>62,79</b>	<b>9,99</b>	<b>61,4</b>
<b>C18.1t</b>	<b>Eláidico</b>	-	2,69	-	3,30
<b>C18.1c <math>\omega_9</math></b>	<b>Oleico</b>	-	25,48	-	28,72
<b>C20.0</b>	<b>Araquídico</b>	8,48	-	7,26	-
<b>C23.0</b>	<b>Tricosanoico</b>	-	-	33,68	-
	<b>MUFAs</b>	<b>8,48</b>	<b>28,17</b>	<b>40,94</b>	<b>32,02</b>
<b>C18.2c <math>\omega_6</math></b>	<b>Linoleico</b>	2,50	1,52	-	1,93
<b>C18.n3 <math>\omega_3</math></b>	<b><math>\alpha</math>-linolênico</b>	-	0,69	-	0,34
<b>C20.2</b>	<b>Eicosadienoico</b>	44,91	-	59,04	-
<b>C20:4<sub>n6</sub><math>\omega_6</math></b>	<b>Araquidônico</b>	27,24	-	-	-
<b>C20.2</b>	<b>Eicosadienoico</b>	-	-	-	-
	<b>PUFAs</b>	<b>74,65</b>	<b>2,21</b>	<b>59,04</b>	<b>2,27</b>
	<b>Total <math>\omega_6</math></b>	29,74	1,52	-	1,93
	<b>Total <math>\omega_3</math></b>	-	0,69	-	0,34
	<b><math>\omega_6/ \omega_3</math></b>	-	2,2:1	-	5,6:1

Valores apresentados em % relativo. Traços: valores não identificados.

#### 4.6. DISCUSSÃO

A composição microbiológica de grãos de kefir é bastante variável em número e espécies de micro-organismos, como mostraram diversos estudos, variando de acordo com a origem dos grãos e sua forma de cultivo (SIMOVA et al., 2002; WITTHUHN et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2011).

De acordo com a legislação brasileira (ANVISA, 2010), a quantidade mínima viável de bactérias do ácido láctico (BAL) em produtos probióticos prontos para o consumo deve ser de, no mínimo,  $10^8$  -  $10^9$  UFC/mL. Nesse caso, são consideradas algumas espécies de bactérias, com alegações probióticas, em sua maioria do gênero *Lactobacillus*, inclusive *L. casei*, que está presente nos grãos de kefir (MAGALHÃES et al., 2011).

A identificação de BAL e leveduras tem sido relatada em alguns estudos com kefir. No presente estudo limitou-se a analisar a bebida, ou seja, produto originado do processo fermentativo, denominado kefir. Magalhães et al. (2011), avaliando a composição microbiológica da bebida do kefir, identificaram grande diversidade de bactérias ácido-lácticas (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir* e *Lactococcus lactis*) e leveduras (*Acetobacter lovaniensis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kazachstania aerobia* e *Saccharomyces cerevisiae*).

O produto fermentado pelo kefir foi previamente analisado quanto a sua composição microbiológica em BAL e leveduras (concentração aproximada de  $10^7$  e  $10^4$  UFC/mL, respectivamente) (Tabela 1). Segundo definição da Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), a soma total de micro-organismos constituintes da cultura do kefir deve ser de no mínimo  $10^7$  UFC/mL e  $10^4$  UFC/mL para BAL e leveduras, respectivamente. De acordo com a Resolução nº 5 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (BRASIL, 2000), para que um produto originado do kefir seja considerado fermentado, ele deve apresentar alguns pré-requisitos como: acidez entre 0,5 e 1,5 g ácido láctico/100 g do produto,  $10^7$  UFC BAL/mL e  $10^4$  UFC leveduras/mL. Os valores encontrados neste estudo estão coerentes com essas especificações. Dessa forma, por meio da contagem total de micro-organismos, pode-se dizer que o kefir aqui utilizado é considerado leite fermentado.

O leite é um meio rico em nutrientes, o que influencia diretamente na diversidade da microbiota dos grãos de kefir. Assim como nos grãos, BAL e leveduras são sempre encontradas nos produtos fermentados pelo kefir. Os principais produtos formados durante a fermentação do leite são o ácido láctico, o CO<sub>2</sub> e o álcool. Neste estudo obteve-se (Tabela 2), em 100 mL de Kefir A, o fornecimento de 86 kcal de energia, 4,2 g de lipídeo, 4,9 g de proteínas e 7,2 g

de carboidratos, valores estes semelhantes aos descritos por Otles e Cagindi (2003).

Segundo Magalhães et al. (2011), o principal mecanismo que ocasiona redução do pH e aumento da acidez é a produção de ácido acético, ácido láctico, etanol e CO<sub>2</sub> durante a quebra da lactose, pela população microbiana presente em bebidas e grãos de kefir. O conteúdo adequado de ácido láctico é de grande importância, uma vez que contribui para a palatabilidade da bebida e inibe o desenvolvimento de micro-organismos patogênicos, como, por exemplo, de algumas estirpes de *Escherichia coli* (TAKAHASHI; KAWAKAMI, 1993), além de proporcionar maior tempo de conservação que os produtos no qual a matéria-prima não foi fermentada. Em outro estudo, a atividade antibacteriana do kefir foi analisada contra diferentes estirpes de *E. coli*. Sob condições de pH neutro, não se observou inibição do crescimento de bactérias na presença de kefir. No entanto, em ambiente com pH ácido e presença do kefir, ocorreu inibição das linhagens em curto espaço de tempo, o que sugeriu a existência de uma substância antibacteriana presente no kefir, supostamente ativada em meio ácido (TAKAHASHI; KAWAKAMI, 1999; LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Simova et al. (2002), o qual avaliando alterações na população microbiana dos grãos de kefir submetidos a dois ciclos de fermentação, observaram que as BAL representaram de 83 a 90 % da contagem microbiana dos grãos, e as leveduras, de 10 a 17 % do total da microflora.

Ching-Yun e Ching-Wen (1999), Irigoyen (1995) e Magalhães (2011), associaram a redução do teor de lipídeos na bebida à produção de lipases pelos microrganismos presentes no kefir. Em estudo desenvolvido por Hlastan-Ribic et al. (2005), evidenciou-se o efeito protetor do kefir sobre a formação de tumores, enfatizando que os hábitos alimentares também são importantes. Nesse estudo, foram analisados três grupos de ratos alimentados com kefir contendo 1,1 e 3,5 % de gordura, e leite contendo 1,1 % de gordura. O grupo kefir (3,5 % de gordura) teve o menor número de formação de adenocarcinomas, ao passo que, no grupo leite (1,1 % de gordura) obteve-se o maior número de adenocarcinomas. A partir deste e de outros estudos, os autores concluíram que o kefir pode exercer efeito protetor, porém a dieta é também importante, uma vez que houve alta correlação entre a ingestão de gordura e a formação de adenocarcinoma.

O coalho formado, kefir, é atribuído ao processo de desnaturação proteica durante o processo de fermentação. Assim, obtém-se uma coalhada composta por partículas facilmente penetradas pelos sucos gástricos, e conseqüentemente, de fácil digestão (HERTZLER et al., 2003; OTLES; CAGINDI, 2003).

Além de bactérias do ácido láctico, ácido acético e leveduras, o kefir contém vitaminas, minerais e aminoácidos essenciais, vitaminas do complexo B, cálcio e vitamina K. O triptofano é um aminoácido essencial presente no kefir. Este atua sobre o sistema nervoso central, minimizando a sensação de fadiga e auxiliando no processo de recuperação após estresse físico (OTLES; CAGINDI, 2003).

O kefir pode ser inserido na dieta de indivíduos com intolerância à lactose, visto que as bactérias utilizam a lactose na produção de energia (ZOURARI; ANIFANTAKIS, 1988).

No início do século XX, imunologistas observaram correlação positiva entre o consumo crônico de iogurte contendo ácido láctico produzido por microorganismos e a mudança da expectativa de vida. A teoria era baseada na competição entre as bactérias presentes nos produtos fermentados e microorganismos patogênicos. Desde então, são realizados estudos demonstrando atividades antifúngicas e antibacterianas do kefir sobre bactérias patogênicas, como *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, e contra o fungo *Candida albicans* (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

Os ácidos graxos que compõem os lipídeos do leite são pertencentes a dois grupos: o dos ácidos graxos saturados e o dos ácidos graxos insaturados (CONNOR, 2000). Os ácidos graxos saturados (AGS) e monoinsaturados (AGM) podem ser sintetizados no organismo, porém os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), como o linoleico ( $\omega$ -6) e  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3), não são sintetizados pelo organismo; logo, são considerados ácidos graxos essenciais (AGE) (INNIS, 2004). Esses AGE foram identificados nas amostras de kefir (Tabela 3). São considerados elementos estruturais constituintes da membrana celular e têm importante papel na regulação de vários processos metabólicos, de transporte e excreção. A carência de AGE na alimentação dos mamíferos

(especialmente do homem) conduz a alterações no crescimento, alterações imunológicas, neurológicas e sérios transtornos comportamentais (INNIS, 2004).

As amostras de kefir utilizadas neste estudo apresentaram quantidades consideráveis de ácido oleico ( $\omega$ -9), o qual não foi identificado nas amostras de leite analisadas. A redução do consumo de AGS pelos AGM na dieta resulta em aumento dos níveis de HDL e diminuição dos níveis de LDL e triglicerídeos, além de reduzir a capacidade de oxidação da LDL (YU-POTH et al., 2000).

Em estudo desenvolvido por Guzel-Seydim et al. (2006), em que determinou-se o perfil de ácidos graxos de amostras de leite e kefir por cromatografia gasosa, foram encontrados maiores teores de  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 em relação aos encontrados neste estudo. Corroborando com os resultados aqui apresentados, os autores também identificaram maior concentração do ácido graxo palmítico no kefir (70,5 mg/g de produto).

O leite e seus derivados consistem em uma matriz rica em diversos compostos que interagem entre si. Com base em resultados deste e de outros estudos, sugere-se que, durante o processo de extração adotado, as perdas de frações lipídicas ou a não extração de componentes lipídicos podem ter limitado o método de identificação dos ácidos graxos, subestimando valores. Segundo Brum et al. (2009), algumas amostras requerem cuidados especiais para obtenção da fração lipídica. Fatores como a coextração dos componentes não lipídicos e a oxidação indesejada podem influenciar a qualidade final da fração lipídica.

Os AG essenciais da série  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 compõem a formação de estruturas de membranas de todas as células. Eles influenciam várias funções relacionadas à membrana, como ligação de hormônios, transporte de membrana e atuação de enzimas, e participam do crescimento e desenvolvimento da estrutura de neurônios e na síntese da bainha de mielina (HOLMAN, 1998).

A razão entre a ingestão de  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 é importante, visto que possuem funções metabólicas e fisiológicas distintas. Excesso de ácidos graxos de uma série na dieta pode inibir a dessaturação de um ácido graxo de outra série (PAWLOSKY et al., 2003). O excesso do  $\omega$ -6 pode impedir, por efeito de competição pela enzima  $\Delta$ 6 dessaturase, a transformação do  $\omega$ -3 em seus



derivados de cadeia longa (EPA e DHA). Isso poderá ser a causa do desbalanceamento dos AGE no organismo e da incorporação dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia média-longa (AGPI-CML) nos tecidos. As dietas ocidentais são exemplos desse desbalanço, pois são ricas em ácidos graxos  $\omega$ -6 e baixas em ácidos graxos  $\omega$ -3, afetando assim a síntese dos eicosanoides (VANCASSEL et al., 2007).

Estudos têm demonstrado efeitos benéficos do  $\omega$ -3 por diminuírem os sintomas ou até a progressão de várias doenças, como as cardiovasculares (LEMAITRE et al., 2003) e as dislipidemias (MORVAN et al., 2002; PAN et al., 2004). Contudo, ressalta-se que doses elevadas de  $\omega$ -3 podem ser prejudiciais à saúde, visto que esse lipídeo em excesso pode suprir a produção de agentes inflamatórios, podendo levar a uma redução na resposta do sistema imunológico (AZEVEDO et al., 2002).

O  $\omega$ -6 consiste em um precursor de prostaglandina E. Os PUFAs são precursores dos AGPI-CML, componentes estruturais indispensáveis de todas as membranas celulares. Alguns AGPI-CMLs são precursores de eicosanoides, moléculas com potente atividade biológica que modula vários processos celulares e teciduais (MALACARNE et al., 2002).

#### **4.7. CONCLUSÕES**

A partir dos resultados obtidos neste estudo, verificou-se que o kefir apresentou características de um produto fermentado, de acordo com o recomendado pela legislação brasileira. Entretanto, como demonstrado em alguns estudos, as BAL estão presentes em maior quantidade do que as leveduras. Porém, mais estudos microbiológicos são necessários para identificação de micro-organismos com alegações probióticas, bem como comprovação de seus efeitos benéficos à saúde.

O produto fermentado produzido a partir do Leite A assemelhou-se ao do Leite B, porém com teores mais elevados de lipídeos e proteínas. As variações que ocorreram durante o período de fermentação podem ser influenciadas pelas características do leite utilizado para inoculação.

O kefir apresentou em sua composição importantes ácidos graxos essenciais como o linoleico e o  $\alpha$ -linolênico. Contudo, fatores como oxidação

ou presença de componentes não lipídicos podem ter interferido no processo de extração e identificação dos ácidos graxos, subestimando esses valores.

#### 4.8. REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

ANVISA. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/>. Acesso em: 07 abr. 2012.

A.O.A.C - Association of Official Analytical Chemistry. *Official methods of analysis of A.O.A.C.* 14<sup>a</sup> ed. Washington; 1989.

AOAC - Official Methods of Analysis. 15 th ed. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, p. 807-814, 1990.

AZEVEDO, R. B.; SILVA, L. P.; LEMOS, A. P. C.; MIYASAKA, C. K.; LACAVA, Z. G. M. Controle da resposta inflamatória por ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J. *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. Barueri: Manole, 2002. p. 379-392.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução 5, de 13 de novembro de 2000. Disponível em: <[http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/leite\\_piq\\_leite\\_fermentado.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/leite_piq_leite_fermentado.htm)> Acesso em: 28 de junho de 2012.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-d' ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 849-854, 2009.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, v. 25, p. 492-501, 2008.

CLARKE, J.; HERZBERG, G.; PEELING, J.; BUIST, R.; CORBETT, D. Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids worsens forelimb motor function after intracerebral hemorrhage in rats. *Journal of Experimental Neurology*, v. 191, p. 119-127, 2005.

CONNOR, W.E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *American Journal Clinical Nutrition*, v.1, n. 1, p. 171S-175S, 2000.

FAO/WHO. *Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria*. Córdoba: FAO/WHO, 2001.

FARNWORTH, E.R. Kefir: from folklore to regulatory approval. *Journal Nutraceut Functional & Medical Food*, v.1, n. 4, p. 57- 68, 1999.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; MONTEIRO, D.; FARIA, S.; CRUZ, S.; PERREIRA, A.; ROQUE, A. C.; TAVARES, P. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 27-31, 2010.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497-409, 1957.

GRØNNEVIK, H.; MARIT FALSTAD, M.; NARVHUS, J. A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Journal of Dairy Technology*, v. 21, p. 601- 606, 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K., TAS, T. Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *International Journal of Dairy Technology*, v. 59, n. 3, p. 209-215, 2005.

HALLÉ, C.; LEROI, F.; DOUSSET.; X.; PIDOUX, M. Les kéfirs: des associations bactéries lactiqueslevures. In: Roissart, de H; Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques: Aspects fondamentaux et technologiques*, v. 2, p. 169-182, 1994.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475-477, 1973.

Hertzler, S.R.; Clancy, S.M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, v. 103, p. 582-587, 2003.

HOLMAN, R.T. The slow discovery of the importance of  $\omega$ -3 essential fatty acids in human health. *The Journal of Nutrition*, v. 128, p. 472S-433S, 1998.

Innis, S.M. Polyunsaturated fatty acids in human milk: an essential role in infant development. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 554, p.27-43, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005, 1018p.

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

LEMAITRE, R.; KING, I. B.; MOZAFFARIAN, D.; KULLER, L. H.; TRACY, R. P.; SISCOVICK, D. S. N-3 polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, nad nonfatal myocardial infarction in older adults: the cardiovascular health study. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.77, p.319-325, 2003.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. KEFIR. A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana Micología*, v. 23, p. 67-74, 2006.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. R. Brazilian Kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 26, p.1241–1250, 2010.

MAHAN, L.; ESCOTT-STUMP, S. *Lipídeos. Alimentos, nutrição e dietoterapia*. São Paulo: Rocca, 2002, p. 51-53.

MALACARNE, M.; MARTUZZI, F.; SUMMER, A.; MARIANI, P. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, v. 12, p. 869–877, 2002.

MIZOCK, B. A.; DEMICHELE, S. J. The acute respiratory distress syndrome: role of nutritional modulation of inflammation through dietary lipids. *Nutrition in Clinical Practice*, v.19, p.563-574, 2004.

MORVAN, V.; DUMON, M. F.; PALOS-PINTO, A.; BÉRARD, A. M.  $\omega$ -3 FA increase liver uptake of HDL-cholesterol in mice. *Lipids*, v. 37, n. 8, p. 767-772, 2002.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

OYETAYO, V.O.; OYETAYO, F.L. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2, p.123-127, 2005.

PAN, M.; CEDERBAUM, A. I.; ZHANG, Y.; GINSBERG, H. N.; WILLIAMS, K. J.; FISHER, E.A. Lipid peroxidation and oxidant stress regulate hepatic apolipoprotein B degradation and VLDL production. *The Journal of Clinical Investigation*, v.113, n.9, p.1277-1287, 2004.

PAWLOSKEY, R.J.; HIBBELN, J.R.; LIN, Y.; GOODSON, S.; RIGGS, P.; SEBRING, N. Effects of beef- and fish-based diets on the kinetics of n-3 fatty acid metabolism in human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, n. 3, p. 565-72, 2003.

SEPPO, L.; JAUHAINEN, T.; POUSSA, T.; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, p.326-330, 2003.

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

SINGH, K.; KALLALI, B.; AJAY KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: a review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. 287-290, 2011.

ST-ONGE, M-P.; FARNWORTH, E. R.; SAVARD, T.; CHABOT, D.; AKIER MAFU, A.; JONES, P. J. H. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2002. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/2/1>> Acesso em: 12 de agosto de 2012.

STANTON, C.; ROSS, R, P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p.198-203, 2005.

VANCASSEL, S.; BLONDEAU, C.; LALLEMAND, S.; CADOR, M.; LINARD, A.; LAVIALLE, M. Hyperactivity in the rat is associated with spontaneous low level of n-3 polyunsaturated fatty acids in the frontal cortex. *Behavioural Brain Research*, v.180, n. 2, p.119-26, 2007.

VINDEROLA, C. G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGO, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 72, p. 195–202, 2005.

TAKAHASHI, F.; KAWAKAMI, H. Antibacterial action of kefir against *Escherichia coli* O157:H7. *Japanese Journal of Food Microbiology*, v.16, p. 245-247, 1999.

TAKANO, T. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 82, n. 333-340, 2002.

ULLOA, M.; LAPPE, P.; TABOADA, J.; DIAS-GARCÉS, J. Mycobiota of the Tibi grains used to ferment Pulque in México. *Revista Mexicana de Micología*, México, v. 10, n. 8, p. 153-159, 1994.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. 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.

YAMAMOTO, N.; EJIRI, M.; MIZUNO, S. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design.*, v. 9, p.1345-1355, 2003.

YU-POTH, S.; ETHERTON, T. D.; REDDY, C. C.; PEARSON, T. A.; REED, R.; ZHAO, G.; JONALAGADDA, S.; WAN, Y.; KRIS-ETHERTON, P. M. Lowering dietary saturated fat and total fat reduces the oxidative susceptibility of LDL in health men and women. *Journal of Nutrition*, v. 130, n. 9, p. 2228-2237, 2000.

ZOURARI, A.; ANIFANTAKIS, E. M. LE KÉFIR: caractères physicochimiques, microbiologiques et nutritionnels. *Le Lait*, v. 68, p. 373-392, 1988.

## 5. CAPÍTULO 2: Avaliação da influência do consumo crônico de leite e kefir sobre níveis pressóricos, parâmetros bioquímicos e renais de ratos SHR induzidos à síndrome metabólica

### 5.1. Resumo

**Objetivo:** Avaliar a influência do consumo crônico de kefir sobre os níveis pressóricos, parâmetros bioquímicos e renais de ratos SHR induzidos à SM.

**Metodologia:** Filhotes de ratos SHR, com dois dias de vida, foram submetidos ao protocolo de indução da SM. Foram aplicadas injeções subcutâneas, na região cervical, correspondente à dose de 4 mg MSG/ g de peso corporal do 2º ao 7º dia de vida. Após o desmame (30 dias), os animais foram acondicionados em caixas coletivas (quatro animais por caixa), onde passaram a receber ração comercial Nuvilab<sup>®</sup> e água *ad libitum*, por um período de 12 semanas. Após esse período, para confirmação da SM, os animais foram submetidos à avaliação da pressão arterial, mensuração da glicemia de jejum e pesagem. Em seguida, os animais foram divididos em cinco grupos correspondentes ao tratamento que receberiam: Leite A (5,5 % de lipídeo), Kefir A (leite com 5,5 % de lipídeo), Leite B (3,5 % de lipídeo), Kefir B (leite com 5,5 % de lipídeo) e grupo controle (MSG+Sal). Após a determinação dos grupos, os animais foram transferidos para gaiolas individuais, passando a receber, além da dieta comercial, o kefir (1 mL/animal) via gavagem, diariamente por 10 semanas. O ganho de peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram registrados semanalmente. Ao final do período experimental, os animais foram dessensibilizados com isoflurano e eutanasiados com tiopental. O sangue foi coletado por punção na artéria aorta abdominal, e os rins foram removidos para análises. O colesterol total, fração HDL-colesterol e triglicerídeos foram determinados por meio do método enzimático colorimétrico. Para análise bioquímica da função renal, foram determinadas as concentrações de creatinina, microalbuminúria, ureia, sódio e potássio. Foram determinadas as atividades das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GSH) citosólica. Para análise histológica, os rins foram submetidos às etapas de fixação, desidratação, inclusão em parafina e, após a microtomia, corados com hematoxilina e eosina (HE) e, posteriormente,

visualizadas em microscópio óptico. **Resultados:** O consumo alimentar e o ganho de peso foram similares entre os grupos ao longo do período experimental, porém o CEA foi significativamente maior no grupo Kefir B. Ao final do período experimental, observou-se redução de PAS no grupo Leite B e elevação dos níveis de glicemia sanguínea para os grupos Leite A e Kefir A. Os níveis de colesterol e HDL-colesterol apresentaram-se mais elevados no grupo controle (MSG+Sal). Os níveis de triglicerídeos, a concentração de creatinina plasmática e o *clearance* de creatinina não diferiram significativamente entre os grupos. A concentração de ureia plasmática foi maior no grupo Leite A e menor no grupo Leite B. Houve redução na concentração de microalbumina urinária nos grupos Leite A, Kefir A e Kefir B e aumento no grupo controle (MSG+Sal). A atividade da CAT não diferiu significativamente entre os grupos. A atividade da SOD foi maior nos grupos Leite B e Kefir B. A excreção de  $\text{Na}^{2+}$  não diferiu entre os grupos controles e aqueles que consumiram leite e kefir, porém a excreção de  $\text{K}^+$  foi maior no grupo controle (MSG+Sal). Em relação à análise histológica dos rins, observou-se aumento da área glomerular nos animais do grupo controle (MSG+Sal). **Conclusão:** O consumo de leite e kefir contribuiu para o controle do peso corporal em relação ao grupo controle (MSG+Sal). Ao final do período experimental, o grupo tratado Leite B apresentou redução significativa nos valores de PAS. Apesar de não significativa, os demais grupos também apresentaram redução nos valores de PAS. Logo, sugere-se que os produtos lácteos utilizados apresentam peptídeos bioativos capazes de atuar na redução dos níveis de pressão arterial. Os animais tratados com kefir não mostraram alterações nos parâmetros renais que evidenciassem um quadro patológico, embora esse modelo apresente maior atividade simpática, como efeito da indução com MSG. Estudos que abordem a função renal mediante o consumo de kefir ainda são escassos na literatura, o que demonstra a necessidade de mais ensaios avaliando a influência do consumo desses produtos nos parâmetros renais.

**Palavras-chave:** hipertensão arterial, leite fermentado, insuficiência renal.

## 5.2. Evaluation of chronic consumption of milk and kefir on blood pressure biochemical and renal parameters of SHR rats induced metabolic syndrome

### Abstract

**Objective:** To evaluate the influence of chronic consumption of kefir on blood pressure levels, biochemical and renal parameters Spontaneously Hypertensive Rats (SHR) induced the metabolic syndrome (SM). **Methodology:** Puppies of SHR with 2 days of life, underwent induction protocol of the MS. Subcutaneous injections, corresponding to a dose of 4 mg MSG/g of body weight 2nd to 7th day of life. After weaning (30 days), the animals were kept in collective boxes (4 animals per cage), where now receive Nuvilab<sup>®</sup> commercial feed and water ad libitum for a period of 12 weeks. After this period to confirm the MS, the animals were submitted at evaluation of blood pressure, measurement of fasting glucose and weight. Then the animals were divided into 5 groups corresponding to treatment they would receive: Milk A (5.5% lipid), Kefir A (milk with 5.5% lipid), Milk B (3.5% lipid), Kefir B (milk with 5.5% lipid) and control group (MSG + Sal). After determination of the groups, the animals were transferred to individual cages starting to receive, in addition to commercial diet, kefir (1 mL/animal) by gavage daily for 10 weeks. The body weight gain and food intake of the animals were recorded weekly. At the end of the experimental period the animals were desensitized with isoflurane and euthanized with thiopental. Blood was collected by puncturing the artery abdominal aorta and kidneys removed for analysis. Total cholesterol, HDL-cholesterol and triglycerides were determined by the enzymatic colorimetric method. For biochemical analysis of renal function were determined concentrations of urea, creatinine, microalbuminuria, sodium and potassium. The activities of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GSH) cytosolic were determined. For histological analysis, kidneys were subjected to the steps of fixation, dehydration, paraffin embedding, and after a microtome, stained with hematoxylin and eosin (HE) and viewed under a light microscope. **Results:** Food intake and weight gain were similar between groups throughout the experimental period, but the CEA was significantly higher in group Kefir B. The end of experimental period, there



was a reduction of SBP in group Milk B and elevation of blood glucose levels for the groups Milk A and Kefir A. Cholesterol levels and HDL-cholesterol levels were higher in the control group (MSG + Sal). Triglyceride levels, serum creatinine concentration and creatinine *clearance* did not differ significantly between groups. The concentration of plasma urea was higher in group Milk A and lower in group Milk B. Reduction in the concentration of urinary microalbumin in groups Milk A, Kefir A, Kefir B and increased in the control group (MSG + Sal). The CAT activity did not differ significantly between groups. SOD activity was higher in groups Milk B and Kefir B. The excretion of  $\text{Na}^{2+}$  did not differ between the control groups and those that consumed milk and kefir, but the  $\text{K}^{+}$  excretion was higher in the control group (MSG + Sal). Regarding the histological analysis of the kidneys, there was an increase in glomerular area in the control group (MSG + Sal). **Conclusion:** Consumption of milk and kefir contributed to the control of body weight compared to the control group (MSG + Sal). At the end of the experimental period, the group treated Milk B showed significant reduction in SBP. Therefore, it is suggested that dairy products have used bioactive peptides capable of acting in the reduction of blood pressure levels. Animals treated with kefir showed no changes in renal parameters that showed a pathological context, although this model has a higher sympathetic activity, the effect of induction with MSG. Studies addressing renal function upon the consumption of kefir are still scarce in the literature which demonstrates the need for further trials addressing the influence of the consumption of these products in renal parameters.

**Keywords:** hypertension, fermented milk, kidney failure.

### 5.3. INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica representa um importante desafio para a saúde pública em diversos países (DEKKER et al., 2005; LOCATELLI et al., 2006; GLUBA et al., 2013). O agrupamento de obesidade abdominal, dislipidemia, hipertensão e resistência à insulina aumenta substancialmente o risco de não só diabetes mellitus tipo 2 (DM2), mas também de doenças cardiovasculares (ECKEL et al., 2005).

Estudos epidemiológicos sugerem que consumo de produtos lácteos está inversamente relacionado com o risco de hipertensão (MCCARRON et al., 1984; JAKALA et al., 2009a; ). Estudos do *National Health and Nutrition Survey* (NHANES I, 1975) mostraram que o menor consumo de produtos lácteos está associado a uma maior incidência de hipertensão.

A atividade hipotensora dos produtos lácteos tem sido associada a proteínas do leite (caseínas e soro) e aos produtos de sua degradação, os peptídeos. Quando as proteínas são hidrolisadas por enzimas digestivas ou por proteases formadas pelos lactobacilos durante a fermentação láctea, fragmentos de peptídeos biologicamente ativos são formados. Bactérias do ácido láctico com atividade proteolítica (por exemplo, *Lactobacillus helveticus* e *Lactococcus lactis*) são utilizadas nos processos de fermentação láctea (JAKALA et al., 2009a).

Peptídeos bioativos são definidos como pequenos peptídeos, compostos por 3 a 20 aminoácidos, que são liberados durante o processamento industrial de alimentos ou durante a digestão (SHAHIDI, ZHONG, 2008; CÁNOVAS et al., 2011). Peptídeos bioativos derivados de diferentes fontes de proteínas exercem efeitos imunomoduladores *in vitro* e *in vivo* (CÁNOVAS et al., 2011). Podem ainda exercer efeito no sistema cardiovascular, digestivo, imunitário e nervoso (KORHONEN; PIHLANTO, 2003).

A inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) é o mecanismo anti-hipertensivo de atuação dos peptídeos bioativos, mais estudado. A ECA é uma enzima que catalisa a conversão da angiotensina I (decapeptídeo) em angiotensina II (octapeptídeo), a qual consiste em um composto de elevada capacidade vasoconstritora (CÁNOVAS et al., 2011).

Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram o efeito modulador dos peptídeos bioativos na inibição da ECA. Um grande número de peptídeos inibidores da ECA é encontrado em produtos lácteos (CÁNOVAS et al., 2011). Os tri-peptídeos IPP (isoleucina-prolina-prolina) e VPP (valina-prolina-prolina), isolados a partir da fermentação de um meio à base de leite por *Saccharomyces cerevisiae* e *Lactobacillus helveticus*, inibiram a ação da ECA em ensaio *in vitro* (NAKAMURA et al., 1995; HERNÁNDEZ-LEDESMA et al., 2011). A redução na atividade da ECA também foi verificada em estudo com ratos SHR submetidos ao consumo crônico de leite fermentado por *L. helveticus*, contendo peptídeos (Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro e Leu-Pro-Pro) (2,8-5,2 mg/kg) (JAKALA et al., 2009b).

O efeito hipotensor dos potenciais peptídeos inibidores ECA depende da capacidade de atingirem intactos os órgãos onde irão realizar sua função. Existem evidências de que peptídeos com atividade inibidora da ECA podem ser absorvidos no trato digestivo e transportados para a corrente sanguínea sem ser hidrolisados por proteases (VERMEIRSEN et al., 2004; CÁNOVAS et al., 2011).

A atividade dos peptídeos anti-hipertensivos presentes nos alimentos, bem como sua ação nem sempre é avaliada e comprovada em sistemas de modelo animal e humanos. A maioria dos estudos é baseada na mensuração da capacidade inibitória da atividade da ECA *in vitro*, porém sem efeito anti-hipertensivo *in vivo*. Relatos mostram alterações nos níveis pressóricos *in vivo*, porém sem diferença estatística (MARUYAMA et al., 1987). Assim são necessários estudos baseados em rigorosos ensaios clínicos e experimentais.

Nos últimos anos, a venda de alimentos com alegações funcionais aumentou consideravelmente. Assim, a identificação e comprovação da eficácia de derivados lácteos, bem como de peptídeos bioativos, possibilita a elaboração e oferta de uma dieta personalizada e diversificada.

Conhecido há milhares de anos, o kefir é um produto lácteo fermentado, produzido por uma mistura de bactérias do ácido láctico e leveduras, e o seu efeito protetor sobre o organismo tem sido constantemente estudado (GUZELSEYDIM et al., 2005). Originado na região do Cáucaso, é ligeiramente ácido e apresenta pequena concentração de álcool (LOPITZ-OTSOA et al., 2006).

No Brasil, o kefir é popularmente considerado uma bebida milagrosa que traz benefícios à saúde. Várias propriedades probióticas do kefir já foram relatadas na literatura, bem como seus efeitos como agente antimutagênico, anticarcinogênico, hipocolesterolêmico ou anti-inflamatório (JASCOLKA, 2010). Contudo, os resultados não são conclusivos. Diante da possibilidade de esse alimento apresentar as propriedades terapêuticas citadas, despertou-se o interesse em pesquisar se o seu consumo exerceria alguma influência na redução da pressão arterial, uma patologia de alta prevalência mundial, bem como sobre os fatores de risco para o desenvolvimento da mesma.

Diante desse pré-suposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do consumo crônico de kefir sobre os níveis pressóricos, parâmetros bioquímicos e renais de ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rat*) induzidos à síndrome metabólica com glutamato monossódico (MSG).

## **5.4. METODOLOGIA**

### **5.4.1. Produção do kefir**

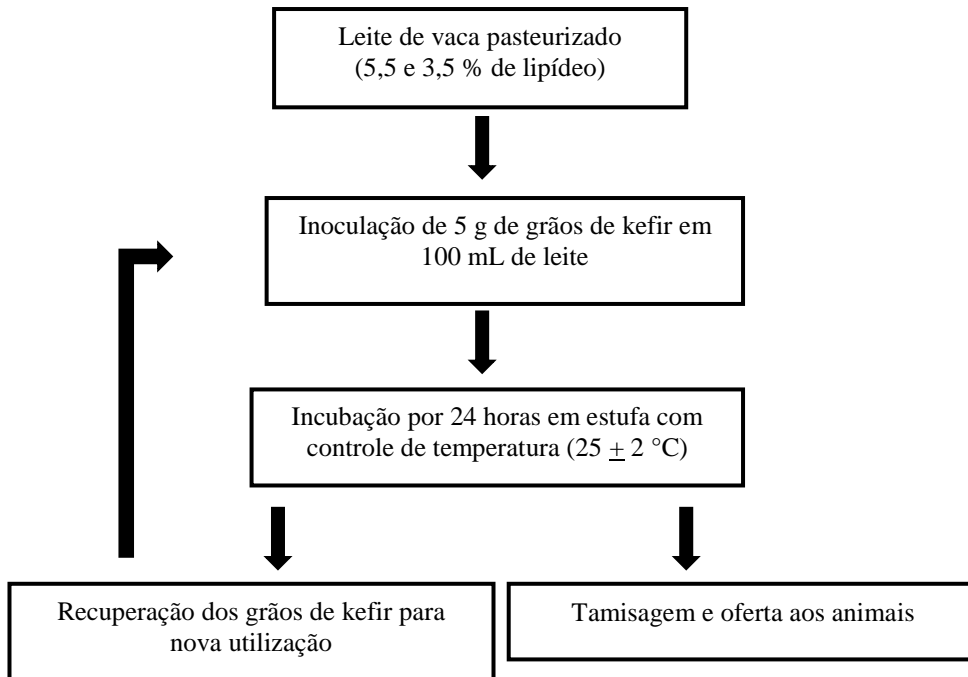
O ensaio foi realizado com grãos de kefir obtidos de culturas de consumo doméstico na região de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Foram utilizados dois tipos de leite de vaca previamente pasteurizados com diferentes concentrações de lipídeos, sendo o Leite A com 5,5 % de lipídeo e Leite B com 3,5 % de lipídeo.

Inicialmente, foram inoculados 5 g de grãos de kefir em 100 mL de leite de vaca pasteurizado, a 4 °C, em recipiente de vidro previamente higienizado. As amostras foram incubadas em estufa em temperatura controlada de 25 ± 2 °C, em condição aeróbia, por 24 horas, segundo o protocolo de Ferreira (2010).

Após o período de fermentação, foi realizada a tamisagem, em peneira, sob assepsia, separando-se os grãos de kefir do kefir (produto da fermentação dos grãos de kefir em leite a 5,5 e 3,5 % de lipídeo). Os grãos retidos na tamisagem foram novamente inoculados em nova alíquota de leite, repetindo-se as etapas anteriormente descritas.

O kefir foi utilizado para análise química e microbiológica.

A produção e a manipulação do leite e do kefir de leite foram realizadas no Laboratório de Bioquímica Nutricional, do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa.



**Figura 1** - Fluxograma para a produção de kefir de leite de vaca.

## 5.4.2. Modelo Experimental

### 5.4.2.1. Modelo animal

Foram utilizados inicialmente 35 ratos machos SHR (Spontaneously Hypertensive Rats), com dois dias de vida, procedentes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram mantidos em ninhadas durante o período de lactação (30 dias), em ambiente com temperatura controlada ( $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ) e fotoperíodo de 12 horas. O experimento foi conduzido considerando os princípios éticos para manejo de animais de laboratório.

#### **5.4.2.2. Período neonatal e lactação**

Utilizaram 14 matrizes prenhes de ratas SHR. Após o nascimento, os filhotes machos foram submetidos ao protocolo de indução da síndrome metabólica (SM), proposto por Yamazaki et al. (2011).

A partir do segundo dia de vida até o sétimo dia foram aplicadas diariamente, na região cervical dos animais, injeções subcutâneas de solução de glutamato monossódico - MSG (Sigma Co., St. Louis, MO) a uma concentração de 240 mg/mL, para indução da SM. A dosagem administrada a cada animal foi correspondente a 4 mg de MSG/g de peso corporal.

#### **5.4.2.3. Desenvolvimento da síndrome metabólica**

Após o desmame (30 dias), os filhotes foram alojados em caixas coletivas (4 animais/caixa). Todos os animais receberam ração comercial (Nuvilab<sup>®</sup>) até o início do período experimental (12 primeiras semanas).

Para confirmação da SM, os animais (12 semanas de vida) foram submetidos, inicialmente, à avaliação dos seguintes parâmetros: pressão arterial, mensuração da glicemia sanguínea de jejum e aferição do peso corporal. Todos esses procedimentos foram também avaliados ao final do experimento.

Após essa etapa, os animais foram transferidos para gaiolas individuais, iniciando, além da oferta de dieta comercial, o tratamento de acordo com o grupo ao qual pertencia, sendo: grupo Leite A (com 5,5 % de lipídeo), grupo Kefir A (produzido a partir do leite com 5,5 % de lipídeo), grupo Leite B (com 3,5 % de lipídeo), grupo Kefir B (produzido a partir do leite com 3,5 % de lipídeo) e grupo controle (MSG+Sal) via gavagem. Considerando que este modelo animal possui capacidade gástrica de aproximadamente 3 mL, optou-se por administrar diariamente 1 mL de leite/kefir, por 10 (dez) semanas, o que corresponde a aproximadamente 250 mL consumidos por um ser humano de 70 kg.

#### **5.4.2.4. Avaliação da pressão arterial**

As medidas de pressão arterial sistólica foram aferidas pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos.

Para a medida da pressão arterial, os ratos foram alocados dentro de um dispositivo de acrílico para contenção. Todos os animais foram previamente condicionados a esse procedimento experimental. Um esfigmomanômetro foi ajustado à cauda do animal e insuflado até a oclusão do fluxo sanguíneo, para que, ao ser desobstruído, os primeiros picos de pressão arterial sistólica (PAS), diastólica (PAD) e frequência cardíaca FC fossem aferidos.

Os animais (*Rattus norvegicus*) que apresentam valores de pressão arterial inferiores a 134/60 mmHg são considerados normotensos (CUBAS et al. 2007). Neste trabalho, foram considerados hipertensos os animais que obtivessem valor de PAS/PAD superior a 151/61 mmHg.

A aferição da pressão foi realizada em dois tempos (antes e ao final do período experimental), sendo utilizada como valor representativo a média de três medidas centrais.

#### **5.4.2.5. Glicemia de jejum**

Com 12 semanas de vida e ao final do período de tratamento, a glicemia de jejum foi avaliada. Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas. Após esse período, a coleta de sangue foi realizada a partir de um pequeno corte na extremidade da cauda do animal. O sangue foi coletado e analisado com tiras reagente e glicosímetro (Accu-Chek\_Roche®), visando à determinação da concentração de glicose.

#### **5.4.2.6. Crescimento**

O ganho de peso corporal e a ingestão alimentar dos animais dos cinco grupos foi registrados semanalmente, durante as 10 semanas de tratamento. Esses dados foram utilizados para o cálculo do coeficiente de eficiência alimentar (CEA), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{CEA} = \frac{\text{Ganho de peso do animal (g)}}{\text{Consumo da ração (g)}}$$

#### **5.4.2.7. Eutanásia**

O procedimento de eutanásia foi realizado no Laboratório de Nutrição Experimental, em área afastada do alojamento e de outros animais. A eutanásia foi feita por um profissional devidamente capacitado (Médico Veterinário), junto a uma equipe de apoio devidamente treinada. Ao final das 10 semanas de tratamento, os animais foram dessensibilizados com isoflurano, utilizando-se aparelho de anestesia inalatória, e eutanasiados com tiopental. Todo o procedimento foi realizado com o objetivo de favorecer uma morte humanitária dos animais, em consonância com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Este projeto (processo nº 107/2011) foi previamente aprovado em 25/05/2012 pela Comissão de Ética para Uso de Animais – CEUA/UFV e encontra-se de acordo com o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário e com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal/Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (COBEA/SBCAL).

#### **5.4.2.8. Amostras de Sangue**

As amostras de sangue foram coletadas por punção na artéria aorta abdominal dos animais e posteriormente centrifugadas a 3.500 rpm por 15 minutos. O soro foi retirado e armazenado a - 80°C.

#### **5.3.2.9. Dissecção dos órgãos**

Durante a eutanásia, os rins foram removidos e lavados em solução-tampão fosfato salino (PBS) e posteriormente pesados. O rim direito foi congelado a -80 °C, para análises posteriores. O rim esquerdo foi acondicionado em recipiente com o fixador formalina de Carson (CARSON *et al.*, 1973) permanecendo nele até o início do processamento histológico.



### **5.3.2.10. Análise de triglicerídeos, colesterol total e colesterol HDL séricos**

O colesterol total, a fração HDL-colesterol e os triglicerídeos foram determinados por meio do método enzimático colorimétrico, utilizando-se kits comerciais (Bioclin®, Brasil), seguindo os procedimentos descritos no protocolo do fabricante. Após as reações, a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Shimadzu®, modelo UV – 1601), em 500 nm. Os resultados foram expressos em mg/dL.

### **5.3.3. Procedimentos analíticos para avaliação da função renal**

#### **5.4.3.1. Dosagem de Ureia**

A concentração de ureia plasmática foi determinada através do kit comercial Bioclin (Quibasa®, Belo Horizonte, MG, Brasil) e de acordo com as instruções do fornecedor.

$$[\text{Ureia}]_{\text{soro}}(\text{mg/dL}) = \text{absorbância da amostra} \times 70 / \text{absorbância do padrão}$$

#### **5.4.3.2. Dosagem de creatinina**

A taxa de filtração glomerular (TFG) foi estimada por meio do *clearance* de creatinina. Esta foi determinada nas amostras de urina e soro, utilizando kits comerciais da Bioclin (Quibasa®, Belo Horizonte, MG, Brasil). A reação foi feita em duplicata, de acordo com as instruções do fornecedor e mediante a construção prévia de uma curva padrão. O princípio consiste na reação da creatinina com solução de ácido pícrico, em meio alcalino.

A TFG foi estimada utilizando a equação:

**Clearance de Creatinina (mL/min):**

$$([\text{Creatinina}]_{\text{urina}} \times \text{Fluxo Urinário}) / [\text{Creatinina}]_{\text{plasma}}$$

### **5.4.3.3. Microalbuminúria**

A microalbuminúria foi determinada em amostras de urina de 24 horas, utilizando kit comercial Bioclin (Quibasa<sup>®</sup>, Belo Horizonte, MG, Brasil), de acordo com as instruções do fornecedor.

A proteína excretada na urina foi expressa em mg/24 horas.

O resultado encontrado pela técnica foi dado em mg/L. Para expressão do resultado em mg/24 horas, foi utilizada a fórmula a seguir:

$$\text{Microalbuminúria (mg/24horas)} = \frac{\text{Microalbuminúria (mg/L)} \times \text{Volume Urinário (L)}}{24 \text{ horas}}$$

### **5.4.3.4. Dosagem de sódio e potássio**

As concentrações de sódio e potássio, nas amostras de urina de 24 horas e plasma, foram determinadas por meio de fotometria de chama (Celm, FC 180). Previamente às análises das amostras, foi feita curva-padrão de Na<sup>2+</sup> e K<sup>+</sup> variando de 0 a 20 mg/L. Para a leitura, 10 µL de amostra foram diluídos em 5 mL de água deionizada.

### **5.4.4. Análise da atividade enzimática renal**

#### **5.4.4.1. Catalase (CAT)**

A enzima catalase é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio:  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ . Essa reação pode ser observada diretamente pela diminuição da leitura da absorvância em comprimento de onda de 240 nm, em espectrofotômetro (Pró-análise UV. 1600). Logo, a medida da atividade da catalase baseia-se no decaimento da absorvância em 240 nm, sendo a quantificação feita pela diferença na absorvância por unidade de tempo (AEBI, 1984).

Para determinar a atividade da CAT, porções do rim foram homogeneizadas em tampão fosfato 50 mM, e a suspensão resultante foi

centrifugada por 10 minutos a 6.000 rpm, 4 °C. O sobrenadante foi usado para dosar as enzimas, em triplicata.

#### **5.4.4.2. Superóxido Dismutase (SOD)**

A enzima superóxido dismutase (SOD) catalisa a dismutação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ . A medida da atividade da SOD é baseada nessa habilidade de consumir o radical  $O_2^-$ , diminuindo a razão de autoxidação do pirogalol (1,2,3- tri-hidroxibenzeno) em leitor de microplasma (Asys, UVM 340) a 570 nm (DIETERICH et al., 2000).

Inicialmente 100 mg de tecido renal foram homogeneizados em 1 mL de tampão fosfato (50 mM) e centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. Em seguida, 30  $\mu$ L do sobrenadante foram pipetados diretamente em placa de 96 poços, acrescentando-se: 99  $\mu$ L de tampão fosfato, 6  $\mu$ L de MTT (brometo de dimetiltiazol-difeniltetrazolium) e 15  $\mu$ L de pirogalol.

Para o branco, o pirogalol foi substituído por tampão fosfato, e para o padrão, a amostra foi substituída por tampão fosfato. Após cinco minutos de incubação a 37 °C, adicionaram 150  $\mu$ L de DMSO (dimetilsulfóxido) e, posteriormente, realizou-se a leitura da placa a uma absorbância de 570 nm.

Para o cálculo do resultado, considerou-se que uma unidade de SOD é capaz de evitar a autoxidação de 50 % de pirogalol do padrão. O resultado foi expresso em unidades de SOD por mg de proteína.

O conteúdo de proteínas foi mensurado de acordo com o método descrito por Lowry et al. (1951).

#### **5.4.4.3. Glutathione S-Transferase (GST)**

A atividade da enzima GST citosólica foi determinada segundo protocolo de Habig et al. (1974). Foi utilizado como substrato 1 cloro 2, 4 dinitrobenzeno (CDNB) (Sigma), preparado em etanol 80 %. A análise foi conduzida em triplicata a 25 °C, com tampão fosfato de potássio 0,1 M e pH 7,4, na presença de 1 mM de glutathione reduzida, 1 mM de CDNB e 100  $\mu$ L de extrato de rim. O controle foi feito sem adição da fração citosólica, para verificar a taxa de reações não enzimáticas. A variação da absorbância, quando o substrato

estava conjugado com a glutationa, foi mensurada a 340 nm, usando espectrofotômetro modelo GBC-UV 918.

#### **5.4.5. Análise Histológica do rim**

##### **5.4.5.1. Procedimento Histológico**

O processamento consistiu em etapas de desidratação em gradiente crescente de etanol (70 %, 80 %, 90 %, 95 % e 100 %), com trocas a cada 60 minutos. Posteriormente, o material foi diafanizado em xilol (álcool + xilol, xilol I, xilol II e xilol III), com trocas a cada 60 minutos, e incluídos em paraplast (Paraplast Plus® - Sigma).

A microtomia foi realizada em micrótomo rotativo manual (Olympus América Inc., CUT 4055), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura, com navalha de aço. Foram selecionados seis animais de cada grupo e confeccionadas três lâminas com cinco cortes de cada animal. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), montadas com Entellan® (Merck, Alemanha) e, posteriormente, visualizadas em microscópio em microscópio óptico.

##### **5.4.5.2. Fotomicrografia**

As imagens foram obtidas dos cortes corados, utilizando-se a câmera digital de captura (QColor-3 - Olympus) acoplada ao microscópio de luz (BX-50 - Olympus) e a um software computadorizado (Q-Capture Pro 6.0), no Laboratório de Associação de Micorrizas do Departamento de Microbiologia da UFV.

##### **5.4.5.3. Análise morfométrica do rim**

Para análise morfométrica do rim, foram capturadas 30 imagens de cada animal (objetiva de 20x), e selecionadas 18 imagens para análise.

Através das imagens foi quantificado o número de glomérulos e a área de cada glomérulo por campo histológico, pelo software Image-Pro Plus<sup>®</sup> versão 4.5 (Media Cybernetics).

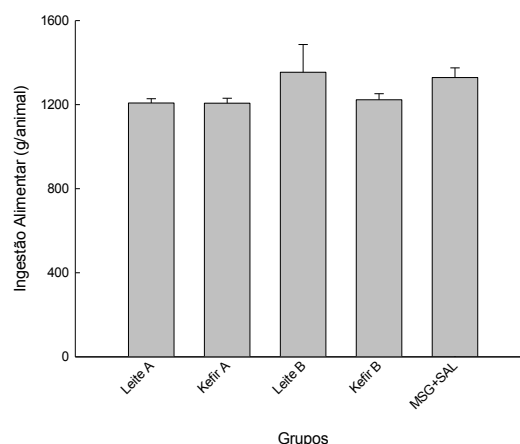
#### 5.4.6. Análises Estatísticas

Após verificação da normalidade, pelo teste de Shapiro-Wilk e, ou, Kolmogorov-Smirnov, e da homogeneidade de variância, pelo teste de Levene e, ou, Bartlett, os dados foram submetidos à análise de variância, avaliando-se os grupos pelo teste de Tukey e as variações temporais dentro de cada grupo pelo teste t pareado, ambos a 5 % de probabilidade. Para análise estatística foi utilizado o programa SAS<sup>®</sup> 9.2 (Statistical Analysis System).

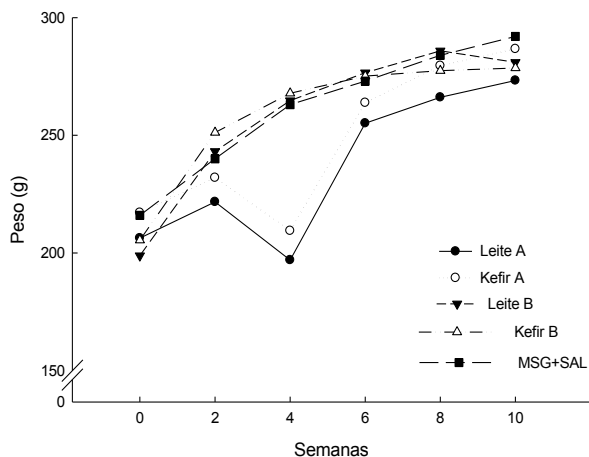
### 5.5. RESULTADOS

#### Evolução ponderal, ingestão alimentar e coeficiente de eficiência alimentar

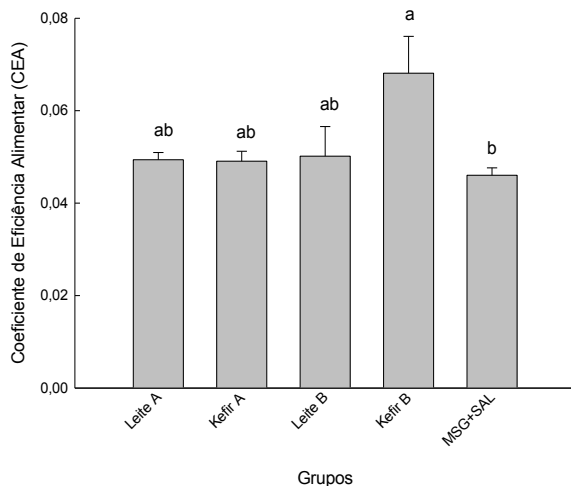
Durante o período experimental, o consumo alimentar dos animais foi registrado semanalmente. A quantidade de ração oferecida e não consumida pelo animal foi quantificada semanalmente em balança analítica. Observa-se que não houve diferença significativa no consumo de ração e ganho de peso entre os grupos ao final do período experimental (Figuras 2 e 3). Contudo, o coeficiente de eficiência alimentar foi significativamente maior no grupo Kefir B ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).



**Figura 2** - Consumo alimentar total dos animais durante o período experimental (10 semanas). Resultados expressos em média e desvio-padrão. Tukey,  $p < 0,05$ .



**Figura 3** - Evolução ponderal dos animais alimentados com dieta comercial, recebendo leite e kefir derivado. Resultados expressos em média do peso em gramas.



**Figura 4** - Coeficiente de eficiência alimentar (CEA). Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey,  $p < 0,05$ .

O coeficiente de eficiência alimentar consiste em uma importante ferramenta para avaliar a ingestão de nutrientes, sua absorção e assimilação pelos tecidos. Neste estudo, o CEA apresentou diferença significativa entre os grupos Kefir B e controle (MSG+Sal), o qual apresentou menor relação entre o ganho de peso e consumo alimentar ( $p < 0,05$ ) (Figura 4). Considerando que não houve diferença significativa no consumo alimentar de ração entre os grupos ao final do período experimental, pode-se considerar que os animais que consumiram leite e kefir tiveram maior ganho de peso e conseqüentemente, maior CEA em relação ao grupo controle, em razão do consumo adicional diário de leite/kefir.

## **Pressão arterial e parâmetros bioquímicos**

Na Tabela 4 estão apresentados os valores de pressão arterial e parâmetros bioquímicos de ratos SHR submetidos ao consumo crônico de leite e kefir .

Apesar da considerável redução nos níveis pressóricos nos distintos tratamentos ao final do período experimental, diferença significativa foi observada apenas no grupo Leite B, no qual se observou redução de 46 mmHg na PAS ( $p < 0,05$ ).

## **Glicemia Sanguínea**

Na avaliação da glicemia de jejum inicial (antes do tratamento) e final (após o tratamento), observou-se aumento significativo nos níveis de glicemia sanguínea para os tratamentos Leite A e Kefir A ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Valores de referência para glicemia sanguínea de *Rattus norvegicus* adultos encontram-se entre 50-135 mg/dL (CUBAS et al., 2007). Logo, pode-se inferir que, apesar do aumento significativo, os mesmos são classificados como normoglicêmicos.

## **Perfil Lipídico**

O perfil lipídico sanguíneo ao final de dez semanas é apresentado na Tabela 4. Em relação ao perfil lipídico dos animais, observou-se diferença significativa para os níveis de colesterol entre o grupo controle (MSG+Sal) e Kefir A, Kefir B e Leite B ( $p < 0,05$ ). Assim, pode-se inferir que o consumo de Kefir (A e B) e Leite B influenciou significativamente na redução dos níveis de colesterol dos animais.

Quanto ao HDL-colesterol, este apresentou-se mais elevado no grupo controle (MSG+Sal) e menor no Kefir A ( $p < 0,05$ ).

Os níveis de triglicerídeos não diferiram significativamente entre os grupos ao final do período experimental.

**Tabela 4** - Valores de pressão arterial e parâmetros bioquímicos de ratos SHR submetidos ao consumo crônico de leite e kefir derivado

<b>Variáveis</b>	<b>Leite A</b>	<b>Kefir A</b>	<b>Kefir B</b>	<b>Leite B</b>	<b>MSG+SAL</b>
<b>PAS basal (mmHg)</b>	206,1±17,9	210,2±19,2	207,2±14,5	241,7±25,7*	220,6±35,0
<b>PAS 10<sup>a</sup> semana (mmHg)</b>	199,6±15,6	201,3±17,0	196,2±17,4	195,3±20,8	217,5±29,3
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	47,5±7,2 <sup>ab</sup>	44,4±4,8 <sup>b</sup>	40,8±6,4 <sup>b</sup>	41,8±4,4 <sup>b</sup>	57,5±12,5 <sup>a</sup>
<b>HDL (mg/dL)</b>	22,1±3,1 <sup>ab</sup>	21,1±2,4 <sup>b</sup>	23,6±1,2 <sup>ab</sup>	26,4±6,7 <sup>ab</sup>	27,7±5,2 <sup>a</sup>
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	73,2±22,7	65,1±9,9	73,0±16,9	72,8±22,6	52,1±7,9
<b>Glicemia jejum inicial (mg/dL)</b>	75,9±9,1 <sup>ab</sup>	74,4±5,0 <sup>b</sup>	89,3±10,7 <sup>a</sup>	78,9±11,2 <sup>ab</sup>	86,7±8,9 <sup>ab</sup>
<b>Glicemia jejum final (mg/dL)</b>	90,3 ±7,8 <sup>a*</sup>	92,3±10,4 <sup>a*</sup>	84,4±18,6 <sup>a</sup>	78,1±6,0 <sup>a</sup>	82,4±6,4 <sup>a</sup>
<b>TGO (U/L)</b>	274,1±53,6 <sup>a</sup>	205,2±29,9 <sup>b</sup>	242,6±40,6 <sup>ab</sup>	190,7±23,4 <sup>bc</sup>	144,1±25,8 <sup>cd</sup>
<b>TGP (U/L)</b>	85,7±22,1 <sup>a</sup>	60,6±13,6 <sup>b</sup>	71,8±12 <sup>ab</sup>	60,2±5,3 <sup>b</sup>	73±14,6 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão da pressão arterial sistólica (PAS); colesterol total; HDL-colesterol; triglicerídeos; glicemia de jejum nos tempos inicial e final dos grupos de animais induzidos com glutamato monossódico que consumiram leite e kefir e solução salina (MSG+SAL). Médias seguidas por letras minúsculas iguais nas colunas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. \* significativo a 5 % pelo teste t-pareado.



## **Parâmetros Bioquímicos Renais**

### **Ureia Plasmática**

Ao final do período experimental, observou-se que a concentração de ureia plasmática foi significativamente maior no grupo controle (MSG+Sal) e Leite A ( $p < 0,05$ ) e menor no grupo Leite B ( $p < 0,05$ ) (Tabela 5). Valores de referência para ureia plasmática de *Rattus norvegicus* adultos encontram-se entre 15 e 54 mg/dL (CUBAS et al., 2007).

### **Creatinina plasmática e *clearance* de creatinina**

A relação da concentração urinária de determinada substância com sua concentração no plasma é útil para se determinar a capacidade de excreção dos rins. Os estudos de depuração refletem o nível total da função glomerular e a capacidade dos rins de depurar determinada substância do plasma. A creatinina é o produto final do metabolismo da creatina; esta se torna elevada quando há insuficiência renal.

A dosagem de creatinina plasmática ao final do período experimental não evidenciou diferença significativa entre os tratamentos. Entretanto, pode-se observar na Tabela 5 que o grupo Kefir B apresentou maiores valores de creatinina plasmática. Valores de referência para creatinina plasmática de *Rattus norvegicus* adultos encontram-se entre 0,2 e 0,8 mg/dL (CUBAS et al., 2007).

Com relação ao *clearance* de creatinina, não houve diferença significativa entre os tratamentos. O tratamento Kefir B apresentou menor depuração de creatinina, como pode ser visualizado na Tabela 5.

**Tabela 5** - Parâmetros bioquímicos renais

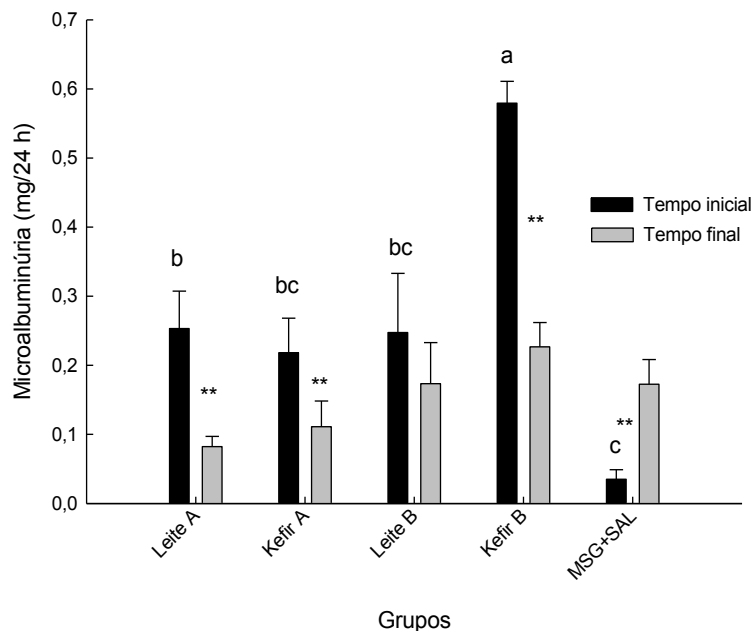
<b>Variáveis</b>	<b>Leite A</b>	<b>Kefir A</b>	<b>Kefir B</b>	<b>Leite B</b>	<b>MSG+SAL</b>
<b>Ureia Plasmática</b> (mg/dL)	44,6±7,2 <sup>a</sup>	36,4±5,4 <sup>ab</sup>	36,6±6,3 <sup>ab</sup>	30,4±2,1 <sup>b</sup>	42,4±5,6 <sup>a</sup>
<b>Creatinina Plasmática</b> (mg/dL)	0,43±0,06	0,41±0,10	0,48±0,13	0,37±0,07	0,39±0,07
<b>Clearance de Creatinina</b> (mg/24h)	0,02±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01

Média ± desvi- padrão dos parâmetros bioquímicos renais (ureia plasmática, creatinina e *clearance* de creatinina) de animais induzidos com glutamato monossódico que consumiram leite e solução salina (MSG+SAL); com \*p < 0,05. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste-Tukey.

## Microalbuminúria

A hipertensão pode exacerbar a lesão dos glomérulos e dos vasos sanguíneos renais, sendo uma das principais causas de doença renal terminal. Por outro lado, anormalidades da função renal podem causar hipertensão. Assim, a relação entre hipertensão e doença renal pode, em certos casos, gerar um círculo vicioso: a lesão renal primária leva a aumento da pressão sanguínea, que, por sua vez, causa mais danos aos rins, aumentando ainda mais a pressão sanguínea, e assim por diante, até que se desenvolva doença renal terminal (GUYTON; HALL, 2006).

Quando avaliado ao final do período experimental, observou-se redução significativa ( $p < 0,01$ ) na concentração de microalbumina urinária nos grupos Leite A, Kefir A, Kefir B, bem como aumento significativo no grupo controle (MSG+Sal) ( $p < 0,01$ ). Apesar da redução nos níveis de microalbumina urinária no grupo Leite B, este não foi significativo (Figura 5).



**Figura 5** - Microalbuminúria nos tempos inicial e final. Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste-Tukey. \*\* significativo a 1 % de probabilidade pelo teste t-pareado.

## Atividade das Enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutaciona S-Transferase (GSH)

A atividade antioxidante no rim foi avaliada por meio da quantificação da atividade enzimática das enzimas CAT, SOD e GSH. O consumo de kefir por 10 semanas não foi capaz de provocar alterações significativas na atividade enzimática da CAT.

A atividade da enzima SOD foi maior nos grupos de animais que consumiram Leite B e Kefir B ( $p < 0,05$ ) (Tabela 6).

A GSH apresentou maior atividade no grupo Kefir B, diferindo estatisticamente do grupo Leite A ( $p < 0,05$ ).

### Sódio e Potássio

As concentrações de sódio e potássio plasmático e urinário são apresentadas na Tabela 7. Apesar da ausência de significância, a excreção de sódio mostrou-se mais elevada no grupo controle (MSG+Sal). O consumo crônico de leite e kefir não produziu efeito detectável sobre a excreção de sódio em relação ao grupo controle. A concentração plasmática desse eletrólito também não diferiu entre os grupos.

**Tabela 6** - Enzimas do estresse oxidativo (U/mg Proteína) (catalase, superóxido dismutase e glutaciona S-transferase)

Tratamentos	CAT	SOD	GSH
Leite A	5,69±0,34	9,55±0,59 <sup>ab</sup>	1,35±0,25 <sup>c</sup>
Kefir A	5,76±0,37	8,12±1,50 <sup>b</sup>	1,56±0,33 <sup>ab</sup>
Kefir B	5,50±0,41	12,76±2,16 <sup>a</sup>	2,28±0,61 <sup>a</sup>
Leite B	5,88±0,43	13,02±3,27 <sup>a</sup>	1,84±0,38 <sup>ab</sup>
MSG+Sal	6,30±0,59	8,29±3,19 <sup>b</sup>	2,14±0,47 <sup>a</sup>

Média ± desvio-padrão das enzimas do estresse oxidativo catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutaciona S-transferase (GSH) dos grupos de animais induzidos com glutamato monossódico que consumiram Leite A (com 5,5 % de lipídeo), Kefir A (de leite com 5,5 % de lipídeo), Leite B (com 3,5 % de lipídeo) e Kefir B (de leite com 3,5 % de lipídeo) e solução salina (MSG+SAL). Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey.

**Tabela 7** - Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) de sódio e potássio da urina e soro de ratos submetidos ao consumo crônico de leite e kefir derivado

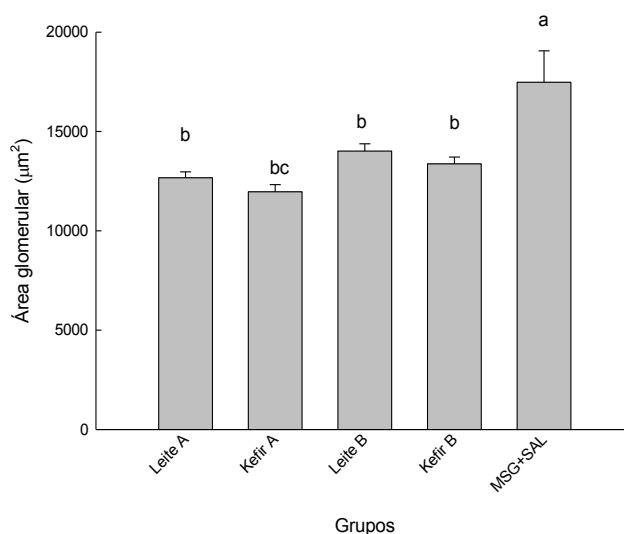
Grupos	Urina				Soro			
	Na	DP	K	DP	Na	DP	K	DP
<b>Leite A</b>	1229	160	8269 <sup>b</sup>	751	3066	104	243 <sup>a</sup>	6,6
<b>Kefir A</b>	1305	154	12284 <sup>b</sup>	2295	3152	119	219 <sup>ab</sup>	7,8
<b>Kefir B</b>	1903	219	10159 <sup>b</sup>	1357	3384	59	223 <sup>a</sup>	4,9
<b>Leite B</b>	1390	129	9767 <sup>b</sup>	1178	3020	181	197 <sup>b</sup>	7,5
<b>MSG+Sal</b>	1607	166	46658 <sup>a</sup>	11560	3335	81	196 <sup>b</sup>	5,6

Médias seguidas por letras iguais nas linhas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. K (potássio), Na (sódio), DP (desvio-padrão da média).

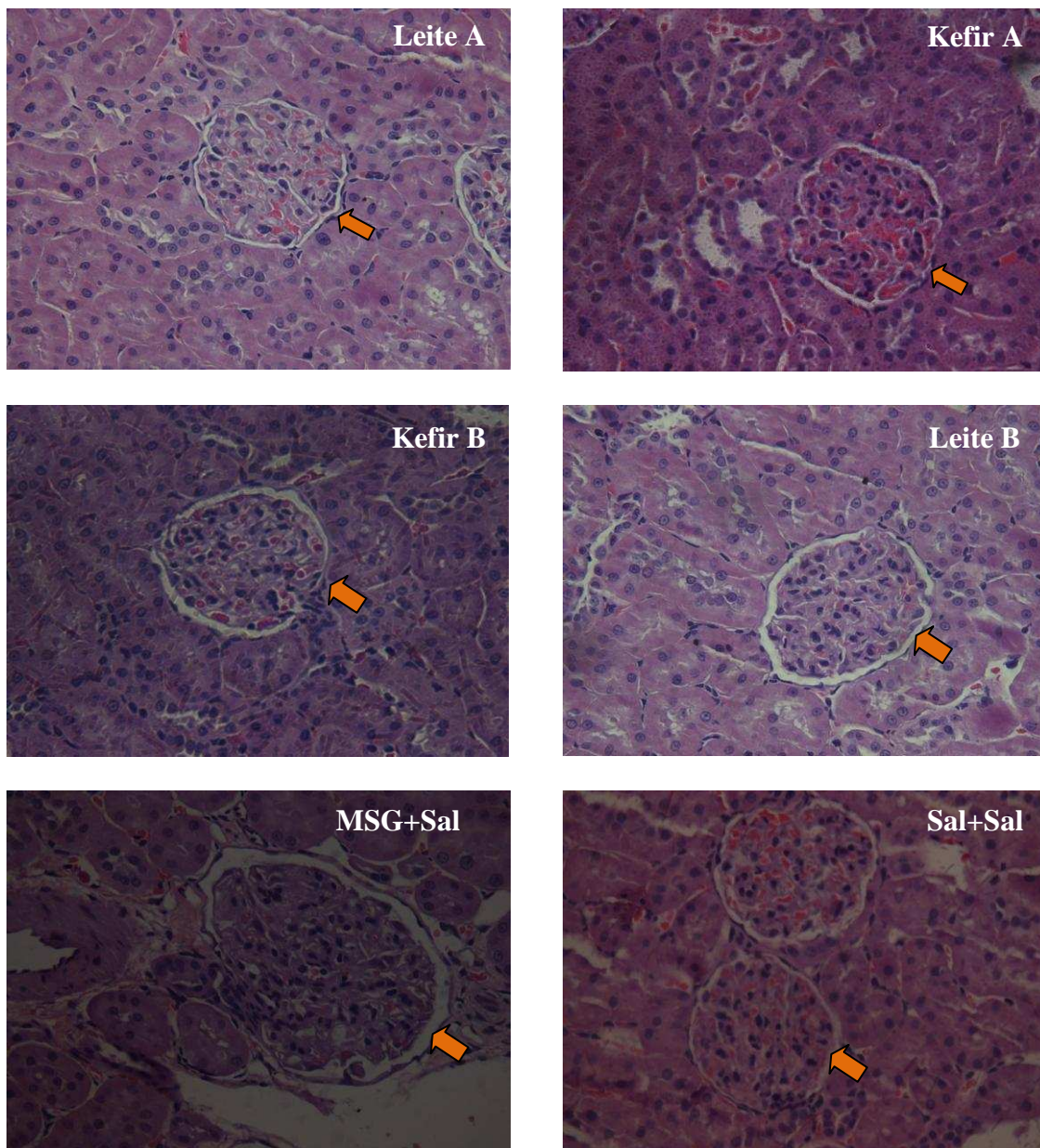
A excreção de potássio mostrou-se mais elevada nos animais do grupo controle (MSG+Sal) ( $p < 0,05$ ), diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) dos grupos de tratamentos (Leite A, Kefir A, Leite B, Kefir B). Logo, pode-se supor que o consumo crônico de leite e kefir influenciou na redução da excreção desse eletrólito. A concentração plasmática de potássio foi significativamente maior nos grupos Leite A e Kefir B ( $p < 0,05$ ).

### Morfometria dos Glomérulos

Na Figura 6 são apresentados os valores referentes à área glomerular, em relação aos diferentes tratamentos. Pode-se observar que os animais dos grupos tratados com Leite A, Kefir A, Leite B e Kefir B apresentam área glomerular significativamente menor em relação ao grupo controle (MSG+Sal) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6.** Área glomerular ( $\mu\text{m}^2$ ). Médias seguidas por letras iguais nas colunas não diferem a 5 % de probabilidade pelo teste Tukey.



**Figura 7** - Leite A (com 5,5 % lipídeo), Kefir A (leite com 5,5 % lipídeo), Leite B (com 3,5 % de lipídeo), Kefir B (com 3,5 % de lipídeo), grupo controle (induzido com MSG, tratado com solução salina). Tecido renal incluído em parafina e corado com HE (hematoxilina e eosina). Aumento de 20x.

## 5.6. DISCUSSÃO

A ingestão alimentar e a evolução ponderal foram semelhantes entre os grupos tratados, indicando boa aceitação da bebida fermentada pelos animais SHR.

A ingestão de leite e kefir não influenciou o consumo alimentar e no ganho de peso dos animais ao longo do período experimental. Contudo,

observa-se um maior CEA no grupo Kefir B. Avaliando as Figuras 2, 3 e 4, pode-se supor que esse resultado foi decorrente do maior ganho de peso pelo grupo, bem como da ausência de perda de peso durante o período experimental. O coeficiente de eficiência alimentar é uma importante ferramenta para avaliar a ingestão de nutrientes, sua absorção e retenção pelos tecidos.

O MSG consiste em uma substância neurotóxica que, quando administrada no período neonatal em ratos, os quais apresentam a barreira hematoencefálica não formada completamente, provoca lesões no núcleo arqueado do hipotálamo (CESARETTI et al., 2006). Esta região tem papel importante na regulação do controle da ingestão alimentar e gasto energético (BENATTI; JUNIOR, 2007).

Analisando a consumo alimentar total dos animais (ração + leite/kefir), percebe-se que os tratamentos tiveram ingestão energética total maior em relação ao grupo controle (MSG+Sal). A ingestão alimentar do grupo controle (MSG+Sal) não diferiu significativamente da dos demais grupos, porém pode-se considerar que o ganho de peso foi relativamente maior, visto que este grupo consumiu somente ração comercial. Esse fato pode estar relacionado à redução da taxa metabólica basal desses animais provocada por uma possível lesão na região de controle do metabolismo energético.

Em estudo desenvolvido por Jascolka (2010) com animais ApoE<sup>-/-</sup>, a evolução ponderal não foi influenciada após o consumo de kefir de água (50 g de grãos de kefir/30 g de açúcar mascavo/L) por quatro semanas. Esse fato contribuiu com a evidência que o consumo de kefir na forma como foi administrado não influenciou no ganho de peso dos animais.

O efeito hipotensor dos produtos lácteos tem sido associado a proteínas do leite (caseínas) e aos produtos de sua degradação: os peptídeos. Entre estes, destacam-se os tripeptídeos lácteos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro, derivados da  $\beta$ -caseína. Eles foram primeiramente identificados e caracterizados por Nakamura et al. (1995), provenientes de uma bebida de leite fermentado contendo *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces*. Possuem alta atividade hipotensora, podendo inibir até 50 % da atividade da ECA *in vitro* em baixas concentrações (9  $\mu$ M de Val-Pro-Pro e 5  $\mu$ M de Ile-Pro-Pro) (RICCI-CABELLO et al., 2012).

O kefir utilizado neste estudo foi previamente analisado quanto a sua composição centesimal e microbiológica de BAL e leveduras (concentração acima de  $10^7$  UFC/mL e  $10^4$  UFC/mL para BAL e leveduras, respectivamente). A composição microbiológica de grãos de kefir é bastante variável em número e espécies de micro-organismos e varia de acordo com a origem dos grãos e forma de cultivo (SIMOVA et al., 2002; GUZEL-SEYDIM et al. 2005). Algumas BAL isoladas a partir dos grãos de kefir incluem: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactococcus lactis* e *Leuconostoc mesenteroides* (SCHOEMAN; BRITZ, 2003; WITTHUHN et al., 2005) e *Lactobacillus delbruecki* (PLESSAS et al., 2011).

A fermentação do leite no processo de incubação com kefir pode levar a produção de peptídeos bioativos, os quais podem exercer atividade anti-hipertensiva (SEPPO et al., 2003), o que poderia ter contribuído para o resultado observado.

Em estudo desenvolvido por Sipola et al. (2002), ratos SHR que consumiram produtos lácteos fermentados com *L. helveticus* durante quatorze semanas apresentaram redução nos níveis de PAS (11 a 21 mmHg). Em outro estudo, desenvolvido por Jakala et al. (2009), verificou-se redução na PAS (7 a 14 mmHg) de ratos SHR após oito semanas de tratamento com produtos lácteos contendo maior diversidade de tripeptídeos. Um estudo realizado em humanos, os quais consumiram 250 mL de iogurte enriquecido com os tripeptídeos Ile-Pro-Pro (81,6 mg/L) e Leu-Pro-Pro (66 mg/L), detectou a presença destes no plasma após sua ingestão (FOLTZ et al., 2007). Posteriormente, o mesmo autor, concluiu que os tripeptídeos Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro foram transportados intactos através da membrana intestinal em três diferentes modelos animais (FOLTZ et al., 2008). Esse fato confirma a concepção de atividade hipotensora dos peptídeos, produtos da fermentação em produtos lácteos. A ingestão de maior volume de kefir ou maior concentração em 10 semanas poderia apresentar maior efetividade na redução da pressão arterial.

O modelo experimental animal SHR apresenta intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina quando comparado com animais Wistar normotensos (SWISLOCKI et al., 1993). A causa mais provável para



explicar o aumento da glicemia em animais SHR deve-se ao hipercortisolismo presente nesse modelo, associado à redução da capacidade de transporte de glicose por diminuição da atividade dos transportadores GLUT-4 e pelo aumento da gordura visceral em detrimento da gordura marrom (DO CARMO et al., 2009).

Neste estudo, no início do tratamento (tempo zero) os animais apresentaram valores normais de glicemia sanguínea. Após o período de tratamento (10 semanas), observaram níveis glicêmicos aumentados para os tratamentos Leite A e Kefir A. Entretanto, a glicemia plasmática ainda apresentou valores fisiológicos, caracterizando o modelo SHR como normoglicêmico.

Em estudo desenvolvido por Jacolska (2010) com animais ApoE<sup>-/-</sup> não foram identificadas alterações nos níveis de glicemia sanguínea após ingestão de kefir de água com açúcar mascavo (50 g de grãos de kefir/30 g de açúcar mascavo/L) por quatro semanas. Uma possível explicação para a manutenção dos níveis glicêmicos dos grupos Kefir B, Leite B e grupo controle (MSG+Sal) seria a afirmação de que variações individuais na linhagem genética dos SHR podem influenciar no metabolismo, e conseqüentemente, nos níveis glicêmicos dos mesmos (PINTO; GANTEN; 1998).

Neste estudo, os grupos Kefir A, Kefir B e Leite B apresentaram níveis mais reduzidos de colesterol em comparação ao grupo controle (MSG+Sal) ( $p < 0,05$ ). Em animais alimentados com kefir, a atividade de BAL pode estar associada à redução dos níveis de colesterol. Os possíveis mecanismos pelos quais as BAL exercem essa atividade hipocolesterolêmica são: associação direta das células bacterianas ao colesterol, dificultando sua absorção pelo organismo (GILLILAND et al., 1985); inibição da HMG- CoA redutase (síntese de colesterol) por alguns metabólitos das BAL, como o ácido propiônico (FUKUSHIMA; NAKANO, 1996); e desconjugação dos sais biliares e produção de ácidos biliares livres, que são mais suscetíveis à excreção, diminuindo a reabsorção destes via entero-hepática e favorecendo a utilização de colesterol para síntese de novos sais biliares (St-ONGE et al., 2002; XIAO et al., 2003).

Muitas BAL são consideradas probióticas por exercerem efeito hipocolesterolêmico (JAIN et al., 2009; LEE et al., 2009; WANG et al., 2009). Em estudo desenvolvido por WANG et al. (2009), avaliaram-se os efeitos

de *L. plantarum* isolado de grãos de kefir do Tibet, a uma concentração de  $10^{11}$  células/dia/animal, no metabolismo lipídico de ratos alimentados com dieta hipercolesterolêmica por cinco semanas. No grupo que recebeu *L. plantarum* houve redução nos níveis séricos de colesterol total, LDL e triglicerídeos.

Em estudo desenvolvido por Bissoli (2005), a suplementação dietética de kefir de água (200 g de grãos de Kefir/400 mL de água/48 horas) durante 30 dias em coelhos não foi capaz de promover alterações no perfil lipídico sérico dos animais. Somente o grupo de coelhos que foi suplementado com os grãos de kefir na dieta apresentou níveis significativamente elevados de colesterol total e HDL.

A influência do consumo de kefir sobre o perfil lipídico ainda é controversa. Em estudo realizado com humanos, indivíduos hipercolesterolêmicos que ingeriram 500 mL de kefir de leite por quatro semanas não tiveram o perfil lipídico sérico (colesterol total, LDL, HDL e triglicerídeos) modificados pela bebida fermentada (St-ONGE et al., 2002).

Neste estudo, a concentração de ureia plasmática apresentou valores normais ao final do período experimental, não havendo diferença significativa entre os tratamentos Leite A, Kefir A, Kefir B e o grupo controle (MSG+Sal). O grupo Leite B apresentou valores significativamente menores. A ureia plasmática é um marcador de função renal. Assim, quando a concentração plasmática de ureia encontra-se elevada, pode ser um indicativo de disfunção renal.

O consumo de Kefir A, Kefir B e Leite B não produziu alterações significativas na concentração plasmática de creatinina nos tratamentos. Essa observação vai ao encontro dos resultados obtidos para o *clearance* de creatinina, que também não foi afetado pelos tratamentos.

Ao final do período experimental, observou-se redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos teores de microalbuminúria dos animais tratados com Leite A, Kefir A e Kefir B e aumento nos teores dos animais do grupo controle (MSG+Sal). Assim, considerando os parâmetros analisados, pode-se supor que o consumo de leite e kefir atuou como fator protetor renal. Estudos que associam o consumo crônico de kefir e função renal são escassos na literatura. Logo, são necessárias mais investigações criteriosas para compreensão dos

mecanismos envolvidos na influência do consumo de kefir nos parâmetros renais.

Aproximadamente 20 anos atrás, a microalbuminúria foi identificada como um importante preditor de doença renal, bem como de doença cardiovascular. Essa hipótese tem sido confirmada em estudos que demonstraram que a microalbuminúria está associada à síndrome metabólica, danos estruturais nos rins, perda de auto regulação e inflamação renal. Consiste em um preditor de proteinúria, baixa taxa de filtração glomerular e eventos cardiovasculares, bem como de doença renal crônica terminal e a mortalidade por doença cardiovascular. A redução de microalbuminúria indica melhora no prognóstico. A razão não é clara, mas está associada à redução dos danos estruturais renais (MOGENSEN, 2007).

O estresse oxidativo é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a capacidade antioxidante do organismo. A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona S-transferase (GSH), que constituem sistemas de defesa do organismo contra o estresse oxidativo, foi realizada nos rins. Estas enzimas decompõem as ERO, sendo a SOD conversora de radicais superóxido ( $O_2^-$ ) em  $H_2O_2$  e  $O_2$ , e a catalase responsável pela decomposição do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  (POWERS; JACKSON, 2008).

De acordo com os resultados obtidos, o kefir não exerceu ação significativa sobre a atividade da CAT nos rins. Embora não significativos, a atividade da CAT foi maior nos grupos controles (MSG+Sal; Sal+Sal). A catalase é uma enzima que tem capacidade de se adaptar a situações de elevado estresse oxidativo (WASSMANN et al., 2004), logo, supõe-se que a produção de EROS nos tecidos dos animais estudados não está elevada a ponto de tornar significativo o aumento de sua atividade. Apesar de não significativa, a menor atividade nos rins dos animais tratados pode ser considerada um efeito positivo do kefir em reduzir a produção de EROS.

Alguns estudos já demonstraram o potencial antioxidante do kefir. Nagira et al. (1999), em estudo *in vitro*, mostraram a ação do kefir na proteção aos danos oxidativos causados pelas EROs ao DNA, a proteínas e aos lipídeos. Güven et al. (2003a) realizaram um estudo em camundongos albinos *Swiss*, os quais consumiram kefir de leite (30 mL/kg), e constataram que a atividade das

enzimas antioxidantes GSH-Px e CAT, medida nas hemácias, não foi modificada. Em outro estudo, esses autores verificaram que a ingestão de kefir promoveu aumento da atividade de GSH-Px, mas sem modificação da atividade da CAT (GÜVEN et al., 2003b).

Sugere-se que o efeito estimulante de produtos fermentados sobre o sistema imunológico vem das bactérias, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não está completamente elucidado. Estudo sugere que compostos como o peptidoglicano, ácido teicoico e polissacarídeos presentes nas paredes das células de bactérias lácticas são responsáveis por essa ação (TAKAHASHI et al., 1993).

Segundo Lopitz-Otsoa et al. (2006), quando comparado ao leite de soja e leite de vaca, o kefir de leite e kefir de leite de soja demonstraram atividade antimutagênica e antioxidante elevada. Esses resultados sugerem que o kefir pode ser um componente alimentar promissor para a prevenção de danos oxidativos e mutagênicos e um potencial candidato para o papel de suplementos antioxidantes naturais úteis na dieta humana. No presente estudo, foi identificada menor atividade somente para a enzima GSH no grupo LI. Logo, sugere-se o desenvolvimento de estudos no qual se administre maior volume de kefir preparado com maior quantidade de grãos (por exemplo, 10-20 g/100 mL).

Após ser administrado, o MSG circulante dissocia-se em sódio (Na<sup>+</sup>) e L-glutamato. O L-glutamato chega à corrente sanguínea por meio de um sistema de transporte utilizando ATP. Uma parte do L-glutamato liga-se a estruturas celulares, e a outra é transformada em glutamina. Quando isso ocorre, as células tentam reparar alguns dos danos causados pela glutamina utilizando enzimas que estão presentes no retículo endoplasmático liso. No entanto, a célula não é capaz de remover completamente o excesso de glutamina (ORTIZ et al., 2006). Quando o L-glutamato chega em altas concentrações pela artéria renal, os rins atuam de forma a eliminá-lo. O corpúsculo renal recebe o L-glutamato pela artéria aferente, absorve e filtra causando danos às células glomerulares. Os túbulos contorcidos proximais são mais suscetíveis aos danos em comparação aos túbulos contorcidos distais.

No presente estudo, observou-se que a concentração de sódio urinário, embora não significativa, foi menor nos animais dos grupos LI, KI e LD. O

processo de hipertensão arterial promove aumento da resistência vascular renal. O SRAA ocasiona menor perfusão renal, resultando assim na maior reabsorção tubular de sódio.

O consumo crônico de leite e kefir não produziu efeito detectável sobre a excreção de sódio em relação ao grupo controle (MSG+Sal). A concentração plasmática desse eletrólito não diferiu entre os grupos. Apesar de não significativa, nos animais tratados com KD, a carga excretada de sódio foi maior. Constatou-se ainda que este grupo apresentou redução nos valores de PAS (10 mmHg). Assim, apesar de não significativa pode-se supor que a redução da PAS e, conseqüentemente, da resistência vascular renal otimizou a perfusão renal desse mineral.

A excreção renal de potássio é resultante da atuação de três mecanismos: a filtração glomerular, a extensa reabsorção no túbulo proximal e o controle da secreção de potássio nos segmentos finais dos néfrons. No túbulo distal final e no ducto coletor, o potássio é transportado por dois tipos celulares: células principais sensíveis a aldosterona e as células intercaladas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) (HEBERT, 2005). Nas células principais, a secreção de potássio ocorre por canais denominados de Romk. A aldosterona causa aumento da entrada de sódio na célula principal e, conseqüentemente, aumenta a oferta de dele para a bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o que ocasiona aumento do potássio intracelular, favorecendo a secreção desse íon pelos canais.

O aumento da resistência vascular renal pode estar associado ao aumento da atividade do sistema simpático renal (KORNER et al., 1993). A ativação do sistema simpático renal eleva a resistência vascular renal, a reabsorção tubular de sódio e a liberação de renina (DiBONA; KOPP, 1997). Segundo Azar et al. (1979), o aumento da resistência vascular pré-glomerular faz com que haja prevenção quanto ao aumento da pressão sistêmica, afetando os capilares glomerulares. Neste estudo, observou-se hipertrofia glomerular significativa dos animais do grupo controle (MSG+Sal). Isso sugere que o aumento da pressão arterial sistêmica tenha sido transmitido para o capilar glomerular desencadeando o estímulo para alteração fisiológica e conseqüentemente histológica.

Nos animais tratados com leite e kefir, observou-se área glomerular significativamente menor. Esse fato sugere que a ação dos tratamentos sobre a

pressão arterial e conseqüentemente sobre as células endoteliais renais, apesar de não significativa, preveniu o aumento da área glomerular.

## **5.7. CONCLUSÕES**

Os animais tratados com kefir não apresentaram alterações nos parâmetros renais que evidenciassem um quadro patológico. No grupo controle (MSG+Sal) foi observado microalbuminúria e hipertrofia glomerular, o que pode ser devido à maior atividade simpática nesses animais, como efeito da indução com MSG e, conseqüentemente, aumento na PAS.

A atividade enzimática da CAT não promoveu alterações significativas que evidenciassem aumento na produção de EROS. Para a GSH, observou-se atividade significativamente menor nos grupos tratados. Assim, sugere-se que o consumo de leite e Kefir exerceu efeito protetor contra as EROS no órgão analisado.

Estudos que abordem a função renal mediante o consumo de kefir ainda são escassos na literatura, o que demonstra o ineditismo e a necessidade de mais ensaios abordando a influência do consumo de produtos lácteos sobre os parâmetros renais.

## 5.8. REFERÊNCIAS

I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica (I DBSM). *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 84, n. 1, p. 1-28, 2005.

AEBI, H. Catalase in Vitro. *Methods of Enzymology*, v. 105, p. 121-127, 1984.

AIHARA, K; KAJIMOTO, O; HIRATA, H; TAKAHASHI, R; NAKAMURA, Y. Effect of Powdered Fermented Milk with *Lactobacillus helveticus* on Subjects with High-Normal Blood Pressure or Mild Hypertension. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 24, n. 4, p. 257–265, 2005.

ALBERTI, K.G; ZIMMET, P.Z. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Medicine*, v. 15, n. 7, p. 539-553, 1998.

ANAND, S.S; YI, Q; GERSTEIN, H; et al. Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease. *Circulation*, n. 108, p.420–425, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemistry. *Official Methods of Analysis of A.O.A.C.* 14 ed. Whashington; A.O.A.C, 1989.

BANACH, M; RYSZ, J. Current problems in hypertension and nephrology. *Expert Opinion Pharmacother*, v. 11, p. 2575–2578, 2010.

BENATTI, F. B.; JUNIOR, A. H. L. Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, v.13, n. 4, p. 263-269, 2007.

BISSOLI, M.C. *Respostas lipidêmicas de coelhos à ingestão de ração suplementada com quefir*. 2005. 48 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Escola de Veterinária/UNIFENAS, Alfenas.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução 5, de 13 de novembro de 2000. Disponível em: <[http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/leite\\_pi\\_q\\_leite\\_fermentado.htm](http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/leite_pi_q_leite_fermentado.htm)> Acesso em: 20 jan. 2013.

BRASIL. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Disponível em:

<<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>> Acesso em: 30 nov. 2012

DO CARMO, J.M.; TALLAM, L.S.; ROBERTS, J.V.; BRANDON, E.L.; BIGLANE, J.; DA SILVA, A.A.; *et al.* Impact of obesity on renal structure and function in the presence and absence of hypertension: evidence from melanocortin-4 receptordeficient mice. *American journal of physiology, regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 297, p. R803-12, 2009.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre, Artmed: 2003.

CÁNOVAS, J. M.; RENTEROA, P. Z.; MARTÍNEZ, A. M-C.; HERNÁNDEZ, M. L.; ALEMÁN, J. A. Péptidos bioactivos. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, v. 23, p. 219-227, 2011.

CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 59, p. 365 – 373, 1973.

CASES, A.; COLL, E. Dyslipidemia and the progression of renal disease in chronic renal failure patients. *Kidney International Supplements*, v. 68, p.87–93, 2005.

CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JUNIOR, O. Modelos Experimentais de Resistência à Insulina e Obesidade: Lições Aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 50, n. 2, 2006.

CHANG, I. H.; HAN, J. H.; MYUNG, S. C.; KWAK, K. W.; KIM, T. H.; PARK, S. W.; NAK YOUNG CHOI, N. Y.; CHUNG, W. H.; AHN, S. H. Association between metabolic syndrome and chronic kidney disease in the Korean population. *Nephrology*, v.14, n.3, p.321–326, 2009.

CHEN, H. C.; WANG, S. Y.; CHEN, M. J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, v. 25, p. 492-501, 2008.

CHEN, J.; MUNTNER, P.; HAMM, L.L.; *et al.* The metabolic syndrome and chronic kidney disease in U.S. adults. *Annals of Internal Medicine*, v.140, n. 3, p.167–174, 2004.

CHIAPPE DE CINGOLANI, G.E.; CALDIZ, C.I. Insulin resistance and GLUT-4 glucose transporter in adipocytes from hypertensive rats. *Metabolism*, v. 53, p.382-387, 2004.

CHOBANIAN, A.V.; BAKRIS, G.L.; BLACK, H.R.; CUSHMAN, W.C.; GREEN, L.A.; IZZO, J. L. JR.; JONES, D.W.; MATERSON, B.J.; OPARIL, S.; WRIGHT, J.T. JR.; ROCCELLA, E.J. NATIONAL HEART, LUNG, AND BLOOD INSTITUTE JOINT NATIONAL COMMITTEE ON PREVENTION, DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD PRESSURE; NATIONAL HIGH BLOOD PRESSURE EDUCATION PROGRAM COORDINATING COMMITTEE. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *JAMA*, v. 42, p. 2560 –2572, 2003.



COATES, D. Molecules in focus: The Angiotensin converting enzyme (ACE). *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 35, p.769–773, 2003.

CORRY, D.B.; TUCK, M.L. Obesity, hypertension, and sympathetic nervous system activity. *Current Hypertension Reports*, v. 1, p.119-26, 1999.

CUBAS, S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. *Tratado de animais selvagens*. São Paulo: Roca, 2007. 1354p.

DiBONA, G. F.; KOPP, U. C. Neuronal control of renal function. *Physiology Revision*, v. 77, p. 75-197, 1997.

DIETERICH, S.; BIELIGK, U.; BEULICH, K.; HASENFUSS, G.; PRESTLE, J. Gene expression of antioxidante enzymes in the human heart: Increased expression of catalase in the end-stage failing heart. *Circulation*, v. 101, p. 33-39, 2000.

ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P. The metabolic syndrome. *Lancet*, v. 365, p.1415–1428, 2005.

EXECUTIVE SUMMARY OF THE THIRD REPORT OF THE NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP) EXPERT PANEL ON DETECTION, EVALUATION, AND TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN ADULTS (ADULT TREATMENT PANEL III). *JAMA*, v. 285, n. 19, p. 2486-2497, May, 2001.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba: FAO/WHO; 2001

FARNWORTH, E.R. Kefir: from folklore to regulatory approval. *Journal Nutraceut Functional & Medical Food*, v.1, n. 4, p. 57- 68, 1999.

FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O.; MONTEIRO, D.; FARIA, S.; CRUZ, S.; FERREIRA, A.; ROQUE, A. C.; TAVARES, P. Short communication: Effect of kefir grains on proteolysis of major milk proteins. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 27-31, 2010.

FITZ GERALD, R.J.; MURRAY, B.A.; WALSH, D.J. Hypotensive peptides from milk proteins. *Journal of Nutrition*, v. 134, p. S980–S988, 2004.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE-STANLEY, G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497 – 409, 1957.

FOLTZ, M.; MEYNEN, E.E.; BIANCO, V.; VAN PLATERINK, C.; KONING, T. M. M. G.; KLOEK, J. Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides from a lactotriptide-enriched milk beverage are absorbed intact into the circulation. *Journal of Nutrition*, v. 137, p. 953-958, 2007.

FOLTZ, M.; CERSTIAENS, A.; VAN MEENSEL, A.; *et al.* The angiotensin converting enzyme inhibitory tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro show

increasing permeabilities with increasing physiological relevance of absorption models. *Peptides*, v. 29, p.1312-1320, 2008.

FORD, E.S.; GILES, W.H.; MOKDAD, A.H. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among U.S. adults. *Diabetes Care*, v. 27, p. 2444–2449, 2004.

FRANKLIN, S.S. Systolic blood pressure: it's time to take control. *American Journal of Hypertension*, v. 17, p. S49–S54, 2004.

FUKUSHIMA, M.; NAKANO, M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *British Journal of Nutrition*, v.76, n.6, p.857-67, 1996.

GILLILAND, S.E.; NELSON, C.R.; MAXWELL, C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, p.377–381, 1985.

GLUBA, A.; MIKHAILIDIS, D. P.; LIP, G.Y.H.; HANNAM, S.; BANACH, J. R. M. Metabolic syndrome and renal disease. *International Journal of Cardiology*, v. 164, p.141-150, 2013.

GRØNNEVIK, H.; MARIT, M. F.; NARVHUS, J. A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 601- 606, 2011.

GRUNDY, S. M.; CLEEMAN, J. I.; DANIELS, S. R.; DONATO, K. A.; ECKEL, R. H.; FRANKLIN, B. A.; GORDON, D. J.; KRAUSS, R. M.; SAVAGE, P. J.; JÚNIOR, S. C. S.; SPERTUS, J. A.; COSTA, F. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, v. 112, p. 2735–2752, 2005.

GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M. The effect of kefir on the activities of GSH-Px, GST, CAT, GSH and LPO levels in carbon tetrachloride-induced mice tissues. *Journal of Veterinary Medicine*, v.50, n. 8, p.412-416, 2003a.

GÜVEN, A.; GÜVEN, A.; GÜLMEZ, M.; BEYTUT, E.; ERISIR, M.; TARIHI, G. Protective Role of Supplementat Kefir and Yogurt on Increased Lipid Peroxidation Caused by High- Cholesterol Diet. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, v.9, n.1, p.79-83, 2003b.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro, 11.ed., 2006.

GUZEL-SEYDIM, Z.; WYFFELS, J. T.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K. Turkish kefir and kefir grains: microbial enumeration and electron microscobic observation. *International Journal of Dairy Technology*, v. 58, n. 1, p. 25-29, 2005.

- GUZEL-SEYDIM, Z. B.; SEYDIM, A. C.; GREENE, A. K.; TA, T. Determination of antimutagenic properties of acetone extracted fermented milks and changes in their total fatty acid profiles including conjugated linoleic acids. *International Journal of Dairy Technology*, v. 59, n. 3, p. 209-215, 2006.
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z.; ARIAS, I. M.; JAKOBY, W. B. The identity of glutathione S-Transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 71, n. 10, p. 3879-3882, 1974.
- HALL, J.E.; KUO, J.J.; DA SILVA, A.A.; DE PAULA, R.B.; LIU, J.; TALLAM, L. Obesity-associated hypertension and kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v.12, p.195–200, 2003.
- HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practices*, v. 22, p. 475 – 477, 1973.
- HEBERT, S. C.; DESIR, G.; GIEBICH, G.; WANG, W. Molecular diversity and regulation of renal potassium channels. *Physiology Revision*, v. 85, p. 319-371, 2005.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; DEL MAR CONTRERAS, M.; RECIO, I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 165, 23–35, 2011.
- HIRATA, A.E.; ANDRADE, I.S.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M.S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 30, p.671-674, 1997.
- HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, v. 2, p. 231-237, 2009.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos Químicos e Físicos para análise de Alimentos. 4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p., 2005.
- IRIGOYEN, A.; ARANA, I.; CASTIELLA, M.; TORRE, P.; IBÁÑEZ, F.C. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*, v. 90 n. 4, p. 613-620, 2005.
- ISEKI, K. Metabolic syndrome and chronic kidney disease: a Japanese perspective on a worldwide problem. *Journal of Nephrology*, v. 21, p.305–12, 2008.
- JAIN S.; YADAV H.; SINHA P.R. Antioxidant and cholesterol assimilation activities of selected lactobacilli and lactococci cultures. *Journal of Dairy Research*. v.76, n.4, p.385-391, 2009.
- JAKALA, P.; HAKALA, A.; TURPEINEN, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Casein-derived bioactive tripeptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro attenuate the

development of hypertension and improve endothelial function in salt-loaded Goto-Kakizaki rats. *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 4, p.366-374, 2009a.

JAKALA, P.; PERE, E.; LEHTINEN, R.; TURPEINEN, A.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H. Cardiovascular activity of milk casein-derived tripeptides and plant sterols in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 60, n. 4, p. 11-20, 2009b.

JOHNSON, D.W.; ARMSTRONG, K.; CAMPBELL, S.B; et al. Metabolic syndrome in severe chronic kidney disease: prevalence, predictors, prognostic significance and effects of risk factor modification. *Nephrology*, v.12:391–398, 2007.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.89, n.6, p.2548–2556, 2004.

KIM, J.; MONTAGNANI, M.; KON KOH.; K. K.; QUON, M. J. Reciprocal Relationships Between Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Molecular and Pathophysiological Mechanisms. *Circulation*, v. 113, p.1888-1904, 2006.

KOPPLE, J.D.; FEROZE, U. The effect of obesity on chronic kidney disease. *Journal of Renal Nutrition*, v. 21, p.66–71, 2011.

KORHONEN, H.; PIHLANTO, A. Food-derived bioactive peptides opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, n. 16, p. 1297-1308, 2003.

KORHONEN, P.; AARNIO, P.; VESALAINEN, R.; SAARESRANTA, T.; KAUTIAINEN, H.; JÄRVENPÄÄ, S.; et al. Hypertensive women with the metabolic syndrome are at risk of renal insufficiency more than men in general population. *Journal of Human Hypertension*, v. 23, n. 2, p.197-104, 2009.

KORNER, P.; BOBIK, A.; ODDIE, C.; FRIBERG, P. Sympathoadrenal system is critical for structural changes in genetic hypertension. *Hypertension*, v. 22, n. 2, p. 243-252, 1993.

LEE, K.; JANG, S.; BAEK, E.H., KIM, M.J., LEE K.S.; SHIN, H.S.; CHUNG, M.J.; KIM, J.E.; LEE, K.O.; HA, N.J. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. *Lipids Health and Disease*, v.8, p.8-21, 2009.

LeBLANC, J.G.; DE GIORI, G.S.; SMID, E.J.; HUGENHOLTZ, J.; SESMA, F. Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, v.1, p. 329-339, 2007.

LOCATELLI, F.; POZZONI, P.; DEL VECCHIO, L. Renal manifestations in the metabolic syndrome. *Journal of the American Society Nephrology*, v.17, p.81–85, 2006.

LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: A symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana Micologica*, v. 23, p. 67-74, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. R. Brazilian Kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v. 26, p.1241–1250, 2010.

MARTIN, M.; WELLNER, A.; OSSOWSKI, I.; et al. Identification and quantification of inhibitors for angiotensin-converting enzyme in hypoallergenic infant milk formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, p. 6333–6338, 2008.

MCCARRON, D.A.; MORRIS, C.D.; HENRY, H.J.; STANTON, J.L. Blood pressure and nutrient intake in the United States. *Science*, v. 224, p. 1392-1398, 1984.

MEURMAN, J.H.; STAMATOVA, I. Probiotics-contributions to oral health. *Oral Diseases*, v. 13, n. 5, p. 443-445, 2007.

MOGENSEN, C. E. Microalbuminuria, renal disease, metabolic syndrome and risks in diabetes. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 1, p. 127-133, 2007.

MUSCETTOLA, M.; MASSAI, L.; TANGANELLI, C.; GRASSO, G. Effects of lactobacilli on interferon production in young and aged mice. *Annals of the New York Academy Sciences*, v. 717, p. 226–32, 1994.

NAGIRA, T.; NARISAWA, J.; TERUYA, K.; KUSUMOTO, K.; KATAKURA, Y.; W.BARNES, T.; TOKUMARU, S.; SHIRAHATA, S. Suppression of Apoptosis in UV-Damaged Human Melanoma Cells by a Fermented Milk, Kefir. In: Bernard et al. (eds.) *Animal Cell Technology: Products from Cells, Cells as products*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999, p.437-439.

NAKAMURA, Y.; YAMAMOTO, N.; SAKAI, K.; TAKANO T. Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *Journal of Dairy Science*, p.1278:1253, 1995.

ORTIZ, G.G.; BITZER-QUINTERO, O.K.; B, ZÁRATE C. B.; S. RODRÍGUEZ-REYNOSO, S.; LARIOS-ARCEO, F.; VELÁZQUEZ-BRIZUELA, I.E.; PACHECO-MOISÉS, F.; ROSALES-CORRAL, S.A. Monosodium glutamate-induced damage in liver and kidney: a morphological and biochemical approach. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 60, n. 2, p. 86–91, 2006.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.

OYETAYO, V.O.; OYETAYO, F.L. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2, p.123-127, 2005.

PALANIAPPAN, L.; CARNETHON, M.; FORTMANN, S.P. Association between microalbuminuria and the metabolic syndrome: NHANES III. *American Journal of Hypertension*, v. 16, p. 952–958, 2003.

PAPADIMITRIOU, C. G.; VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A.; SILVA, S. V.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; ALICHANIDIS, E. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chemistry*, v.105 p. 647–656, 2007.

PINTO, Y.M.; GANTEN, D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Research*. v. 39, n. 1, p. 77-88, 1998.

PLESSAS, S.; ALEXOPOULOS, A.; VOIDAROU, C.; STAVROPOULOU, E; BEZIRTZOGLU, E. Microbial ecology and quality assurance in food fermentation systems. The case of kefir grains application. *Anaerobe*, v. 17, p. 483-485, 2011.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*, v.88, p.1243–76, 2008.

PRAVENEK, M.; ZIDEK, V.; LANDA, V.; SIMAKOVA, M.; MLEJNEK, P.; KAZDOVA, L.; BÍLÁ, V.; KŘENOVA, D.; KŘEN, V. Genetic analysis of “metabolic syndrome” in the spontaneously hypertensive rat. *Physiological Research*, v. 53, n. 1, p.15-22, 2004.

QI, N.; KAZDOVA, L.; ZIDEK, V.; LANDA, V.; KREN, V.; PERSHADSINGH, H.A.; ELIZABETH, S. T.; LEZIN, E. S; NADA, A.; ABUMRAD, N. A; PRAVENEK, M.; KURTZA, T. W. Pharmacogenetic evidence that cd36 is a key determinant of the metabolic effects of pioglitazone. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p.48501-48507, 2002.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1998. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, v. 37, n.12, p. 1595 – 607, 1988.

REAVEN, G. M. The fourth musketeer – from Alexandre Dumas to Claude Bernanrd. *Diabetologia*, v. 38, n. 1, p. 3-13, 1995.

RICCI-CABELLO, I.; HERRERA, M. O.; ARTACHO, R. Possible role of milk-derived bioactive peptides in the treatment and prevention of metabolic syndrome. *Nutrition Reviews*, v. 70, n. 4, p. 241–255, 2012.

ROBERT, P.R.; ZALOGA, G.P. Dietary bioactive peptides. *New Horizons*, v.2, p: 237-243, 1994.

RUOTOLO, G.; HOWARD, B.V. Dyslipidemia of the metabolic syndrome. *Current Cardiology Reports*, v. 4, n. 6, p. 494–500, 2002.

SCHEEN, A.J. Prevention of type 2 diabetes mellitus through inhibition of the renin-angiotensin system. *Drugs*, v. 64, n. 22, p.2537–2565, 2004.

SCHOEVEERS, A.; BRITZ, T. J. Influence of different culturing conditions on kefir grain increase. *International Journal of Dairy Technology*, v. 56, p.183–187, 2003.

SEPPO, L.; JAUHAINEN, T.; POUSSA, T.; KORPELA, R. A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 77, p.326-330, 2003.

SHAHIDI, A.; ZHONG B. Bioactive peptides. *Journal of Aoac International*, v. 91, p. 914-931, 2008.

SIMMONS, D.; THOMPSON, C.F. Prevalence of the metabolic syndrome among adult New Zealanders of Polynesian and European descent. *Diabetes Care*, v. 27, n. 12, p.3002–3004. 2004.

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

SINGH, K.; KALLALI, B.; AJAY KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, p. 287-290, 2011.

SIPOLA, M.; FINCKENBERG, P.; KORPELA, R.; VAPAATALO, H.; NURMINEN ML. Effect of long-term intake of milk products on blood pressure in hypertensive rats. *Journal of Dairy Research*, v. 69, p. 103-111, 2002.

SIRDAH, M. M.; ABU GHALI, A. S. A.; AL LAHAM, N. A. The reliability of the National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP/ATP III) and the International Diabetes Federation (IDF) definitions in diagnosing metabolic syndrome (MetS) among Gaza Strip Palestinians. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, v. 6, p. 4–8, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIPERTENSÃO; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA; SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 4, n. 1, p.3-28. 2005.

STANTON, C.; ROSS, R, P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 16, p.198–203, 2005.

St-ONGE, M-P.; FARNWORTH, E. R.; SAVARD, T.; CHABOT, D.; AKIER MAFU, A.; JONES, P. J. H. Kefir consumption does not alter plasma lipid levels or cholesterol fractional synthesis rates relative to milk in hyperlipidemic men: a randomized controlled trial. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2002. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/2/1>

SWISLOCK, A.; TSUZUKI, A. Insulin resistance and hypertension: glucose intolerance, hyperinsulinemia, and elevated free fatty acids in the Spontaneously Hypertensive Rat. *The American Journal of Medicine Science*, v. 306, p. 282-286, 1993.

TAKAHASHI, T.; OKA, T.; IWANA, H.; KUWATA, T.; YAMAMOTO Y. Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, v.57, p.1557–1560, 1993.

TAKANO, T. Anti-hypertensive activity of fermented dairy products containing biogenic peptides. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v. 82, n. 333-340, 2002.

TOMASZEWSKI, M.; CHARCHAR, F.J.; MARIC, C.; MCCLURE, J.; CRAWFORD, L.; GRZESZCZAK, W.; SATTAR, N.; ZUKOWSKA-SZCZECHOWSKA, E.; DOMINICZAK, A.F. Glomerular hyperfiltration: a new marker of metabolic risk. *Kidney International.*, v. 71, p.816–821, 2007.

ULLOA, M.; LAPPE, P.; TABOADA, J.; DIAS-GARCÉS, J. Mycobiota of the Tibi grains used to ferment Pulque in México. *Revista Mexicana de Micología*, México, v. 10, n. 8, p. 153-159, 1994.

VALE, S. R.; GLÓRIA, M. B. A. Biogenic amines in Brazilian cheeses. *Food Chemistry*, v. 63, n. 3, p. 342-348, 1997.

VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J.; VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *British Journal of Nutrition*, v. 92, p.357-366, 2004.

WASSMANN, S.; WASSMANN, K.; NICKENIG, G. Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells. *Hypertension*, p. 44, p. 381- 386, 2004.

WANG, S-Y.; CHEN, K-N.; LO, Y-M.; CHIANG, M-L.; CHEN, H-C.; LIU, J-R.; MING-JU, C. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*, v. 32, p. 274-285, 2012.

WANG, Y.; XU, N.; XI, A.; AHMED, Z.; BIN, Z.; BAI, X. Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v.84, n.2, p.341- 347, 2009.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. 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.

XIAO, J.Z.; KONDO, S.; TAKAHASHI, N.; MIYAJI, K.; OSHIDA, K.; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K.; KOKUBO, S.; HOSONO, A. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *Journal of Dairy Science*, v.86, p.2452–2461, 2003.



YAMAMOTO, N.; EJIRI, M; MIZUNO, S. Biogenic peptides and their potential use. *Current Pharmaceutical Design*, v. 9, p.1345-1355, 2003.

YAMAZAKI, R. K.; GLEISSON AP BRITO, G. AP.; COELHO, I.; PEQUITTO, D. CT.; YAMAGUCHI, BORGHETTI, G.; SCHIESSEL, D. L.; KRYCZYK, M.; MACHADO, J.; ROCHA, R. ER.; AIKAWA, J.; IAGHER, F.; NALIWAIKO, K.; TANHOFFER, R. A.; NUNES, E. A.; FERNANDES, L. C. Low fish oil intake improves insulin sensitivity, lipid profile and muscle metabolism on insulin resistant MSG-obese rats. *Lipids in Health and Disease*, v.10, n. 66, p. 2-7, 2011.