

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL/MG

KAMILA LEITE RODRIGUES

**PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIULCEROGÊNICA DE UMA  
CERVEJA FERMENTADA UNICAMENTE POR GRÃOS DE QUEFIR**

**ALFENAS – MG**

**2016**

KAMILA LEITE RODRIGUES

**PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIULCEROGÊNICA DE UMA  
CERVEJA FERMENTADA UNICAMENTE POR GRÃOS DE QUEFIR**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas junto ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Rodrigues

**ALFENAS/MG**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Rodrigues, Kamila Leite.

Propriedades anti-inflamatória e antiulcerogênica de uma  
cerveja fermentada unicamente por grãos de quefir. / Kamila Leite  
Rodrigues. -- Alfenas/MG, 2016.  
96 f.

Orientadora: Maria Rita Rodrigues.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade  
Federal de Alfenas, 2016.  
Bibliografia.

1. Cerveja. 2. Probióticos. 3. Anti-Inflamatório. 4. Antiulcerosos.  
I. Rodrigues, Maria Rita. II. Título.

CDD-615.32

KAMILA LEITE RODRIGUES

PROPRIEDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIULCEROGÊNICA DE UMA  
CERVEJA FERMENTADA UNICAMENTE POR GRÃOS DE QUEFIR

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas junto ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alenas. Área de concentração: Ciências Fisiológicas

Aprovada em: 22/02/2016

Prof. *Mauri Rita Rodrigues*  
Instituição: *UNIFAC-MG*

Assinatura: *[assinatura]*

Prof. *Unid/UB*  
Instituição: *Unid/UB*

Assinatura: *[assinatura]*

Prof. *Elizabeth A. Costes*  
Instituição: *UFVJM*

Assinatura: *[assinatura]*

Prof. *Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira*  
Instituição: *UFMG*

Assinatura: *[assinatura]*

Prof. *Cristiane da Silva Marciano Gaselli*  
Instituição: *Unifal-MG*

Assinatura: *[assinatura]*

Dedico ao meu esposo, meus filhos e a  
meus pais pelo apoio na realização desse  
trabalho

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu marido, José Maurício. Sem você não teria iniciado esse novo doutorado. Por tudo que passamos, tudo que enfrentamos e por tudo que vencemos...muito obrigada. É por isso que esse trabalho chegou até aqui. Obrigada pelo seu tempo, sua dedicação, sua paciência, seu amor e por me fortalecer.

Aos meus filhos José Pedro, Francisco e Joaquim, pelo amor, pelas bagunças, pela força e por toda alegria.

Aos meus pais Gerson e Maria Leonor, por estarem sempre ao meu lado, por me apoiarem em todos os momentos, e à minha irmã Marina, por me desejar o bem. Obrigada.

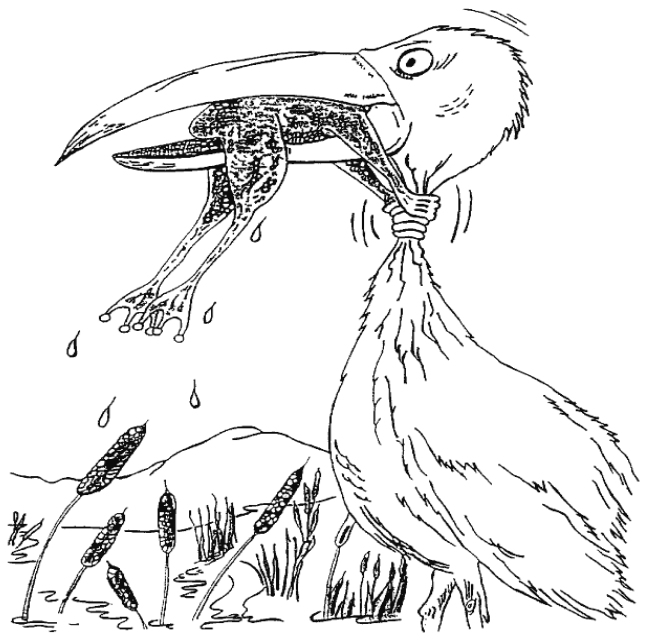
A Profa. Dra Maria Rita Rodrigues, muito obrigada por confiar em mim, por estender a mão e me orientar no momento mais desafiador, um doutorado sem o tempo a nosso favor. Obrigada pelos ensinamentos, por orientar com dedicação, alegria e determinação. Sua orientação foi fundamental para que pudesse recomeçar.

Ao Prof. Dr. Tomaz Henrique Araújo por gentilmente fazer parte desse trabalho, com a dedicação de um co-orientador. Por dispor seu tempo em me ajudar na execução dos experimentos e acompanhar essa rápida jornada, muito obrigada.

A Doutoranda Cláudia Ferreira, pela ajuda com os experimentos no laboratório, sempre com disposição, muito obrigada. A mestranda Thayra, obrigada pelas tentativas experimentais que realizamos a partir das 4 da manhã. Ao Gabriel Moraes por fazer parte desse trabalho colaborando com a técnica de HPLC. A Prof. Dra. Rita Sinigaglia Coimbra e ao técnico André Aguilera, da UNIFESP, pela colaboração com a técnica de microscopia eletrônica de varredura. A técnica Eliana, obrigada pela ajuda nos experimentos com os animais, pela agilidade e praticidade.

Aos funcionários do biotério, por dividirem comigo o espaço necessário à realização dos experimentos, muito obrigada.

Aos ratos que fizeram parte dessa trajetória e que, de alguma forma, contribuíram para esse trabalho, e me ajudaram a ser melhor e mais forte, obrigada.



***Autor desconhecido***

## RESUMO

O quefir e a cerveja são conhecidos por apresentar propriedades benéficas à saúde. Assim, foram avaliadas as atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas de uma cerveja produzida por grãos de quefir, frente aos desafios de edema de pata e modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. Os grãos de quefir foram adaptados por 12 dias em extrato de malte para a produção da cerveja. O teor de polifenóis apresentado nas cervejas foi avaliado por HPLC. O perfil metabólico dos animais tratados por 30 dias com as cervejas foi determinado através das dosagens de colesterol total, HDL-colesterol, triacilglicerol, ALT, AST, catalase e glutathione peroxidase. Os resultados revelaram níveis semelhantes de cerveja polifenóis e marcadores séricos entre todos os animais tratados, mas uma diminuição significativa sobre as respostas inflamatórias  $41,1 \pm 5,1$  na primeira hora e  $47,5 \pm 2,9\%$  na terceira hora e ulcerogênicas no grupo tratado com cerveja de quefir  $14,5 \pm 1,2\%$  ( $P < 0,05$ ), bem como com as cervejas modificadas com o quefirano de água. Microscopia eletrônica de varredura mostrou uma camada de revestimento sobre o estômago de animais tratados apenas com as amostras a base de quefir. Estes resultados sugerem propriedades funcionais de uma “Specialty Beer” feita com grãos de quefir como único fermentador.

Palavras-chaves: quefir. Cerveja. Probióticos. anti-inflamatório. Antiulcerogênico. quefirano de água.

## ABSTRACT

As kefir and beer are known to exhibit some beneficial health properties, anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a beer made with kefir were assessed using rat paw edema and ethanol-induced gastric ulcer model, respectively. The polyphenol content presented in the beers was evaluated by HPLC, whereas serum cholesterol, triacylglycerol, HDL-cholesterol, ALT, AST, catalase and glutathione peroxidase of treated animals were determined by molecular absorption. The results revealed similar levels of beer polyphenols and serum markers among all treated animals, but marked decreases in inflammatory  $41,1 \pm 5,1$  and  $47,5 \pm 2,9\%$ , first and third hour respectively and ulcerogenic responses in the group treated with kefir beer  $14,5 \pm 1,2\%$  ( $P < 0,05$ ) and with a control beer modified with aqueous kefiran. Scanning electron microscopy showed a coating layer on the stomach of animals treated only with kefir-based samples. These results suggest a functionality of a specialty beer made with kefir as single fermenter.

**Keywords:** kefir. Beer. probiotic beer. anti-inflammatory. Antiulcerogenic. aqueous kefiran.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Fluxograma de produção das cervejas de quefir e controle	16
Figura 2-	Curva de crescimento de grãos de quefir	27
Figura 3-	Cromatograma de eluição de amostra de cerveja de quefir de 30 dias	29
Figura 4-	Comparação dos pesos dos animais tratados por 30 dias	30
Figura 5-	Úlceras gástricas induzidas por administração de etanol absoluto em ratos previamente tratados	31
Figura 6-	Percentual de áreas de lesões ulcerativas nos estômagos dos animais tratados previamente com etanol absoluto	32
Figura 7-	Medida das patas (mm) dos animais tratados oralmente por 7 dias	33
Figura 8-	Comparação da redução do edema de pata induzido por carragenina entre os animais tratados com a cerveja de quefir com 30 e 120 dias após o envase	34
Figura 9-	Medida das patas (mm) dos animais tratados oralmente por 7 dias	35
Figura 10-	Microscopia eletrônica de varredura dos estômagos dos animais tratados	37
Figura 11-	Detalhes de imagens de microscopia eletrônica de varredura dos estômagos dos animais tratados	38
Figura 12-	Medida das patas (mm) dos animais tratados com as amostras controle e as cervejas modificadas com quefirano	39
Figura 13-	Percentual de áreas de lesões ulcerativas nos estômagos dos animais tratados com etanol absoluto e, previamente via tratados via i.p. com indometacina	40
Figura 14-	Animais tratados com a cerveja controle modificada com 10 mg/mL de quefirano, sem o tratamento prévio com indometacina	41

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	14
<b>2.1</b>	<b>Breve histórico</b>	14
<b>2.2</b>	<b>Constituintes da cerveja</b>	16
<b>2.3</b>	<b>Propriedades farmacológicas da cerveja</b>	18
<b>2.4</b>	<b>Quefir e propriedades farmacológicas</b>	21
<b>2.5</b>	<b>Quefir e bebidas probióticas</b>	23
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	25
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>4.1</b>	<b>Objetivos Principais</b>	26
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	26
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	27
<b>5.1</b>	<b>Produção da cerveja controle e cerveja de quefir</b>	27
5.1.1	Adaptação do quefir	27
5.1.2	Elaboração da cerveja de quefir	27
5.1.3	Moagem dos maltes	28
5.1.4	Mosturação	29
5.1.5	Fervura	29
5.1.6	Whirpol e Resfriamento	29
5.1.7	Aeração, fermentação e resfriamento	30
5.1.8	Envase e refermentação na garrafa	31
<b>5.2</b>	<b>Análise da composição da cerveja de quefir</b>	31
5.2.1	Propriedades físico-químicas	31
5.2.2	Caracterização de polifenóis por cromatografia líquida de alta eficiência	32
<b>5.3</b>	<b>Animais</b>	33
<b>5.4</b>	<b>Atividade antiulcerogênica</b>	34
<b>5.5</b>	<b>Atividade anti-inflamatória por medida do edema de pata induzido por carragenina ou Histamina em ratos</b>	34
<b>5.6</b>	<b>Atividade das enzimas antioxidantes</b>	35
5.6.1	Catalase	35
5.6.2	Glutathione Peroxidase	35
<b>5.7</b>	<b>Enzimas hepáticas e perfil lipídico</b>	36
<b>5.8</b>	<b>Avaliação do tecido epitelial dos estômagos dos animais submetidos à úlcera induzida por etanol absoluto</b>	36
<b>5.9</b>	<b>Compostos bioativos na cerveja de quefir</b>	37
<b>6</b>	<b>Análise de dados</b>	37
<b>7</b>	<b>Laboratórios utilizados</b>	38
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b>	39
<b>8.1</b>	<b>Crescimento e adaptação dos grãos de quefir</b>	39
<b>8.2</b>	<b>Características físico-químicas e perfil de polifenóis</b>	40
<b>8.3</b>	<b>Peso corporal dos animais</b>	41
<b>8.4</b>	<b>Atividade antiulcerogênica da cerveja de quefir</b>	42
<b>8.5</b>	<b>Edema de pata induzido por carragenina e histamina</b>	44

<b>8.6</b>	<b>Atividade das enzimas antioxidantes, hepáticas e perfil lipídico dos animais tratados por 30 dias</b>	<b>47</b>
<b>8.7</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura</b>	<b>48</b>
<b>8.8</b>	<b>Compostos bioativos na cerveja de quefir</b>	<b>50</b>
<b>8.9</b>	<b>Conteúdo gástrico de polissacarídios</b>	<b>53</b>
<b>9</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>62</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>64</b>
	<b>APÊNDICE</b>	<b>77</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>88</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida mundialmente apreciada que apresenta propriedades benéficas à saúde conhecidas a mais de 10.000 anos. A cultura de beber cerveja determinou muitas descobertas de combinações de plantas, especiarias e frutas com incremento das funções sensoriais e de bem estar. Os ingredientes da cerveja apresentam individualmente propriedades desejadas em bebidas funcionais, além de conter um alto valor nutritivo. Assim, a cerveja tem ganhado *status* atualmente como alimento benéfico à saúde por apresentar diferentes atividades sobre o organismo, contribuindo para a melhora da qualidade de vida.

São hoje conhecidas funções antioxidantes da cerveja, despertando grande interesse científico e industrial para agregar novas propriedades e benefícios ao produto.

O quefir, uma bebida fermentada por diferentes bactérias e leveduras que vivem em simbiose envoltas por uma matriz de polissacarídeo, apresenta reconhecidas funções fisiológicas e farmacológicas. Seus efeitos benéficos estão associados a um consumo regular, e esses podem ser exercidos por microrganismos presentes nos grãos e no líquido, bem como por seus compostos bioativos. Essa grande diversidade microbiológica, compreendendo cepas capazes de promover ações regulatórias no organismo, juntamente com substâncias produzidas pelo quefir e que apresentam ações fisiológicas, instiga a diferentes pesquisas pela procura de novas tecnologias e formulações de bebidas que acrescentem à ela efeitos benéficos.

Nesse sentido, a associação da cerveja, uma bebida historicamente apreciada e reconhecida por seus efeitos na saúde, com o quefir, um alimento funcional de alto valor biológico desde sua complexa simbiose até seus efeitos regulatórios sobre o organismo, poderia compreender uma bebida com características probióticas combinadas. Assim, buscamos a elaboração de uma cerveja fermentada a partir da associação simbiótica de grãos de quefir, e a validação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antiulcerogênica em animais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O referencial teórico abordará os tópicos relacionados aos aspectos históricos e fisiológicos da cerveja e do quefir.

### 2.1 Breve histórico

Passado o período de desmame, o ser humano tem a água como uma bebida natural que, após experimentações com diferentes alimentos na sua forma líquida, permite a substituição da sensação de sede pelo gosto. O resultado dessa complexa sensação foi satisfeito por muitas descobertas que trouxeram à algumas bebidas propriedades de alimentos e medicamentos (HORNSEY, 2003).

Na história da cerveja, produzir e beber cerveja são atividades que fizeram parte da experiência humana desde quando a civilização deixou de ser nômade e iniciou suas atividades agrícolas (HORNSEY, 2003). Acredita-se que a sensação gustativa de bebidas fermentadas em eras remotas tenha sido similar a alguns efeitos da ingestão de certas espécies de fungos e associações com potencial alucinógeno, mais familiar nos tempos mesolíticos (MCKENNA, 1992)

Hoje é considerada como cerveja a maioria das bebidas produzidas com cereais nos últimos 8.000 anos. Os sumérios e egípcios produziam essa bebida há mais de 5.000 anos e os babilônios já fabricavam mais de dezesseis tipos de cervejas de cevada, trigo e mel há mais de 6.000 anos (COUTINHO, 2008)

Em Tebas, no Egito, foi encontrado o mais antigo registro sobre uma cervejaria do ano de 3.400 a.C, onde eram fabricados dois tipos da bebida: a “cerveja dos notáveis” e a “cerveja de Tebas” (MORADO, 2009). A cerveja já constava no mais antigo código de leis conhecido, chamado de “Hamurábi” na Babilônia, texto que se ocupava da saúde das pessoas e da venda da cerveja (COUTINHO, 2008; HLATKY, 2007).

Por meio dos relatos do médico romano Hipócrates (460 a 377 a.C), foi identificado que os romanos conheciam a ação medicamentosa da cerveja, mesmo que a preferência deles fosse o vinho. Os gregos e os romanos aprenderam a fazer cerveja com os egípcios e a bebida tornou-se bastante popular (HLATKY, 2007). No

período medieval, além de uma necessidade nutricional, a cerveja era usada como remédio, por meio de misturas com cascas, raízes, e especiarias, como tomilho, pimenta e ervas em geral (KLING, 2006).

A partir do início da Idade Média, os mosteiros assumiram a fabricação da bebida, que adquiriu o seu sabor característico pelas mãos de monges. Eles aproveitavam as dependências da igreja para cultivar matéria-prima, enquanto criavam utensílios adequados para o processo cervejeiro. Por saberem escrever, registravam o que aprendiam com a produção e aprimoravam a bebida. Assim, os religiosos se tornaram, de fato, os primeiros pesquisadores sobre a cerveja, tendo aprimorado seu método de fabricação e introduzido a ideia de conservação a frio da bebida (HLATKY, 2007).

O lúpulo passou a ser usado popularmente como fator de amargor. No período da quaresma, os padres alimentavam-se, exclusivamente, de cerveja (MORADO, 2009). O mais antigo código referente à produção de alimentos é a germânica Lei da Pureza (“Reinheitsgebot”), que institui que a cerveja deve ser produzida somente com água, malte, lúpulo e fermento. Essa lei foi instituída pelo Duque Guilherme IV da Baviera, no ano de 1516 (DE PAULA SANTOS, 2003).

Apesar da cerveja ser conhecida na América antes de Colombo, pois esse teria recebido dos índios locais uma espécie de cerveja de milho, os ingleses foram os que mais influenciaram comercial e culturalmente as colônias portuguesas, sendo a maior produtora de cervejas da Europa, e com domínio do mercado brasileiro até os anos 1870 (DE PAULA SANTOS, 2003).

A cerveja chegou ao Brasil, provavelmente, no século XVII com a colonização Holandesa (1634-1654), pela Companhia das Índias Ocidentais, de forma contrabandeada, pois os portos brasileiros eram fechados aos estrangeiros. Por volta de 1654, a cerveja deixou o país por um século e meio, quando da saída dos holandeses, reaparecendo no final do século XVIII. Os portos brasileiros foram abertos quando da chegada da família real portuguesa em 1808 (DE PAULA SANTOS, 2003).

No final do século XIX, imigrantes alemães, no Rio Grande do Sul, apresentaram conhecimento para produção de cerveja e, em 1836, foi reportado pelo Jornal do Comércio do Rio de Janeiro, o primeiro anúncio no qual se oferecia a cerveja brasileira (DE PAULA SANTOS, 2003).

## 2.2 Constituintes da cerveja

A cerveja pode ser definida como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação do malte de cevada por leveduras, contendo lúpulo e água de boa qualidade, podendo ainda utilizar-se de outras matérias-primas, como arroz, trigo ou milho (BENTO *et al.*, 2006). Em geral o teor alcoólico é de 3% a 8% e sua composição engloba compostos como proteínas, aminoácidos, carboidratos (glicose, maltose, dextrinas), diversos minerais (cálcio, fósforo, enxofre) álcool, anidrido carbônico e grande parte das vitaminas do complexo B (AQUARONE *et al.*, 1983).

Os ingredientes da cerveja conferem a essa bebida um *status* de alimento benéfico à saúde, desde que consumida moderadamente. A família em que a cevada está inserida é a das gramíneas e seu gênero *Hordeum* possui mais de 32 espécies, além das híbridas ou transgênicas (BRODERIC *et al.*, 1977).

O malte é obtido por meio da germinação de um determinado cereal, sendo a cevada a mais apropriada para esse processo, pois propicia sabor superior a outros cereais. O processo de malteação da cevada, matéria-prima mais utilizada na produção da cerveja, faz-se necessário para a ativação de enzimas que irão proporcionar a extração dos açúcares durante sua cocção. Durante o processo de malteação o grão é submetido a germinação parcial e posterior desidratação e/ou tostagem, em condições tecnológicas adequadas. Qualquer outro cereal submetido a um processo de malteação deve denominar-se malte, seguido do nome do cereal (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013).

Outro ingrediente importante é a água que representa aproximadamente 90% da cerveja e exerce grande influência sobre a qualidade da bebida, devendo ser apta para o consumo humano (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2013; TSOCHPE, 2001).

A composição química da água influencia na qualidade da cerveja. O pH da água aceitável para cervejaria se encontra entre 6,0 a 6,5 e o pH ótimo para mostura, processo de ativação das enzimas do malte, se encontra no faixa de 5,4 a 5,6, quando as enzimas da cevada malteada apresentam bom rendimento (TROMMER, 2011). As características minerais da água ou “terroir” são específicas para cada região, sendo que tais particularidades determinaram estilos diferentes de cerveja. Porém, com o avanço tecnológico, principalmente na área da química, os

cervejeiros podem produzir o equilíbrio de minerais necessário na bebida devido ao ajuste pré-estabelecido na água. Dessa forma, a qualidade da cerveja elaborada não depende da casualidade, mas principalmente das características da água provenientes de onde a cervejaria está localizada (JACKSON, 2007).

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma trepadeira de aproximadamente 5 a 7 metros de altura, e está inserido na família das moráceas, a qual é conhecida como *Cannabaceae*. Para a produção de cerveja, o lúpulo empregado é proveniente de flores femininas não fecundadas (VENTURINI, 2010).

Os alfa-ácidos ou humulonas são as resinas características do lúpulo que compõem o sabor amargo. Quando o mosto, líquido resultante do processo de mosturação, é fervido, esses compostos são isomerizados formando as iso-humulonas, que são mais solúveis em comparação aos alfa-ácidos (VENTURINI, 2010). Além disso, o lúpulo auxilia na coagulação das proteínas de alto peso molecular, presentes no mosto, o que beneficia a estabilidade da cerveja (JAY, 2005).

O ingrediente biologicamente ativo, a levedura, é um fungo que se reproduz assexuadamente por brotamento ou por fissão, podendo originar de cada célula, em média 20 outras. Apresenta-se, geralmente, de forma unicelular, estando distribuído em 39 gêneros e cerca de 350 espécies. O seu formato é meio arredondado, possuindo um tamanho de 5 a 8  $\mu\text{m}$  de largura e 6 a 10  $\mu\text{m}$  de comprimento (BAMFORTH, 2003; BAMFORTH, 2005).

Durante a fermentação, a levedura consome os aminoácidos e os açúcares do mosto, sendo esses metabolizados em condições anaeróbias em dióxido de carbono e etanol (BAXTER, 2001). Para essa transformação dos açúcares disponíveis no mosto, em produtos que determinam o sabor e aroma, como o álcool e o gás carbônico, as leveduras utilizadas são as do gênero *Saccharomyces*. As cepas responsáveis por esse processo são *S. uvarum* ou *S. carlsbergensis* e *S. cerevisiae*, e que são utilizadas nas duas grandes famílias de cerveja, referenciadas por diferentes tipos de fermentação (JAY, 2005).

A baixa fermentação é feita pela *S. uvarum* na temperatura de 7 a 15°C durante 7 a 10 dias, a qual se sedimenta no fundo do tanque após a fermentação, produzindo cerveja do tipo “Lager”. A cerveja tipo “Ale” é obtida pela alta fermentação com a cepa *S. cerevisiae*, que flocula na superfície do tanque durante a fermentação entre 18 e 22°C por um período de 3 a 5 dias (HARDWICK, 1995).

### 2.3 Propriedades farmacológicas da cerveja

A cerveja é considerada fonte de folatos e outras vitaminas do complexo B, como niacina, piridoxina e cianocobalamina, além de ser citada como importante fonte de selênio e possuir efeito diurético, devido a alta relação potássio/sódio. A bebida também é considerada uma fonte de polifenóis, sendo 20 a 30% desses originados do lúpulo e, 70 a 80% derivados do malte (KEUKELEIRE, 2000; KNORR, 1978; LUGASI, 2003). A cevada e seus derivados como o malte possuem altas concentrações de fenóis como ácido benzóico e cinâmico, proantocianinas, taninos, flavonóides, chalconas, flavonas, flavanonas, exemplos de compostos amino fenólicos associados a atividades antioxidantes (GOUPY, *et al.*, 1999; HERNANZ, *et al.*, 2001; LIU; YAO, 2007; QINGMING *et al.*, 2010). Os polifenóis da cevada, as proantocianidinas, mudam durante os processos de malteação e produção do mosto, e são menos caracterizados que os compostos fenólicos do lúpulo (FRIEDRICH *et al.*, 2000; MADIGAN *et al.*, 1994; MCMURROUGH; BAERT, 1994).

Os níveis de polifenóis na cerveja são dependentes dos processos de malteação, tendo esse um considerável impacto na concentração de fenóis e na atividade antioxidante da cerveja, as quais são seguidas pelas reações sofridas pelos polifenóis na bebida (LEITÃO *et al.*, 2012). Durante o processo de mosturação a concentração inicial dos fenóis é reduzida a 50%, sendo a maior redução em taninos e flavonóides. A concentração de procianidinas, epicatequinas e ácido ferúlico é significativamente maior na cerveja quando comparada ao vinho branco, conferindo a essa maior capacidade antioxidante (GORINSTEIN *et al.*, 2000).

O lúpulo é uma erva com propriedades medicinais, usado como antibiótico e anti-inflamatório. O estudo das propriedades de alguns compostos presentes no lúpulo revelou efeitos bioativos em grande parte de seus metabólitos (KONDO, 2003). O lúpulo contém as isohumulonas, componente que confere amargor, sabor e aroma, além de preservar a cerveja por mais tempo (LUDWIG, 2004). As isohumulonas do lúpulo têm efeitos benéficos sobre a hiperglicemia, hipercolesterolemia e hipertensão (MIURA *et al.*, 2005; SHIMURA *et al.*, 2005; YAJIMA *et al.*, 2004). Ambos os conteúdos de álcool e antioxidantes presentes na cerveja são responsáveis por vários benefícios à saúde, desde que consumidos moderadamente (AMITAVA, 2014).

O consumo moderado de cervejas está associado a um menor risco de doenças cardiovasculares (KARATZI *et al.*, 2013). Muitos estudos sugerem um baixo

risco de doenças coronarianas em adultos que consomem de um a dois copos de bebidas alcoólicas ao dia (BRIEN *et al.*, 2011; COSTANZO *et al.*, 2011; RONKSLEY *et al.*, 2011).

O consumo de etanol parece relacionar-se a um aumento na concentração de HDL colesterol no plasma, bem como de apolipoproteína A-I e A-II (BRIEN *et al.*, 2011; ROMEO *et al.*, 2008). Em contrapartida, o consumo de cerveja sem álcool com polifenóis parece não afetar a secreção de HDL colesterol (COSTANZO *et al.*, 2011).

Em outro trabalho, contudo, a pressão sistólica, o teor de homocisteína e vários marcadores inflamatórios diminuiu apenas após o consumo de cerveja sem álcool, sendo esses efeitos, possivelmente, atribuídos aos polifenóis, a fração não alcoólica da cerveja (CHIVA-BLANCH *et al.*, 2015).

Os efeitos pós-prandiais da cerveja, cerveja sem álcool e vodka, sobre a função endotelial, rigidez aórtica e a flutuação da pressão arterial foram analisados a fim de testar os constituintes da cerveja, álcool e antioxidantes (KARATZI *et al.*, 2013).

Foram observados efeitos benéficos para todos os marcadores arteriais com todas as bebidas testadas. Entretanto, a cerveja apresentou melhor ação sobre a função endotelial e a pressão arterial que a cerveja sem álcool. Assim, os autores sugerem que um consumo regular poderia trazer efeitos cardiovasculares benéficos que são mediados pelo efeito sinérgico do álcool com os antioxidantes, sendo um plausível mecanismo mediado pela vasodilatação e melhora da função endotelial observados (KARATZI *et al.*, 2013). Este efeito rápido combinado, do álcool com os antioxidantes, na cerveja, poderia ser apoiado pelos efeitos benéficos pós prandiais na pressão arterial.

Xanthohumol e outros flavonóides são polifenóis exclusivamente presentes em produtos que contenham lúpulo, como as cervejas, e conferem efeitos anti-inflamatórios *in vitro* (PELUSO *et al.*, 2010). Segundo Pinto *et al.*, (2014), os efeitos causados no fígado de ratos pelo tratamento agudo com etanol parecem associar-se a uma proteção pelo pré-tratamento com xanthohumol, sugerindo que o xanthohumol reduz o estresse oxidativo e confere proteção tecidual contra os danos causados pelo álcool.

O consumo moderado de bebidas alcoólicas também parece associar-se a uma rápida redução da resistência à insulina, bem como a um menor risco de diabetes tipo II, os quais são considerados fatores de risco para doenças cardiovasculares (JOOSTEN, 2010).

A influência do tipo de bebida alcoólica no consumo de álcool em homens e mulheres, bem como a relação de certos parâmetros bioquímicos como concentração de insulina e glicose também foram observados. Nogueira *et al.*, (2014) mostraram que a cerveja, como bebida fermentada, levou ao mais baixo nível de álcool no sangue em homens e mulheres e aos mais altos níveis de glicose e insulina nos primeiros trinta minutos após o consumo (NOGUEIRA *et al.*, 2014).

A cerveja possui boa estabilidade microbiológica, pH ácido, alta concentração de CO<sub>2</sub>, álcool e componentes antimicrobianos do lúpulo (WIEME *et al.*, 2014).

As bactérias que produzem ácido lático e ácido acético são os microrganismos mais problemáticos na produção de cervejas. Algumas cepas de bactérias produtoras de ácido lático encontradas em cerveja são resistentes ao lúpulo, sendo consideradas como deterioradoras da cerveja (BOKULICH *et al.*, 2012; HUTZLER *et al.*, 2013). De modo geral, as leveduras protegem a cerveja contra oxidação através do sequestro de radicais livres, e adicionam novos sabores e aromas durante a maturação.

Não obstante, em algumas cervejas como as do tipo “Barliner Weisse”, culturas de leveduras e bactérias produtoras de ácido lático são utilizadas para a refermentação na garrafa (VERACHTERT; DERDELINCKX, 2005). A refermentação na garrafa é uma prática comum nas cervejas do tipo “Belgian Specialty Beer”, permitindo a segunda fermentação após a adição de leveduras e uma fonte de açúcar (VANDERHAEGEN *et al.*, 2003; VAN LANDSCHOOT *et al.*, 2005).

Há ainda a refermentação com misturas de cervejas jovens e velhas produzidas espontaneamente, o que permite que os microrganismos convertam as dextrinas residuais da cerveja jovem em carboidratos fermentáveis, sem a necessidade de adição de outra fonte de açúcar (VERACHTERT; ISERENTANT, 1995).

## **2.4 Quefir e propriedades funcionais**

O quefir é uma bebida fermentada, levemente ácida e alcoólica, originada na região do Cáucaso na Ásia. É tradicionalmente produzida pela adição de grãos que constituem um consórcio de bactérias e leveduras mantidos em uma matriz de polissacarídeo em leite ou açúcar mascavo (MAGALHÃES *et al.*, 2010; MIGUEL *et al.*, 2011; LOPITZ *et al.*, 2006; SARKAR *et al.*, 2008; SIMOVA *et al.*, 2002).

O quefir pode ser classificado como um alimento funcional devido aos seus efeitos benéficos na saúde e bem-estar físico (MEDRANO *et al.*, 2011). Muitos estudos evidenciaram a composição microbiológica dos grãos de quefir que são utilizados para produzir bebidas em diferentes locais. As principais espécies de microrganismos encontrados no quefir são as bactérias do gênero *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, e *Acetobacter*, e leveduras do gênero *Kluyveromyces*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Kazachstania*, *Lachancea* e *Yarrowia* (GULITZ *et al.*, 2011; WITTHUHN *et al.*, 2004). Entretanto, a constituição dos grãos pode variar conforme o país, região, modo de preparo e o meio onde são cultivados (YAKUGAKU *et al.*, 1992).

Além do alto valor nutritivo do quefir, como uma fonte de proteínas e cálcio, várias propriedades probióticas tem sido extensamente avaliadas (AHMED *et al.*, 2013; GARROTE *et al.*, 2010; GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011), incluindo a diminuição da intolerância a lactose (DE VRESE *et al.*, 1992; HERTZLER *et al.*, 2003), a diminuição nos níveis de colesterol (LIU *et al.*, 2006), propriedades anti-mutagênica e anti-carcinogênica (DE MORENO *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2002), antagonismo contra patógenos (GOLOWCZYC *et al.*, 2007), atividade antimicrobiana (LONDERO *et al.*, 2011) e estimulador do sistema imune (ROMANIN *et al.*, 2010; VINDEROLA *et al.*, 2005), tendo seus benefícios exercidos pela presença de microrganismos e por seus compostos bioativos (IRAPORDA *et al.*, 2014).

A fração isenta de bactérias e leveduras do quefir apresentou propriedades moduladoras sobre a resposta das células epiteliais do intestino em cultura. Foi observado que o lactato, componente bioativo da suspensão de quefir, apresentou propriedades imunomodulatórias sobre as células do epitélio intestinal (IRAPORDA *et al.*, 2014).

Em um estudo ficou demonstrado que os efeitos da ingestão de quefir (URDANETA *et al.*, 2007) e seus compostos bioativos (DILLEHAY *et al.*, 1994) sobre o metabolismo de animais não alterou o ganho de peso animal, ainda que sob boa digestão. Esse estudo sugere que o quefir poderia ser empregado na dieta como um suplemento (URDANETA *et al.*, 2007).

Segundo Urdanete *et al.*, (2007), embora a atividade de algumas enzimas envolvidas na absorção de glicose não sejam alteradas, a atividade das enzimas envolvidas na absorção de dipeptídeos, como aminopeptidases N e dipeptil peptidase IV, foi modulada pela ingestão de quefir. Em outro estudo, a administração intragástrica de quefir inibiu significativamente o aumento do total de células

inflamatórias induzidas pela ovalbumina, bem como a contagem de eosinófilos. As interleucinas-4 e 13 e imunoglobulinas E retornaram aos níveis normais no fluido broncoalveolar (LEE *et al.*, 2007). Os compostos prebióticos são substâncias não digeríveis pelas enzimas do trato gastrintestinal que estimulam o crescimento de espécies bacterianas benéficas e, o bioativo mais aceito na literatura como responsável por esses efeitos do quefir é o “kefirano” ou quefirano (GHASEMLOU *et al.*, 2012; MOTEDAYEN *et al.*, 2013; SCHNEEDORF, 2014).

Diversas bactérias isoladas do quefir são capazes de produzir o exopolissacarídeo quefirano, incluindo *Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. Kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. Kefir* e *L. delbrueckii* subespécie *bulgaricus* (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003).

O quefirano possui atividade anti-inflamatória, e a capacidade de diminuir o crescimento tumoral em modelos experimentais (FURUKAWA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003). Segundo Maeda, *et al* (2004), o exopolissacarídeo produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* do quefir apresentou capacidades de reduzir o colesterol e a pressão arterial em ratos com hipertensão espontânea (MAEDA *et al.*, 2004) e demonstrou alta atividade antioxidante *in vitro* e proteção de proteínas contra danos oxidativos dependente da concentração (CHEN *et al.*, 2015).

O quefir parece também possuir uma capacidade de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos peritoniais e modular a mucosa do jejuno e íleo, o qual compreende a região anatomicamente conectada ao sistema imune pela circulação linfática e sanguínea. Assim, a resposta imune induzida nesta região pode se propagar atingindo regiões distantes (VINDEROLA *et al.*, 2005).

## **2.5 Quefir e bebidas probióticas**

O interesse em bebidas fermentadas contendo probióticos, organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde, tem aumentado nos últimos anos pela crescente demanda por produtos saudáveis e de alta qualidade. Para cumprir esta demanda, muitas tentativas vêm sendo feitas para selecionar micro-organismos específicos com propriedades desejáveis, como componentes aromáticos e probióticos (KATJA ZAJŠEK AND ANDREJA GORŠEK, 2010).

O método tradicional de preparar o quefir consiste em utilizar os grãos de quefir que contém uma mistura de várias leveduras, bactérias produtoras de ácido láctico e ácido acético coexistindo em uma associação simbiótica, tornando-se responsáveis pela fermentação ácido-alcoólica em um meio propício de nutrientes (KOURKOUTAS *et al.*, 2007). Similarmente, uma bebida láctea produzida a partir de culturas isoladas de grãos de quefir foi descrita contendo características similares às do quefir tradicional (ASSADI *et al.*, 2000).

Novas técnicas como a produção de quefir usando culturas aprisionadas de leveduras e bactérias isoladas (CHEN *et al.*, 2009) e fermentação com leveduras que não utilizam a lactose (KWAK *et al.*, 1996) tem sido desenvolvidas. Mas a qualidade dos produtos de quefir obtidos a partir destas técnicas foi reportada como sendo muito diferente do fermentado com os grãos de quefir (ASSADI *et al.*, 2000).

Uma nova abordagem foi formulada para definir as combinações diretas de microrganismos capazes de produzir diferentes bebidas semelhantes as do quefir, e investigar o comportamento fermentativo e as características físico-químicas dessas cepas em meio reconstituído em leite (NAMBOU *et al.*, 2014). Algumas combinações de cepas apresentaram grande similaridade com o quefir tradicional produzido com grãos ou em culturas puras, confirmando a possibilidade de se desenvolver bebidas a partir de culturas adequadas que apresentam a composição dos grãos de quefir com cepas definidas de bactérias do ácido láctico e leveduras (NAMBOU *et al.*, 2014).

Um estudo avaliou o uso dos grãos de quefir na inicialização de uma bebida com *Theobroma cacao L.* Os grãos de quefir foram capazes de reduzir a concentração de sacarose da bebida de cacau, produzindo metabólitos de boa qualidade (PUERARI *et al.*, 2012).

A fermentação de substratos pelo quefir produz uma bebida levemente ácida, refrescante, carbonatada e com baixo teor de álcool (GRØNNEVIK *et al.*, 2011; MIGUEL *et al.*, 2011). Assim, o quefir, além de apresentar propriedades probióticas em meios comumente utilizados, como leite e açúcar mascavo, parece apresentar grande potencial para formulações de bebidas específicas com possíveis ações funcionais.

### 3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de novos alimentos funcionais tem gerado um grande crescimento científico e industrial pela demanda do consumidor em busca de alimentos que tenham papel benéfico à saúde e à qualidade de vida.

A maioria dos alimentos funcionais encontrados no mercado são a base de leite, e muitas tentativas de se desenvolver alimentos probióticos utilizando outros substratos fermentativos como cereais tem sido feitas. Há muito conhecida por seus benefícios, a cerveja encontra-se cada vez mais popular como parte complementar de uma dieta saudável, e novos produtos tem surgido com referência à essa habilidade funcional.

O quefir é uma bebida fermentada por grãos compostos por várias leveduras e bactérias que coexistem encapsulados em uma matriz polissacarídica e possui algumas propriedades funcionais referendadas.

Nesse contexto, buscamos testar a hipótese de que agregar os valores nutricionais e funcionais da cerveja, um produto popularmente aceito, aos do quefir, reconhecidamente um alimento funcional que contém *Saccharomyces cerevisiae*, poderá trazer à luz uma bebida com possíveis propriedades combinadas de benefícios à saúde, fruto do metabolismo selvagem de suas cepas constituintes, e de sua plausível combinação no extrato pretendido. Dessa forma o presente trabalho propôs o desenvolvimento de uma cerveja fermentada unicamente por grãos de quefir, e a avaliação de suas propriedades anti-inflamatória e antiulcerogênica em modelos animais.

## 4 OBJETIVOS

Essa seção tratará dos objetivos principais e específicos avaliados no trabalho.

### 4.1 Principal

Testar a hipótese que a cerveja fermentada unicamente por grãos de quefir tenha um efeito anti-inflamatório, antiulcerogênico e antioxidantes em modelos animais.

### 4.2 Específicos

- a) Cultivar e adaptar os grãos de quefir para uso na fermentação da cerveja.
- b) Produzir cervejas fermentadas com *Sacharomyces cerevisiae* (controle) e com grãos de quefir (teste).
- c) Caracterizar propriedades físico-químicas da cerveja de quefir.
- d) Avaliar o efeito de 120 dias de armazenamento no conteúdo de polifenóis da cerveja.
- e) Avaliar o potencial anti-inflamatório, antiulcerogênico e antioxidante da cerveja de quefir.
- f) Avaliar a atividade de enzimas hepáticas e parâmetros lipídicos dos animais tratados por 30 dias com cerveja de quefir.

## **5 METODOLOGIA**

Nessa seção serão apresentadas as metodologias aplicadas para verificar a hipótese do trabalho.

### **5.1 Produção da cerveja controle e cerveja de quefir**

Essa seção tratará da metodologia aplicada à produção das cervejas.

#### **5.1.1 Adaptação do quefir**

Para que os microrganismos se adaptassem ao mosto como nova fonte de nutrientes, os grãos de quefir foram adicionados a misturas de açúcar mascavo e mosto de malte, previamente preparados e filtrados, e em proporções crescentes desse último até que se obtivesse o fermentado apenas no mosto de malte. A partir desse momento, o cultivo foi repetido a cada três dias, sem substituir os grãos, durante 12 dias, e mantido o sistema em 25°C. Durante esse período, a biomassa foi aferida em balança semianalítica, a fim de certificar-se o trabalho na fase logarítmica de cultivo dos grãos.

#### **5.1.2 Elaboração de cerveja de quefir**

A produção da cerveja de quefir foi realizada adaptando-se o processo mostrado por Venturini, (2010). Inicialmente, foram produzidos 20 L de cerveja para cada grupo, descrito no fluxograma a seguir.

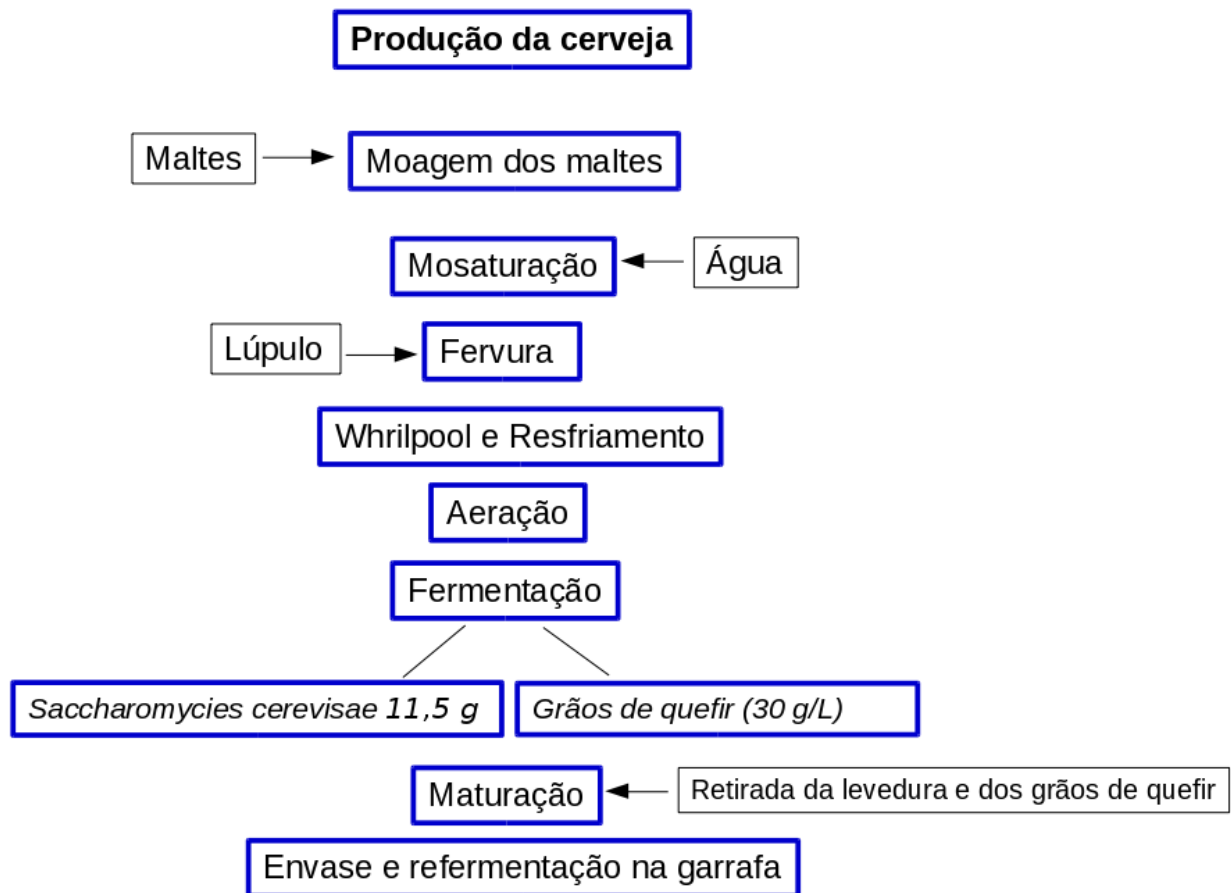


Figura 1- Fluxograma da produção das cervejas de quefir e controle  
 Fonte: Do autor

### 5.1.3 Moagem do malte

A moagem ideal visa quebrar o grão, expondo seu endosperma à ação das enzimas, mantendo a casca o mais intacta possível, a fim de formar com o próprio malte um filtro natural para a passagem do mosto, onde fica retido grande parte dos resíduos da mosturação. Assim foi utilizado um moedor de dois rolos com espaço de 1,4 mm entre eles, produzido artesanalmente.

Para a moagem, foram utilizados malte de cevada tipo Pilsen (Agrária, Guarapuava, PR, Brasil), malte de cevada tipo Pale Ale (Wayermann, Bamberg, Alemanha) e malte de cevada tipo Caraaroma (Wayermann, Bamberg, Alemanha) a uma concentração final de 250 g/L.

#### 5.1.4 Mosturação

O malte moído foi transferido para uma panela de brassagem com um filtro de mosto acoplado. Ao malte foi adicionado água cervejeira livre de impurezas, filtrada, sem cloro, sabor e cheiro, na proporção de 4 L/kg de malte, seguindo-se o aumento gradual da temperatura para atividade das enzimas peptidases, alfa-amilase e beta-amilase, totalizando 90 minutos de duração.

Ao final da mosturação, uma amostra de 250 mL foi retirada, e resfriada a uma temperatura de 25°C para a medida da densidade com densímetro de bancada.

#### 5.1.5 Fervura

Após terminado o tempo de mosturação, o mosto, mistura dos açúcares extraídos foi direcionado, com o auxílio da bomba artesanal de recirculação, para a panela de fervura. A água contida nessa panela foi previamente retirada para a lavagem do bagaço e consequente extração dos açúcares restantes que ficaram concentrados nas cascas dos grãos.

Em seguida, o mosto foi levado para a fervura a uma temperatura aproximada de 90°C por 60 minutos. Nessa etapa, 50g do lúpulo de amargor Hallertau Tradition em pellet (Hallertau, Alemanha), foi adicionado ao início da fervura para conferir a máxima extração dos alfa-ácidos.

#### 5.1.6 “Whirlpool” e Resfriamento

Finalizados os 60 minutos da fervura, o fogo foi desligado e o mosto mantido por 10 minutos em repouso. Em seguida foi realizado o “whirlpool”, o qual consiste em movimentos circulares com o auxílio de uma colher de cabo longo, para promover a decantação dos resíduos de lúpulo e proteínas indesejáveis.

Para o resfriamento, foi utilizado um trocador de calor de placas Modelo Master 14/22 c (Master Brau Joinville, SC) que resfria em média 60 litros a cada 15 minutos com água corrente. O princípio do resfriamento é feito através da troca de calor pela passagem de mosto e fluido refrigerante em sentido contrário (sistema de

fluxo inverso). Assim, o mosto foi resfriado para a temperatura de fermentação de cerveja do tipo Ale em torno de 20°C.

#### 5.1.7 Aeração, Fermentação e Maturação

A aeração foi feita durante o processo de transferência para o fermentador, através da técnica de “splash”, que consiste em deixar o mosto cair lentamente da panela de fervura para o fermentador, com o mosto na temperatura de 20°C. O mosto foi dividido em dois galões de 20 L cada. Em seguida, foram colocados os grãos de quefir na concentração de 30 g/L em um galão e, no galão controle foi adicionado um pacote de 11,5 g de levedura cervejeira Safale US-05 (Fermentis, Lesaffre, França) previamente hidratada.

Para fechar os galões foram utilizadas válvulas “airlock” contendo álcool a 70°C, que permitem a saída do CO<sub>2</sub> produzido no processo fermentativo, e impedem o contato da bebida com o oxigênio. Os galões foram acondicionados dentro de uma geladeira acoplada a um termostato, em sala com temperatura controlada de 20°C durante 7 dias. Após 7 dias de fermentação, uma amostra de 250mL da cerveja foi retirada para medida da densidade final, com o auxílio de um densímetro.

Em seguida a cerveja foi transferida para outro galão, permitindo a retirada dos grãos de quefir, bem como da levedura cervejeira. Os galões foram colocados em geladeira e o termostato foi ajustado para uma temperatura controlada de 5°C durante 10 dias. Esse processo de maturação faz-se necessário para a decantação de resíduos de leveduras e proteínas coaguladas, além de proporcionar características sensoriais favoráveis às cervejas, embora não avaliadas nesse momento.

#### 5.1.8 Envase e Refermentação na Garrafa

Após a etapa da maturação, as cervejas foram envasadas em garrafas de vidro de 600 mL na cor âmbar. Foi adicionada a cada garrafa sacarose na concentração de 5 g/L. Essa medida proporcionou a produção do CO<sub>2</sub> através da refermentação das leveduras que permaneceram após a maturação, pois não foi utilizado um filtro que permita a retirada total das leveduras em suspensão. Nesse

sentido, as leveduras remanescentes do quefir e da levedura cervejeira consumiram o açúcar e produziram o CO<sub>2</sub> necessário para conferir a carbonatação das cervejas em 10 dias.

A transferência da cerveja para garrafas foi realizada com o auxílio de um conjunto de envase 3/8" inox 304 com mangueira (9,5 mm) com 40 cm de comprimento acoplado a uma mangueira atóxica de 1,50 m. As garrafas foram vedadas utilizando-se um arrolhador manual em aço nas medidas de 46 cm de altura e 10 cm de largura. As garrafas permaneceram acondicionadas em uma sala escura, protegida do sol e de odores indesejáveis por 10 dias antes dos experimentos.

## **5.2 Análise da Composição da Cerveja de Quefir**

Essa seção abordará a metodologia referente às análises físico-químicas das cervejas.

### **5.2.1 Propriedades físico-químicas**

As cervejas produzidas com levedura cervejeira e com grãos de quefir foram avaliadas quanto a seus valores de pH, densidade e teor alcoólico seguindo-se a metodologia de Venturini (2010).

Brevemente, 10 mL das amostras de ambas as cervejas foram colocadas em um becker e foi verificado o valor de pH utilizando-se um pHmetro de bancada. O teor alcoólico foi determinado de acordo com Grabenwasser (s.d.), onde foi utilizado o resultado inicial e final da densidade, seguindo a fórmula:

$$ABV = DI - DF \times 131$$

onde ABV (Alcohol by Volume) é o percentual de álcool gerado,

DI, a densidade inicial, antes da fermentação

DF, a densidade final, após a fermentação e,

A densidade foi verificada com auxílio de um densímetro calibrado à temperatura de 20°C, sendo a mesma para a cerveja.

### 5.2.2 Caracterização de polifenóis por Cromatografia Líquida de Alta Pressão/Eficiência (HPLC)

A fim de se identificar compostos distintos nas preparações controle e teste das cervejas (polifenóis), foram realizados ensaios cromatográficos como segue. A análise das amostras de cerveja foi realizada por um sistema cromatográfico Shimadzu Prominence (Tokyo, Japão) modelo LC-10 com injetor automático (40 µL) e detector para absorção molecular em 270 nm. O sistema foi equipado com coluna analítica CLC-ODS (250 mm x 4,4 mm diâmetro interno x 5 µm). As análises foram conduzidas em um sistema de gradiente com duas fases onde A era composta de água com 1mmol de ácido acético e B Metanol com 1% de ácido acético, variando-se as concentrações da fase B entre 10 a 100%. Os ensaios foram conduzidos em 20 °C a um fluxo de 1,0 ml/min ajustado com bomba de alta pressão. Como padrões internos para a identificação de polifenóis foram utilizados ácido tânico, ácido gálico, catequina, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido cumárico e quercetina (Sigma-Aldrich). As concentrações dos compostos de interesse foram obtidas por integração das áreas dos picos correlacionadas aos padrões.

## 5.3 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar, com peso entre 250 a 300g, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com água e ração comercial *ad libitum* e foram divididos em grupos experimentais aleatórios. Os grupos foram utilizados conforme descrito a seguir:

Grupo 1. Cerveja de quefir (CQ) – (N=24). Os animais foram tratados, via gavagem com 1.5 mL de cerveja de quefir. A dosagem administrada intragastricamente foi

equivalente ao consumo de 400 mL/dia por humanos pesando 70 kg (VALLS-BELLES *et al.*, 2010).

Grupo 2. Cerveja controle (CC) – (N=24). Os animais foram tratados, via gavagem com 1.5 mL de cerveja controle.

Grupo 3. Etanol (Et) – (N=24). Os animais foram tratados, via gavagem com etanol a 4 %.

Grupo 4. Água (Ag). (N=24). Os animais foram tratados, via gavagem com 1.5 mL de água.

Grupo 5. Quefir (Qf). (N=24). Os animais foram tratados, via gavagem com 1.5 mL de suspensão de quefir cultivada na concentração de 30 g/L com 48 h de troca de meio de cultivo.

Todos os animais foram pesados a cada 5 dias durante o tratamento de 30 dias. A metodologia foi realizada em acordo com os procedimentos aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal da UNIFAL-MG sob o protocolo número de 657/2015.

#### **5.4 Atividade Antiulcerogênica**

A avaliação da atividade antiulcerogênica da cerveja de quefir foi realizada através de indução aguda por etanol absoluto adaptadas de Salga *et al.* (2012). Após um período de 24 horas em jejum, os animais foram divididos em seis grupos (N=8) e tratados via gavagem com cerveja de quefir (1,5 mL/animal), suspensão de quefir em açúcar mascavo (1,5 mL/animal), cerveja controle (1,5 mL/animal), água (1,5 mL/animal) e pantoprazol (0,1 mg/kg). Sessenta minutos após os tratamentos, cada animal recebeu etanol absoluto (1 mL/200 g). Após sessenta minutos, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> e seus estômagos foram removidos e abertos pela curvatura maior. Foram feitas fotografias para determinar a área de

lesão por planimetria de acordo com Morimoto *et al.*, (1991), utilizando o software ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, U.S.A.).

### **5.5 Atividade anti-inflamatória por medida do edema de pata induzido por carragenina ou Histamina em ratos**

A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando-se o modelo de edema de pata induzido por carragenina (WINTER *et al.*, 1962).

Os animais, em jejum de quatro horas, foram divididos em grupos (N=8/grupo) e tratados por 7 dias, (v.o.), com cerveja de quefir 1,5 mL/animal), cerveja controle 1,5 mL/animal, quefir em suspensão de açúcar mascavo 1,5 mL/animal ou veículo (água). Indometacina (10 mg/kg, Sigma-Aldrich) e Ciprooptadina (5 mg/kg, Prodome, SP, Brazil), foram utilizadas como drogas de referência, controles positivos, no dia do experimento. Após 30 minutos, todos os animais receberam, na região subplantar, 0,1 mL de carragenina 1% (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) ou histamina 100 µL of 10 mg/mL (Holsapple *et al*, 1980, Sigma-Aldrich) na pata traseira direita e igual volume de salina 0,9 % (solução controle) na pata traseira esquerda. O volume das patas foi medido por paquímetro digital imediatamente após a administração do agente flogístico (tempo zero), após 30 minutos e a cada 60 minutos, durante um período de cinco horas.

### **5.6 Atividade das enzimas antioxidantes**

Após 30 dias de tratamento, 8 animais de cada grupo foram sacrificados por superdosagem de anestesia através da administração de 40 mg/kg de pentobarbital sódico intraperitonealmente. O sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubos sem anticoagulante e centrifugados por 10 minutos a 2000 rpm. O soro foi armazenado em freezer -20°C para subseqüentes análises bioquímicas.

### 5.6.1 Catalase (Cat)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com o método descrito por Beutler (1975) e diagramado abaixo:



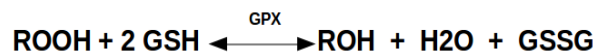
Branco: Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8.0 50µL + 930 µL H<sub>2</sub>O

Teste: Tris HCl 1 M, EDTA 5mM, pH 8.0 50µL + 30 µL H<sub>2</sub>O + 900 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM

Após 10 minutos de incubação a 37°C foram adicionados 20 µL de amostra (soro) no branco e no teste. Posteriormente, foram realizadas as leituras do tubo Teste contra o Branco em 230 nm. O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado por quatro minutos.

### 5.6.2 Glutathiona Peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi determinada de acordo com o método descrito por Albrecht Wendel, (1981), também diagramado como segue:



Em uma cubeta de Quartzo foram adicionados em sequência:

- 100 µL de Tampão fosfato de potássio 0,25 M, pH 7,0, contendo 2,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA e 2,5 mM de azida sódica;
- 100 µL de glutathiona redutase em PBS 0.1 M (atividade/mL: 6 µmol/min a 25°C);
- 100 µL de glutathiona reduzida 10 mM ( solução aquosa);
- 100 µL de NADPH 2,5 mM em solução 0,1% de NaHCO<sub>3</sub>;
- 500 µL de solução teste.

As amostras foram incubadas por 10 min a 37°C. A reação foi iniciada com 100 µL de t-BOOH 12 mM em um volume final 1 mL, e a leitura do decréscimo de NADPH

feita em 366 nm por 6 minutos. O valor do decaimento espontâneo da reação do controle foi subtraído do tubo contendo enzima.

### **5.7 Enzimas Hepáticas e Perfil Lipídico**

Foi determinada a atividade das enzimas hepáticas gama glutamil transpeptidase ( $\gamma$ -GT), aspartato e alanina aminotransferase (AST e ALT) e o perfil lipídico de triclicerídeos, colesterol e HDL-colesterol por método enzimático colorimétrico com Kits comerciais (Labtest, Brasil).

### **5.8 Avaliação do tecido epitelial dos estômagos dos animais submetido à úlcera induzida por etanol absoluto**

Para a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura, foram retiradas amostras dos tecidos estomacais com lesões ulcerativas de todos os grupos e fixados em glutaraldeído 2.5 % em 0,1 mol/L de tampão de cacodilato de sódio a um pH de 7,2 por 6 horas. O material foi pós-fixado em Tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% por 1 hora seguindo-se a impregnação com ácido tânico a 1 % por 30 minutos e, novamente, com  $\text{OsO}_4$  a 1 % por 30 minutos afim de aumentar a condutividade elétrica dos tecidos. O material foi desidratado em gradiente de etanol e secadas utilizando aparelho Balzers CPD030. O tecido foi colocado no stub com a porção distal para cima e revestido com uma camada de 20 nm de ouro em um dispositivo Balzers SCD 050. As amostras foram analisadas utilizando um microscópio eletrônico JEOL-JSM-5300 (Jeol Inc., U.S.A.).

### **5.9 Compostos bioativos na cerveja de quefir**

Buscou-se identificar possíveis bioativos presentes na cerveja de quefir, por autoclavagem de amostras de cerveja de quefir (121 °C, 30 minutos) e extração de

quefirano (MOREIRA *et al.*, 2009), um exopolissacarídeo identificado na literatura pertinente como responsável por diversos efeitos benéficos do quefir.

A partir de 454,3 g de grãos macerados de quefir obteve-se um rendimento de 3,4 g de quefirano, seguindo-se metodologia apresentada por MOREIRA *et al.*, (2009) com modificações (uso de água purificada Mili-Q, fervura sob agitação periódica, duas precipitações com etanol, três ciclos de centrifugação e lavagem do precipitado, secagem em estufa a 80 °C por 90 minutos).

Amostras de cerveja de quefir autoclavada, bem como quefirano purificado adicionado à cerveja controle, foram testadas em ensaios de atividade anti-inflamatória induzida por histamina e úlcera gástrica induzida por etanol, esse com pré-tratamento dos animais com indometacina *i.p.* O quefirano foi adicionado às cervejas controle a uma concentração final de 1, 5 e 10 mg/mL.

## **6. Análise de dados**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão para cada grupo de tratamento. As diferenças significativas foram avaliadas por ANOVA após reunidas as premissas de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (teste de Levene).

As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando-se teste *post-hoc* de Tukey. Comparações pareadas foram realizadas com o teste t de Student com correção de Bonferroni. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados utilizando-se o pacote estatístico R (R Core Team, 2015).

## **7. Laboratórios utilizados para o desenvolvimento desse trabalho**

Esse projeto foi desenvolvido com o auxílio da infraestrutura presente na UNIFAL-MG através de equipamentos e reagentes já disponíveis nos Laboratório de Bioquímica Clínica da FCF, Laboratório do Dbio CTD, Laboratório de Microbiologia Clínica e Laboratório de Bioquímica da UNIFAL-MG. A microscopia de varredura foi acompanhada junto ao Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de São Paulo (CEME-Unifesp/SP).

## 8 RESULTADOS

Essa seção refere-se à apresentação dos resultados obtidos no trabalho.

### 8.1 Crescimento e adaptação dos grãos de quefir

Os grãos de quefir passaram por um período de adaptação aos nutrientes do malte durante 21 dias, com trocas do meio a cada três dias. A Figura 2 apresenta a curva de crescimento dos grãos ao longo de 12 dias. A biomassa de quefir apresentou um crescimento de  $454,3 \pm 15$  g ao final de três ensaios repetidos de crescimento.

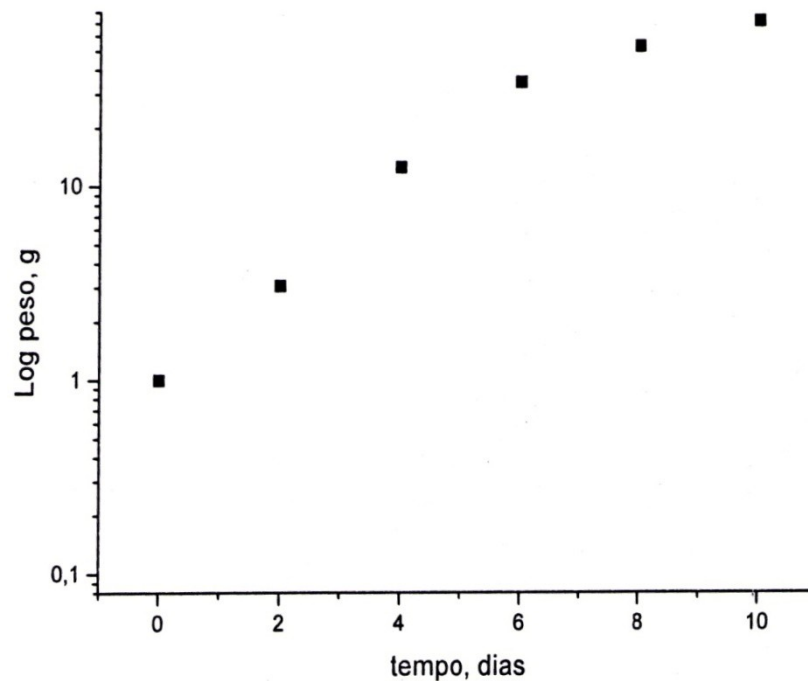


Figura 2- Crescimento de grãos de quefir cultivados em malte de cevada, por 12 dias para adaptação.

Fonte: Do autor

## 8.2 Características físico-químicas e perfil de polifenóis

As cervejas artesanais foram produzidas por grãos de quefir (cerveja teste) ou *Saccharomyces cerevisiae* (cerveja controle) e os produtos finais apresentaram um volume de álcool de  $4,0 \pm 0,2$  % e um valor de pH de 4,3 a 4,4.

A densidade inicial do mosto cervejeiro, antes da fermentação foi de 1,043 e, logo após a fermentação, de 1,012.

Os valores de polifenóis, flavonóides (catequina e quercetina), bem como os ácidos cumárico, gálico, cafeico e clorogênico, foram acompanhados ao longo de 120 dias após o envase e estão mostrados na Tabela 1. Os compostos fenólicos foram semelhantes em ambas as preparações de cervejas ( $p > 0,05$ , teste *t* de Student). Os valores de polifenóis encontrados foram de 1,8 g/L, correspondendo a aproximadamente 20% da recomendação diária (FUMI *et al.*, 2011).

Tabela 1- Polifenóis encontrados nas cervejas controle e quefir. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio-padrão de seis medidas obtidas com 0, 10, 20, 30, 60 e 120 dias após o envase das cervejas.

Polifenóis	Cervejas (mg/L)	
	Controle	Quefir
Ácido Cafeico	23,1 $\pm$ 6,0	25,1 $\pm$ 5,9
Ácido Clorogênico	537,1 $\pm$ 63,2	409 $\pm$ 17,3
Ácido Cumárico	51,4 $\pm$ 16,4	44,5 $\pm$ 4,0
Ácido Gálico	655,4 $\pm$ 211,0	555,1 $\pm$ 22,6
Catequina	459,6 $\pm$ 10,1	501,6 $\pm$ 52,5
Quercetina	18,3 $\pm$ 7,2	21,6 $\pm$ 6,6

Notas: condições do HPLC: coluna Shimadzu C18, 250mm x 4.6mm I.D., 5mm; solvente (A) 1mmol de ácido acético aquoso e Metanol com 1% de ácido acético(B), taxa de fluxo de 0,7 mL/min; gradiente linear como descrito na seção 5.2.2.

A Figura 3 apresenta o cromatograma de eluição da cerveja de quefir contrastado ao resultado dos padrões.

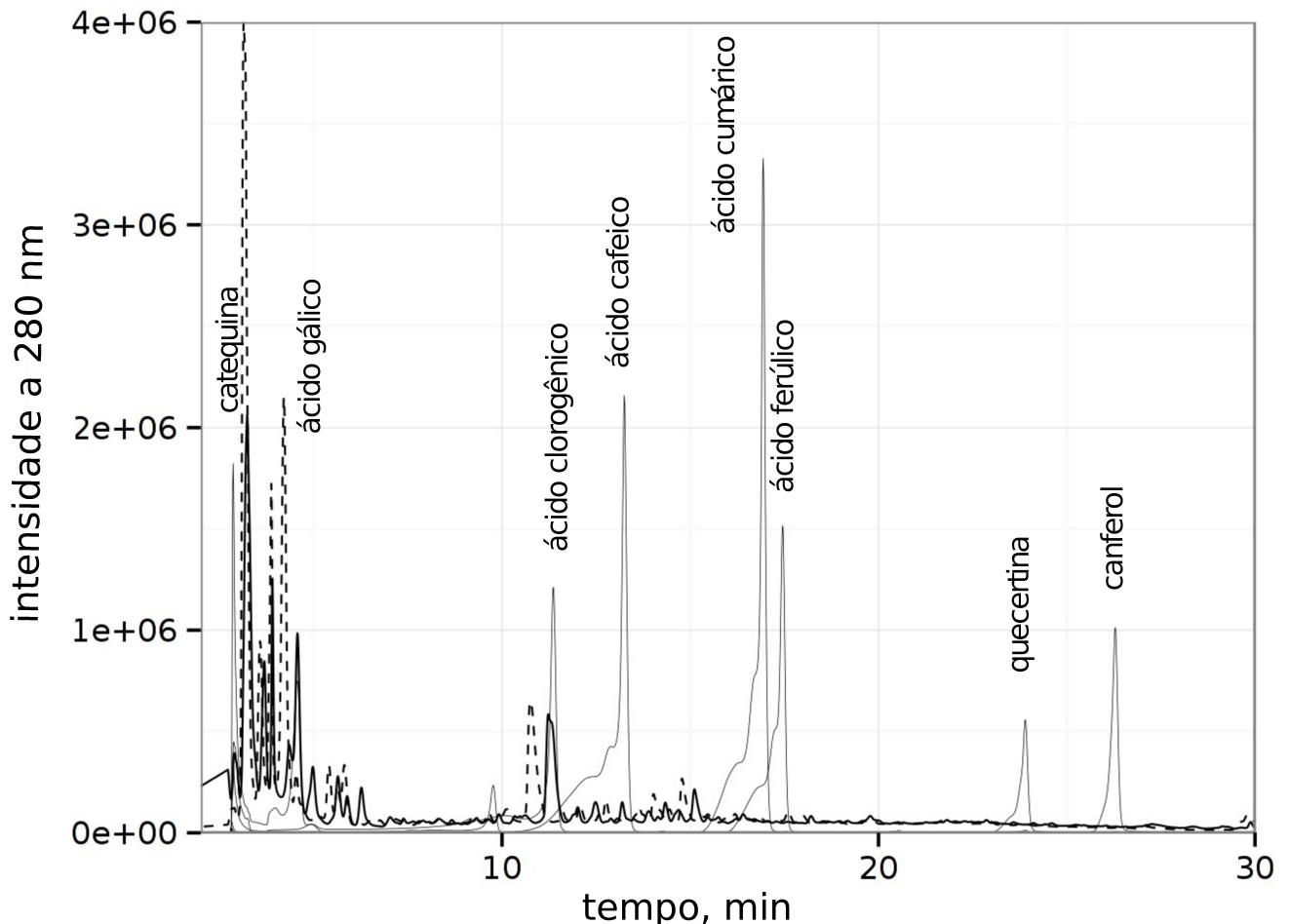


Figura 3- Cromatograma de eluição de amostra de cerveja de quefir de 30 dias (linha descontínua) e padrões utilizados (linha contínua).

Fonte: Do autor

### 8.3 Peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais foi verificado a cada 5 dias de tratamento. Ambas as cervejas, quefir e controle, bem como a suspensão de quefir em açúcar mascavo, apresentaram uma significativa redução de peso ( $P < 0,001$ ), quando comparadas aos grupos da água e etanol 4 % (Figura 4). A cerveja de quefir reduziu  $4,8 \pm 0,2$  % no peso dos animais comparada com uma redução de  $1,8 \pm 0,1$  % no grupo da cerveja controle.

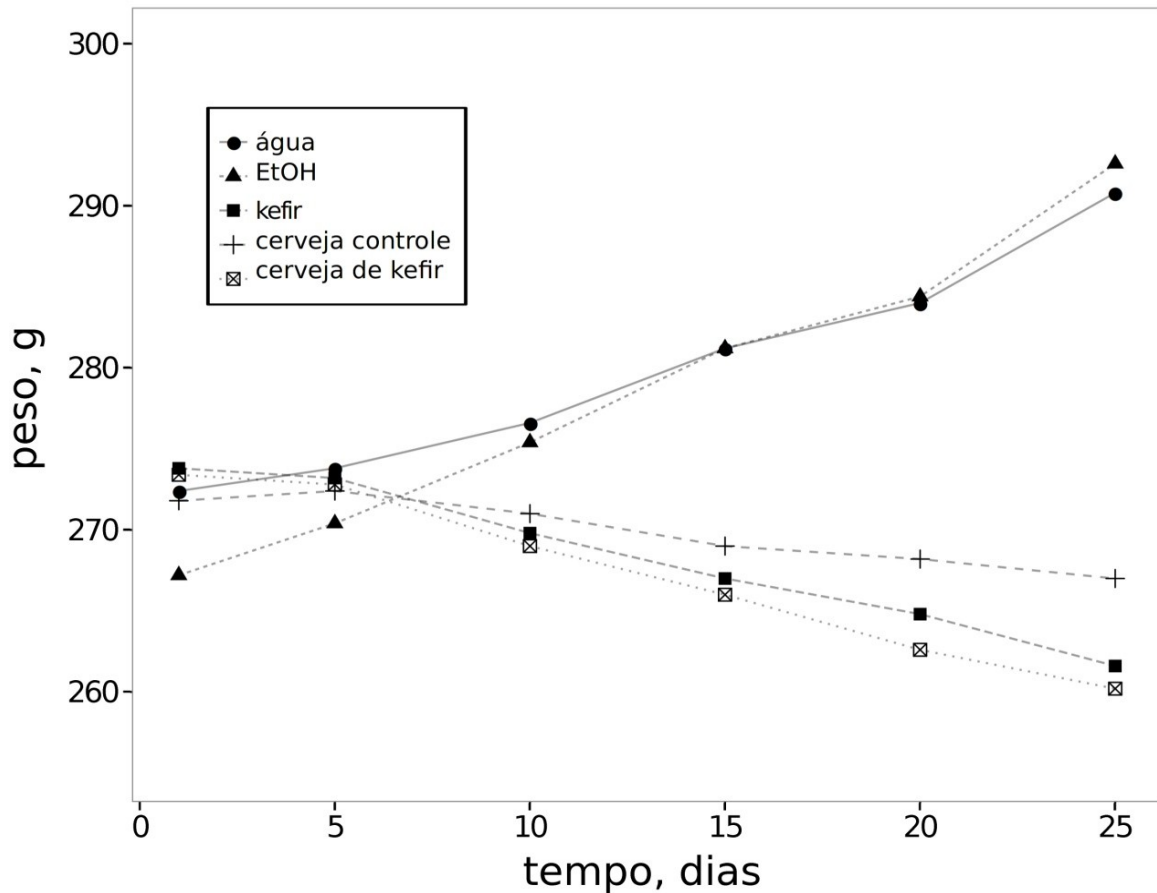


Figura 4- Comparação dos pesos dos animais (N=5) tratados com cerveja de kefir, cerveja controle, suspensão de kefir, água e etanol a 4% durante 30 dias. Os valores representam as médias dos pesos dos animais a cada 5 dias de tratamento.  
Fonte: Do autor

#### 8.4 Atividade Antiulcerogênica da cerveja de kefir

As observações macroscópicas nos tecidos do estômago apresentando áreas ulcerosas induzidas pelo etanol estão representadas na Figura 5. Úlceras mais profundas foram observadas em ambos os grupos de água (A) e etanol 4 % (B). O medicamento de referência administrado aos animais, pantoprazol (Medley), preveniu a formação do tecido ulceroso (C). Os tratamentos com a suspensão de kefir (D), cerveja controle (E) e cerveja de kefir (F), apresentaram uma significativa redução das áreas de úlceras comparadas ao grupo da água (Figura 6) e similares ao tratamento com pantoprazol.

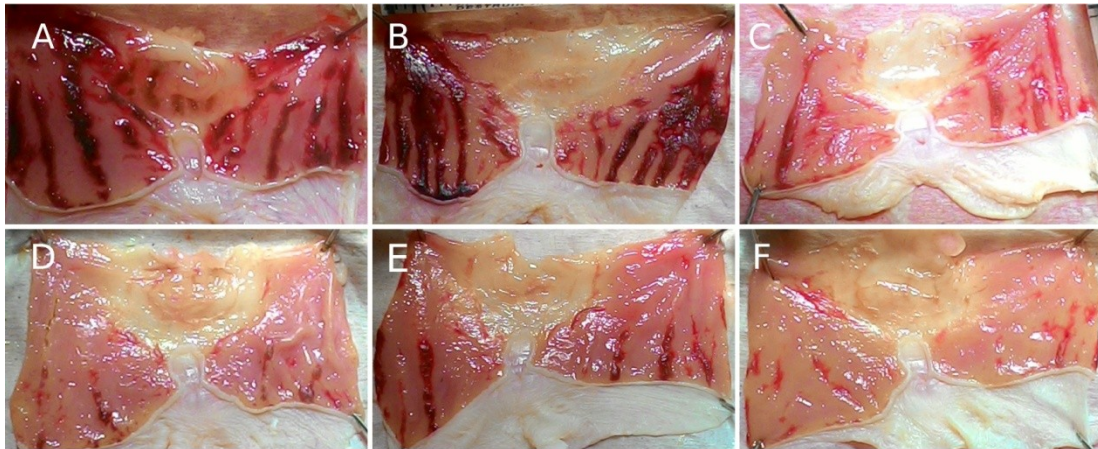


Figura 5- Úlceras gástricas induzidas por administração de etanol absoluto em ratos previamente tratados com: A- Água, B- Etanol 4 %, C- Pantoprazol, D-Suspensão de quefir, E- Cerveja controle, F- Cerveja de quefir. Os animais receberam 1 mL de etanol absoluto, via gavagem, e foram sacrificados após 1 hora. Observar as áreas hemorrágicas com lesões longitudinais em todos os grupos.

Fonte: Do autor

As áreas das lesões foram determinadas por planimetria e estão apresentadas na figura 6. As áreas das feridas relativas aos grupos tratados com cerveja de quefir ( $14,5 \pm 1,2 \%$ ) e suspensão de quefir ( $14,6 \pm 0,9 \%$ ) foram significativamente menores que àquelas encontradas nos grupos da cerveja controle ( $24,3 \pm 3,2 \%$ ) e mesmo no grupo tratado com pantoprazol ( $22,2 \pm 2,3 \%$ ).

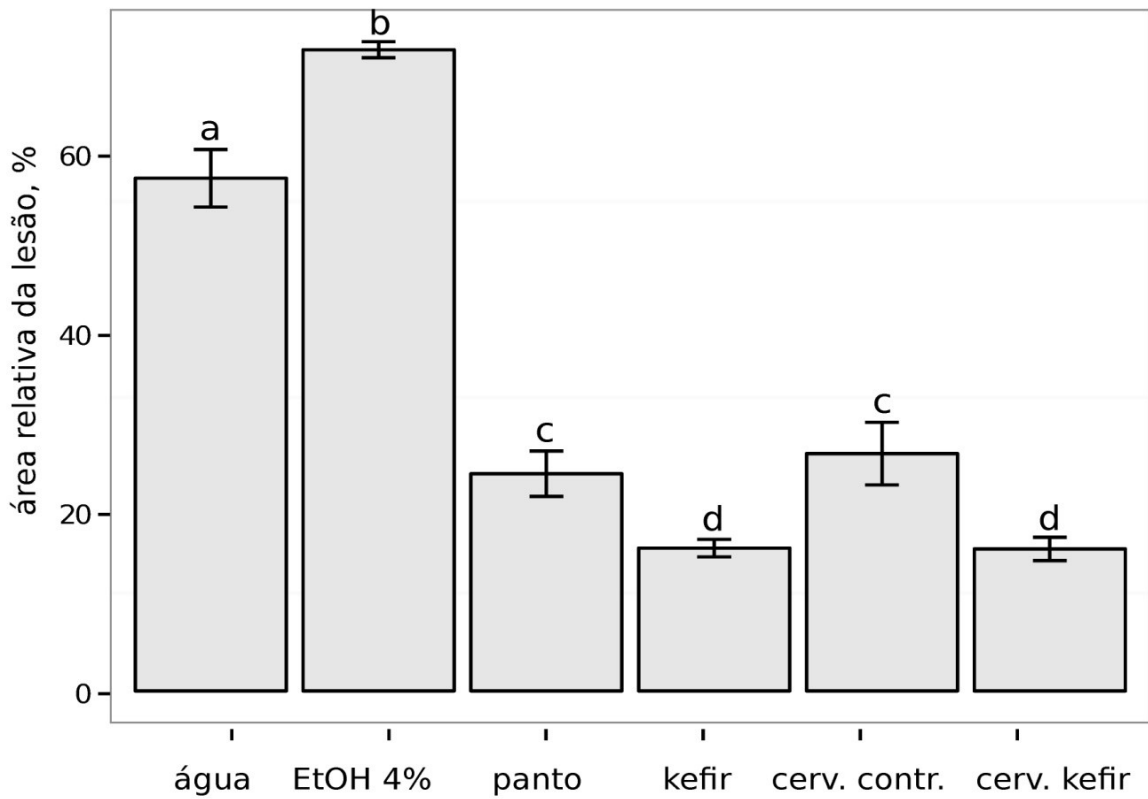


Figura 6- Percentual de áreas de lesões ulcerativas nos estômagos dos animais tratados previamente com etanol absoluto. Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP (N=8/grupo), seguindo one-way ANOVA seguido de teste de Tukey. As letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P < 0.05$ ). Nota: panto -0,1 mg/mL pantoprazol (Controle positivo).

Fonte: Do autor

### 8.5 Edema de pata induzido por carragenina e histamina

Foi observada uma diminuição da inflamação após 7 dias de tratamento com cerveja de quefir, cerveja controle e suspensão de quefir, embora a cerveja de quefir tenha apresentado uma redução mais pronunciada que a cerveja controle (Figura 7,  $p < 0,05$ ).

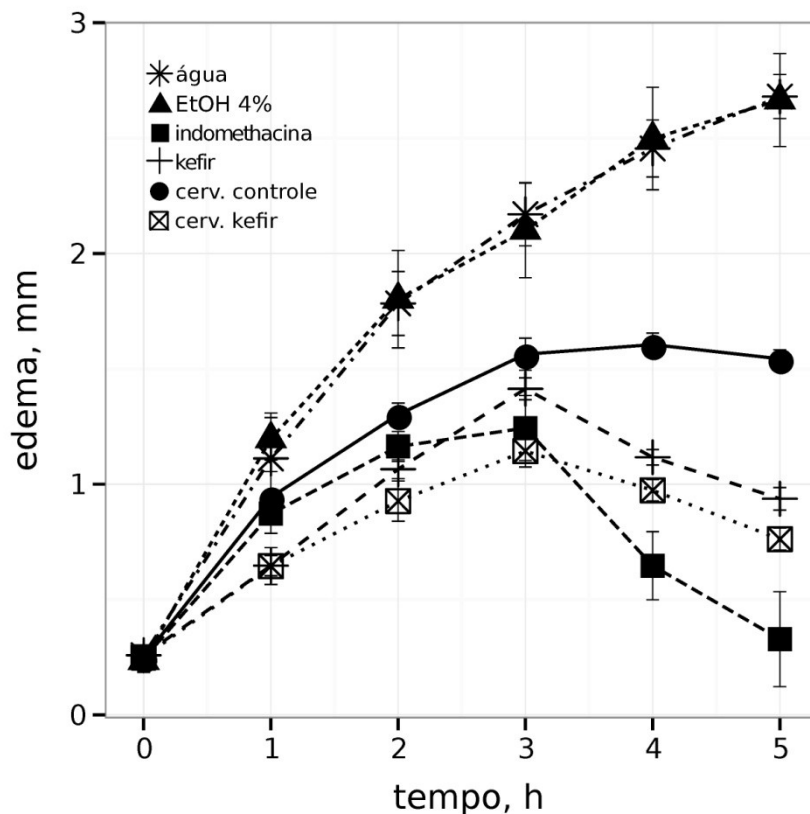


Figura 7- Medida das patas (mm) dos animais tratados oralmente por 7 dias. O edema de pata foi induzido por injeção subplantar de 100 µL a 1 % de carragenina diluída em água destilada. Os dados estão expresso por média  $\pm$  desvio-padrão (N=8/grupo).

Fonte: Do autor

Os animais tratados com a cerveja de quefir apresentaram uma redução do edema de pata de  $41,4 \pm 5,1$  e  $47,5 \pm 2,9$  % na 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> hora, respectivamente. A cerveja controle reduziu o edema em  $14,5 \pm 1,5$  e  $28,1 \pm 1,3$  % no mesmo período ( $p < 0,05$ ).

A cerveja de quefir reduziu os valores do edema de pata continuamente após a 3<sup>o</sup> hora e, a cerveja controle, permaneceu sem alterações significativas até o final do experimento (Figura 7).

Interessantemente, quando os resultados de inibição contra carragenina foram comparados com 30 e 120 dias de amadurecimento da cerveja de quefir, houve maior inibição ( $p < 0,05$ ) com a amostra envelhecida, quando comparada à cerveja de 30 dias (Figura 8).

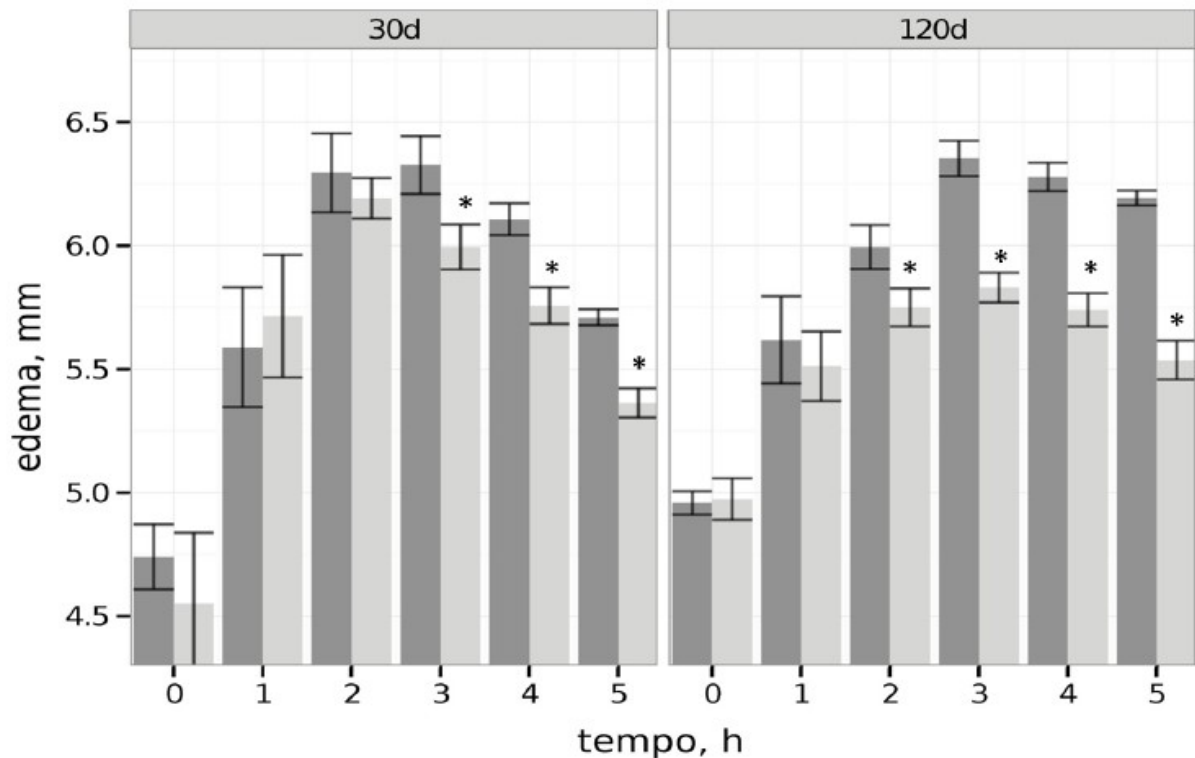


Figura 8- Comparação da redução do edema de pata induzido por carragenina entre os animais tratados com a cerveja de quefir com 30 e 120 dias após o envase. As barras escuras correspondem às cervejas controles e as claras, às cervejas de quefir.

Fonte: Do autor

Ao observarmos as respostas significativas da cerveja de quefir na 1<sup>o</sup> hora, (Figura 8), na redução do edema de pata, foi necessário repetirmos os experimentos utilizando a histamina como agente edematogênico (Holsapple *et al.*, 1980).

Os resultados estão apresentados na Figura 9. Pode-se observar uma significativa redução no edema de pata dos animais tratados com cerveja de quefir ( $76,4 \pm 5,9$  %) ao passo que a cerveja controle não se mostrou eficiente na inibição da inflamação ( $4,09 \pm 0,1$  %). Esses resultados sugerem melhores propriedades anti-inflamatórias relacionadas a inibição e/ou bloqueio da ação da histamina, tal como apresentada pela cerveja fermentada com grãos de quefir.

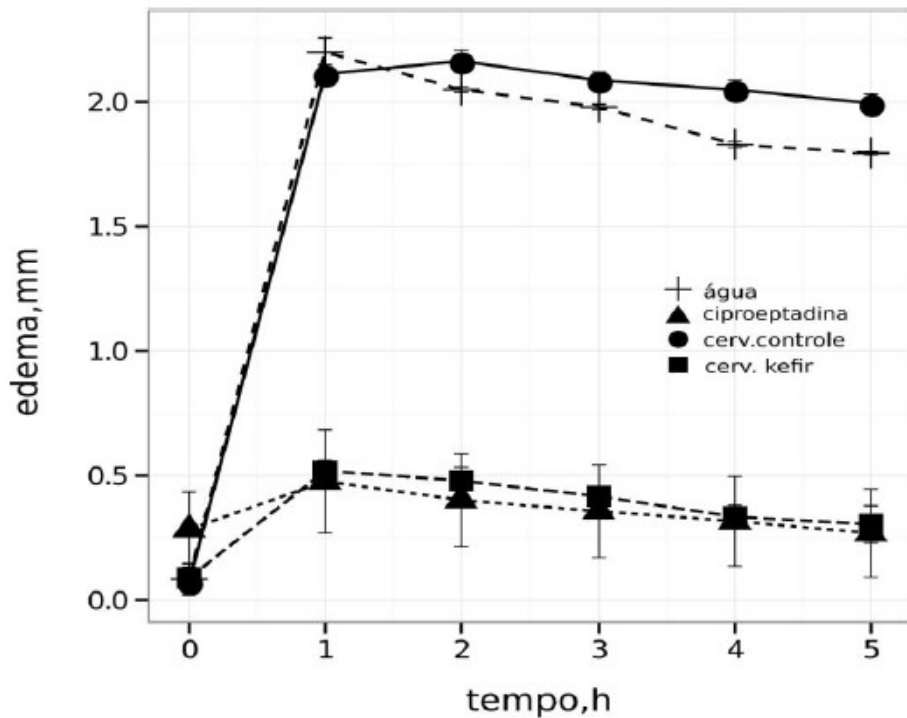


Figura 9- Medida das patas (mm) dos animais tratados oralmente por 7 dias. O edema de pata foi induzido por injeção subplantar de 100  $\mu$ L a 1 % de histamina diluída em água destilada. Os dados estão expressos por média  $\pm$  DP (N=8/grupo)..

Fonte: Do autor

### 8.6 Atividade das enzimas antioxidantes, hepáticas e perfil lipídico dos animais tratados por 30 dias

A Tabela 2 apresenta os valores de alguns analitos sanguíneos quantificados

nos vários grupos. Os parâmetros sorológicos testados permaneceram sem alterações significativas entre os grupos. Esses achados sugerem que ambas as cervejas e a suspensão de quefir não alteraram o perfil bioquímico (hepático e lipídico) dos animais tratados, bem como a capacidade antioxidante (catalase e Gpx).

Tabela 2- Concentrações dos metabólitos lipídicos e atividade das enzimas hepáticas e antioxidantes observadas após 30 dias de tratamento com água, etanol 4 %, suspensão de quefir, cerveja controle e cerveja de quefir.

Analitos	Água	Etanol 4%	Quefir	Cerveja Controle	Cerveja de Quefir	P-valor
<b>Frações Lipídicas</b>						
Triacilglicerídeos (mg/dL)	55,0 ± 13,3	66,0 ± 6,4	69,2 ± 15,7	61,8 ± 12,7	71,3 ± 17,8	0,580
Colesterol Total (mg/dL)	61,0 ± 11,0	63,0 ± 9,5	65,6 ± 8,8	62,0 ± 10,1	66,8 ± 15,1	0,916
HDL-colesterol (mg/dL)	36,4 ± 3,5	38,0 ± 4,6	36,4 ± 4,8	37,5 ± 1,7	37,8 ± 6,3	0,634
<b>Enzimas</b>						
ALT (U/L)	42,8 ± 3,0	46,6 ± 15,0	45,4 ± 3,5	40,0 ± 5,0	45,2 ± 6,1	0,714
AST (U/L)	204,8 ± 60,4	178,8 ± 98,4	186,8 ± 62,1	132,0 ± 61,9	186,6 ± 17,2	0,146
Catalase (µmol/min/mg proteína)	2,3 ± 0,3	5,5 ± 0,4	1,7 ± 0,6	4,1 ± 0,3	5,1 ± 0,8	0,089
GPx (µmol NADPH/mg proteína)	45,9 ± 7,0	65,8 ± 5,5	64,1 ± 6,7	57,2 ± 12,3	49,6 ± 26,0	0,370

Nota: Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão de cinco determinações, seguida de ANOVA de um critério.

Fonte: Do autor

## 8.7 Microscopia Eletrônica de Varredura

Em adição aos resultados de indução de úlcera por etanol (Figuras 5 e 6), foram obtidas imagens de microscopia eletrônica de varredura das lesões ulcerativas, as quais estão apresentadas na Figura 10 para os diversos grupos tratados. Nessa, pode-se observar as imagens de úlceras, sendo a Figura 10-1 os animais tratados com água, 10-2 animais tratados com etanol 4%, 10-3 animais tratados com pantoprazol, 10-4 animais tratados com suspensão de quefir, 10-5 animais tratados com cerveja controle e 10-6 animais tratados com cerveja de quefir.

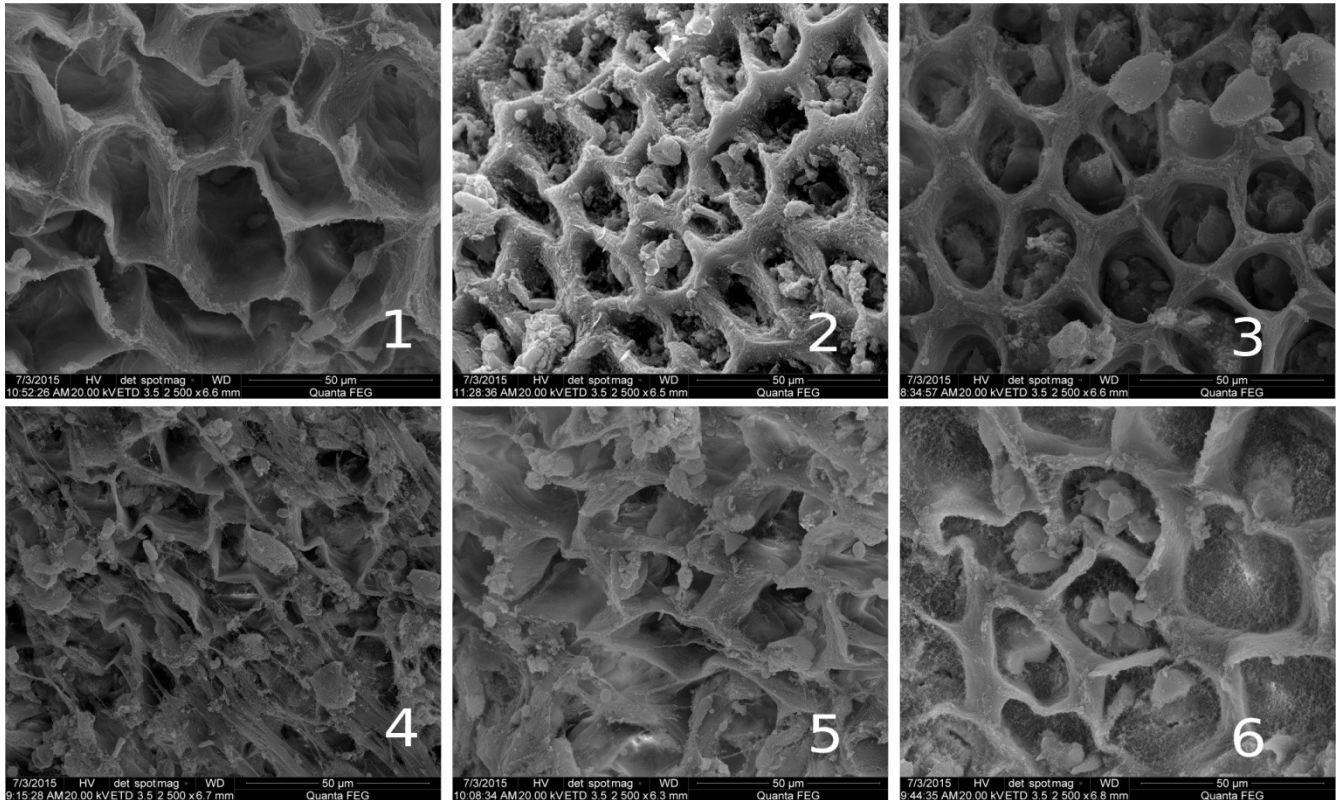


Figura 10- Microscopia eletrônica de varredura de amostras de tecido ulcerativo dos animais tratados com 1-água; 2- etanol 4%; 3- pantoprazol; 4- suspensão de quefir; 5- cerveja controle; 6- cerveja de quefir.

Fonte: Do autor

Complementarmente, detalhes das imagens podem ser visualizados na Figura 11. Pode-se observar em 11-1 o tecido epitelial intacto, 11-2 e 11-3 úlceras atingindo camadas conjuntivas nos animais que receberam água e etanol 4%. As imagens 11-4 e 11-5 apresentam uma cobertura sobre o tecido epitelial dos estômagos dos animais que foram tratados com suspensão de quefir e cerveja de quefir, respectivamente. Essa cobertura, que foi observada apenas nos grupos de animais que receberam a suspensão de quefir e a cerveja de quefir, poderia estar relacionada a uma interação específica com a mucosa gástrica, bem como outras associações com as estruturas do estômago.

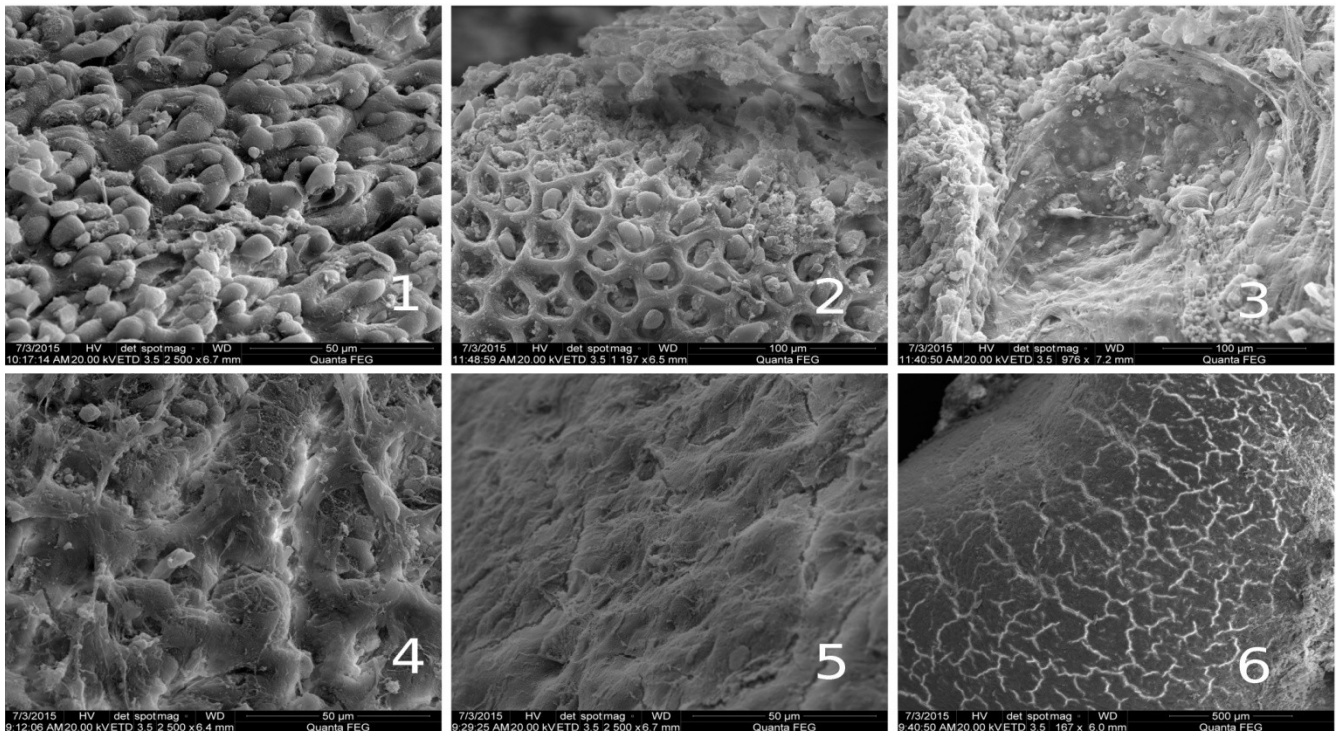


Figura 11- Detalhes de imagens de microscopia eletrônica de varredura dos estômagos dos animais tratados. 1 – tecido epitelial intacto (2500X); 2 – água (1197X); 3 – etanol (2500X); 4 – suspensão de quefir (2500X); 5 – cerveja de quefir (2500X); 6 – cerveja de quefir (167X).

Fonte: Do autor

### 8.8 Compostos bioativos na cerveja de quefir

Amostras de cerveja de quefir autoclavada, bem como quefirano purificado adicionado à cerveja controle, foram testadas em ensaios de atividade anti-inflamatória induzida por histamina (Figura 12) e úlcera gástrica induzida por etanol, esse com pré-tratamento dos animais com indometacina *i.p* (Figura 13). O quefirano foi adicionado às cervejas controle a uma concentração final de 1, 5 e 10 mg/mL. A figura 12 apresenta a medida do edema de pata dos animais tratados com as amostras controle e das cervejas. Pode-se observar que a cerveja controle não apresentou atividade anti-inflamatória na primeira hora, comparada as respostas das cervejas modificadas com quefirano e a cerveja de quefir autoclavada.

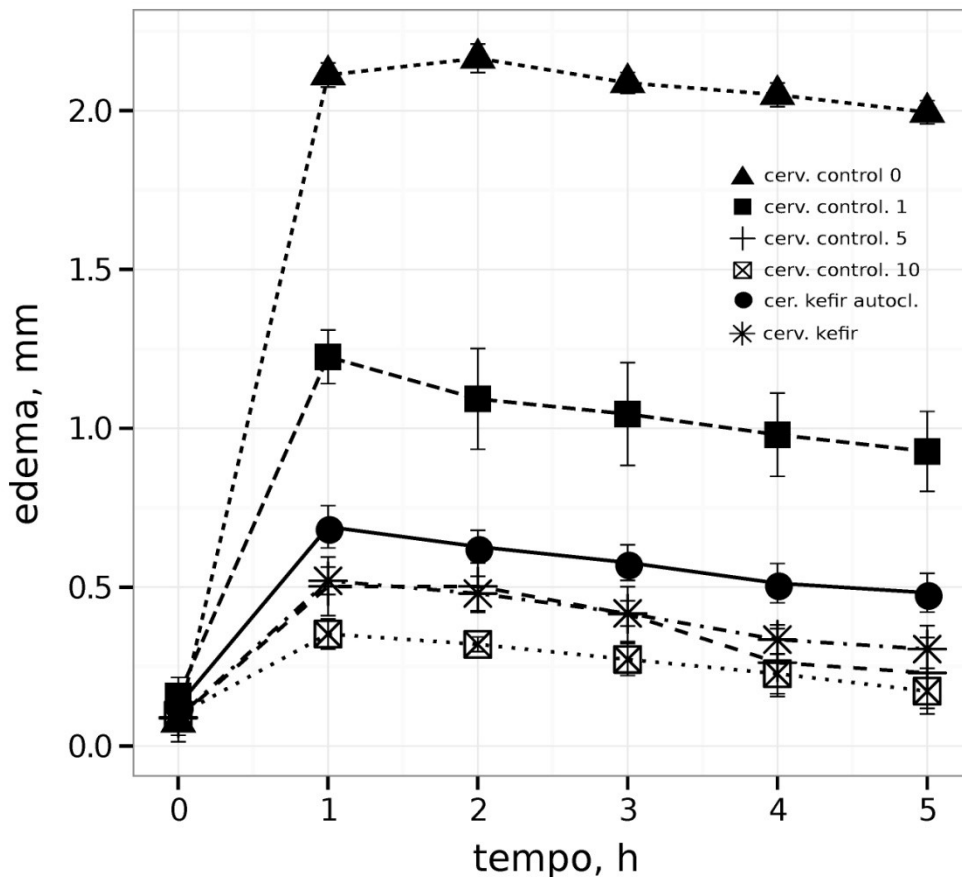


Figura 12- Medida das patas (mm) dos animais tratados com as amostras controle e das cervejas. O edema de pata foi induzido por injeção subplantar de 100 $\mu$ L a 1% de histamina diluída em água destilada. Os dados estão expressos por média  $\pm$  DP (N=8/grupo), seguindo one-way ANOVA e teste post-hoc de Tukey. As concentrações do quefirano foram Cb0–cerveja controle; cb1, 5e 10– cervejas controle modificadas com 1, 5 e 10 mg/mL de quefirano, respectivamente; autocl. Kb –cerveja de quefir autoclavada; kb – cerveja de quefir.

Fonte: Do autor

A figura 13 apresenta o percentual das áreas de lesões gástricas nos animais tratados com etanol absoluto e, previamente via tratados via i.p. com indometacina (10 mg/kg). Pode-se observar que os animais tratados com as cervejas apresentaram uma capacidade inibitória sobre a indução das úlceras quando comparada ao grupo controle. Embora menor ação inibitória quando comparada aos animais induzidos à úlcera sem administração prévia de indometacina (Figura 6).

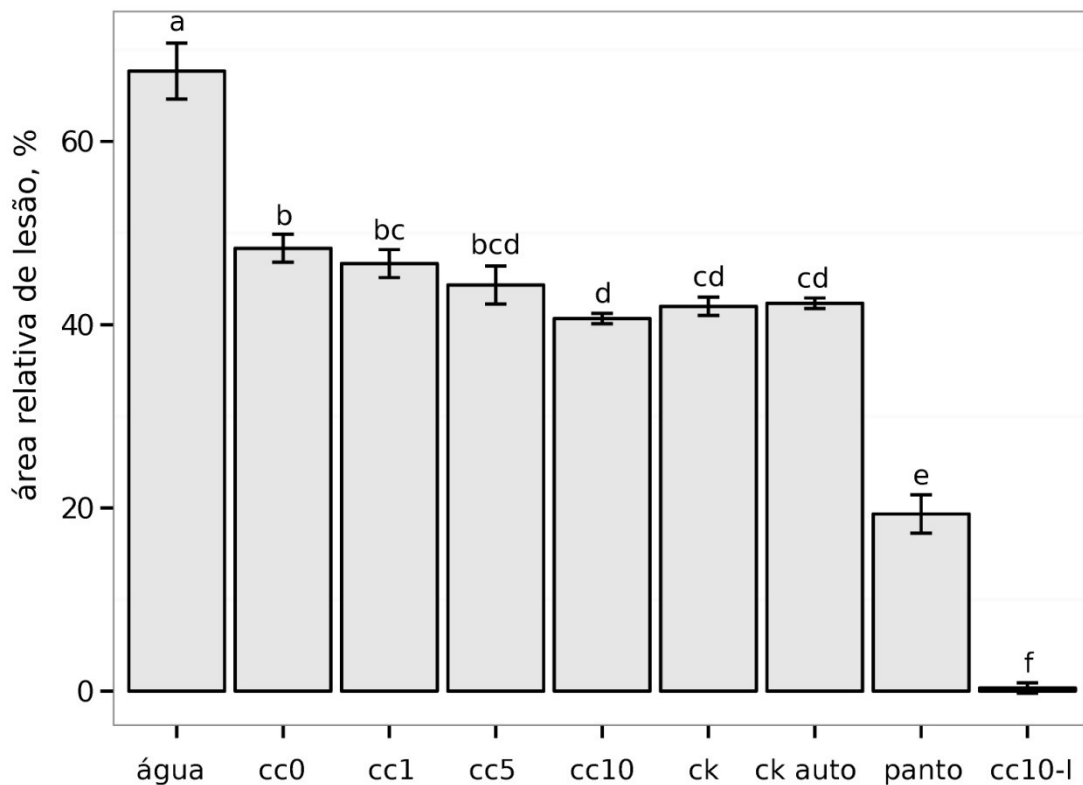


Figura 13- Percentual de áreas de lesões ulcerativas nos estômagos dos animais tratados com etanol absoluto e, previamente tratados via i.p. com indometacina (10 mg/kg). Os dados são apresentados como média  $\pm$  DP (N=8/grupo), seguindo ANOVA de um critério e teste de Tukey. As letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $P < 0.05$ ). Nota: panto – 0.1 mg/mL pantoprazol (controle positivo).

Fonte: Do autor

É interessante notar que os estômagos dos animais que receberam a cerveja controle modificada com 10 mg/mL de quefirano, sem o tratamento prévio com indometacina (Figura 13, grupo Cb10-l) não apresentaram, virtualmente, lesões gástricas induzidas por etanol, apesar de exalarem um forte aroma de álcool (Figura 14).

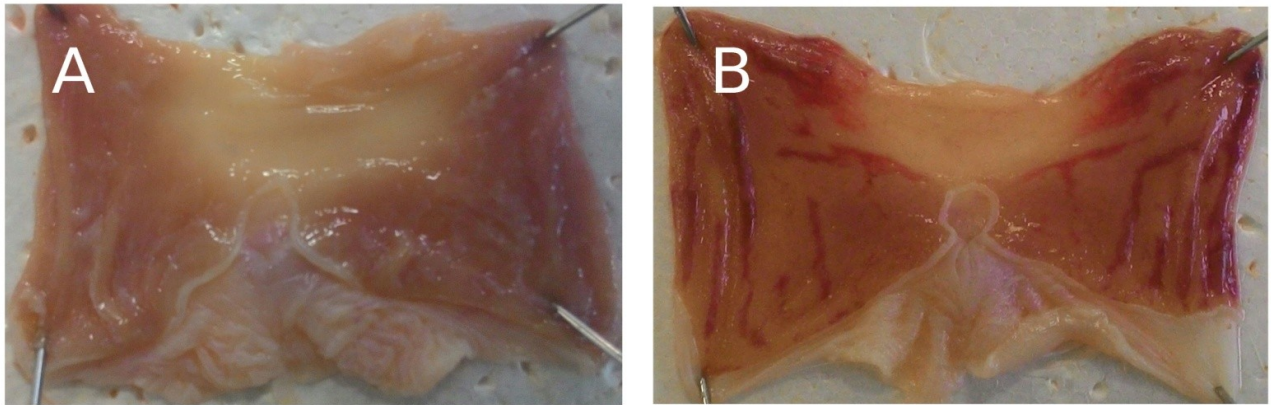


Figura 14- Animais tratados com a cerveja controle modificada com 10 mg/mL de quefirano, sem o tratamento prévio com indometacina (A) e com tratamento prévio (B).  
Fonte: Do autor

### 8.9 Conteúdo gástrico de polissacarídios

O material retirado dos estômagos dos animais foi coletado após a indução de úlcera por etanol e testado para açúcares redutores após hidrólise ácida (Tabela 3).

Foram encontrados valores de absorvância significativos nos grupos tratados com as cervejas de quefir, cerveja de quefir autoclavada, e cervejas modificadas com quefirano, quando comparados aos grupos de cerveja controle e pantoprazol. Os resultados sugerem a presença de polímeros de carboidratos na cavidade gástrica dos animais tratados com as cervejas citadas acima.

Tabela 3- Avaliação dos polímeros de carboidratos adsorvidos na cavidade gástrica dos animais tratados seguidos por indução de úlcera por etanol. Os valores são expressos em unidades de absorbância pela diferença do material antes e após a hidrólise com HCL seguida pela determinação de açúcares redutores com 3,5-ácido dinitrossalicílico (Borgström et al., 1957).

Grupos	$\Delta A_{540}$
Pantoprazol	0,009 $\pm$ 0,004
Cb0	0,026 $\pm$ 0,013
Cb1	0,101 $\pm$ 0,032
Cb5	0,036 $\pm$ 0,018
Cb10	0,080 $\pm$ 0,012
autocl. kb	0,039 $\pm$ 0,015
Kb	0,129 $\pm$ 0,032

Nota: Cb0- cerveja controle, Cb1-cerveja controle com 1 mg/mL de quefirano, Cb5- cerveja controle com 5 mg/mL de quefirano, Cb10= cerveja controle com 10 mg/mL de quefirano, autocl. kb- cerveja de quefir autoclavada, Kb- cerveja de quefir  
 Fonte: Do autor

## 9 DISCUSSÃO

Há uma longa tradição no consumo de quefir relacionada a muitos benefícios à saúde, incluindo as atividades anti-inflamatórias e anti-oxidantes (FARNWORTH; MAINVILLE, 2003). Seus efeitos são associados às funções probióticas de bactérias lácticas, leveduras e atividades dos exopolissacarídeos e peptídeos liberados durante a produção do quefir (EBNER *et al.*, 2015; FARNWORTH, 2006;). Por outro lado, o consumo de cerveja pode contribuir para a ingestão de polifenóis e outros antioxidantes (FERK *et al.*, 2010), aumentando os benefícios à saúde.

Neste sentido, o objetivo desse estudo foi avaliar possíveis atividades probióticas e prebióticas de uma cerveja fermentada por grãos de quefir, como agente protetor contra os danos induzidos por agentes inflamatórios como carragenina e histamina (edema de pata) e intoxicantes como a administração de etanol (úlcera gástrica).

Comercialmente, as cervejas são geralmente produzidas por fermentação única com *Saccharomyces cerevisiae*, embora uma segunda fermentação possa ser realizada com outras espécies objetivando trazer aroma e sabor distintos (e.g. *Lactobacillus* ou *Brettanomyces* refermentadas na garrafa e cervejas fermentadas por leveduras selvagens, como nas cervejas do tipo “Lambic”). A esse respeito, esse estudo é o primeiro a investigar os efeitos gastroprotetores e anti-inflamatórios de uma cerveja produzida por um grupo probiótico como único biofermentador.

O tratamento com a cerveja de quefir apresentou uma redução maior no peso dos animais quando comparado à cerveja controle e a suspensão de quefir ( $P < 0,001$ ). Recentemente Fathi *et al.*, (2015), observaram uma redução no peso de mulheres com sobrepeso após a ingestão de quefir cultivado no leite. Em adição, uma significativa redução do peso foi observada em ratos tratados com xantohumulona, um composto presente no lúpulo (Legette *et al.*, 2013). Assim, os resultados na redução de peso dos animais tratados com a cerveja de quefir podem ser explicados pela associação de polifenóis presentes nas amostras (Tabela 1), bem como pela presença de pré e probióticos do quefir, uma vez que não foram encontrados polifenóis na suspensão de quefir.

Altas concentrações de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST) juntamente ao aumento das concentrações lipídicas no plasma são favorecedoras do comprometimento hepático causado por ingestão crônica de etanol. Nesse estudo, as amostras de cerveja aparentemente não afetaram os níveis

de transaminases, frações lipídicas e o perfil redox no soro dos animais (Tabela 2), não alterando o perfil metabólico dos animais quando comparado ao grupo controle.

Não obstante, as respostas anti-inflamatórias observadas após a administração das cervejas de quefir e controle foram significativamente diferentes (Figura 7). Ambas as cervejas apresentaram atividades anti-inflamatórias contra o insulto por carragenina e, provavelmente, com efeitos relacionados ao conteúdo de polifenóis (CHIVA-BLANCH *et al.*, 2015). Contudo, a cerveja de quefir apresentou uma significativa redução do edema de pata induzido por carragenina quando comparado ao grupo de cerveja controle ( $p < 0,05$ ) e uma pronunciada redução no edema de pata induzido por histamina, de maneira ainda mais eficiente comparado ao grupo de cerveja controle (Figura 9,  $p < 0,001$ ).

Esses resultados estão de acordo com estudos prévios sobre atividade anti-inflamatória de quefir e seu extrato (DINIZ *et al.*, 2003; RODRIGUES, *et al.*, 2005), os quais revelaram uma redução no edema de pata induzido por carragenina, dextrana e histamina. O quefirano reduziu em  $34 \pm 2$  % a formação de tecido granulomatoso em ratos após 2 horas da indução da injúria, e tratado por 7 dias (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes em indivíduos que consomem cerveja moderadamente estão relacionados ao conteúdo fenólico da bebida (KARATZI *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos como hidroxifenilacético, ácidos cumárico, ferúlico, vanílico e caféico, são conhecidos por apresentar uma concentração ótima após 30 minutos da ingestão de cerveja em indivíduos saudáveis (NARDINI *et al.*, 2006).

O conteúdo de polifenóis mostrado em ambas as cervejas, quefir e controle, foram similares aos valores reportados por Zhao *et al.*, (2010) e Quifer-Rada *et al.*, (2015). Entretanto, o quefir é conhecido por apresentar atividade antioxidante (GÜVEN; GÜLMEZ, 2003), o que poderia ter contribuído para os efeitos anti-inflamatórios promovidos pela cerveja de quefir (Figuras 7 e 8).

Os polifenóis presentes no malte de cevada utilizado na produção de cervejas possuem propriedades antioxidantes descritas na literatura (PINTO *et al.*, 2012; KARATZI *et al.*, 2013), incluindo mecanismos de ação, mudanças na capacidade antioxidante total, “scavenging”, prevenção da ligação de metais catalisadores de transição. Esses mecanismos são associados a melhorias na condição de diversas doenças, como câncer, problemas cardiovasculares, hepáticos (KARATZI *et al.*,

2013; PINTO *et al.*, 2012; VALKO *et al.*, 2006) e inflamações gastrointestinais (FAHMY; ISMAIL, 2015).

O modelo de inflamação induzida por carragenina, um polissacarídeo sulfatado presente em muitas espécies de algas vermelhas da ordem Gigartinales, tornou-se o mais usado e permitiu a determinação da função de vários mediadores relevantes, além da identificação de drogas potencialmente anti-inflamatórias. Esse modelo foi originalmente proposto para indução do edema de pata em ratos (WINTER *et al.*, 1962).

A inflamação é um processo bioquímico e celular que envolve o plasma, os vasos sanguíneos, as células circulantes, e os constituintes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo vascularizado. Esse processo tem como objetivo destruir ou isolar o agente lesivo induzindo uma série de eventos que favorecem a cicatrização e a reconstituição do tecido lesado. Assim, a inflamação é uma resposta protetora capaz de aliviar o organismo da causa inicial da lesão celular e das consequências dessa lesão (COLLINS, 1999; ROTE, 1998).

A fase inicial da inflamação (0-1 hora) no edema de pata induzido por carragenina é atribuída à liberação de histamina, serotonina e bradicininas, seguindo-se a fase tardia (2-6 horas), que é sustentada pela liberação de prostaglandinas por indução de COX-2 no tecido (WINTER *et al.*, 1962). A histamina, é um mediador de origem celular, uma amina formada a partir da histidina. Seu papel resulta em alterações rápidas, uma vez que está presente nos grânulos, é liberada por exocitose durante o processo inflamatório. Neste sentido, é considerado o principal mediador responsável pelo aumento da permeabilidade vascular na fase inicial (BOYCE, 2005; COLLINS, 1999). Neste sentido, os dados apresentados nas figuras 8 e 9, sugerem uma resposta anti-inflamatória contra histamina e prostaglandinas, respectivamente, nos animais tratados com suspensão de quefir, cerveja de quefir e cerveja controle modificada com quefirano.

A úlcera gástrica induzida por etanol é, geralmente, acompanhada por alterações na estrutura e função vascular. O etanol aumenta o comprometimento gástrico por causar lesões hemorrágicas, edema de mucosa e erosões (SAGRADAS *et al.*, 2015). Os efeitos agudos são atribuídos à perda do muco protetor, precipitação de proteínas citoplasmáticas das células superficiais da mucosa gástrica, liberação de mediadores vasoativos como histamina e leucotrienos e liberação de inibidores das prostaglandinas que favorecem a secreção de muco gástrico (PESKAR *et al.*, 1986).

Os danos na mucosa são os degraus iniciais no desenvolvimento da úlcera e estão correlacionados ao estresse oxidativo devido a geração de espécies reativas de oxigênio e hipersecreção de HCl via ação da bomba de H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (SRIKANTA *et al.*, 2010). A esse respeito, o quefir apresentou um papel antioxidante juntamente com uma atividade de sequestro de radicais livres, favorecendo a normalização dos níveis de MDA, GSH e GSH-Px, resultando na regulação de MMP-2 e MMP-9, bem como uma proteção do DNA contra danos oxidativos (FAHMY; ISMAIL, 2015). A secreção de ácido gástrico estimulada por etanol parece não estar relacionada à gastrina circulante, mas sim a um mecanismo de regulação de ácido envolvendo histamina e acetilcolina (MATSUNO *et al.*, 2000). O efeito antiulcerogênico do quefir foi recentemente observado em ratos que receberam preparações de leite fermentado com quefir (Fahmy e Ismail, 2015). Esse efeito foi relacionado a uma diminuição na secreção de HCL por inibição da H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase e estimulação da secreção de muco gástrico.

O efeito antiulcerogênico também pode ter ocorrido devido à presença de outros constituintes encontrados nas cervejas artesanais, como antioxidantes e polifenóis, os quais podem ter atuado benéficamente sobre a erosão e ulceração. A respeito disso, os beta-glucanos, normalmente presentes na cerveja são conhecidos por melhorar a tolerância a estresse gástrico e oferecem proteção contra ambientes adversos como baixo pH, etanol e ação inibitória na microflora intestinal pelos ácidos do lúpulo (Yeo; Liu, 2014). Assim, os resultados apresentados no experimento de inflamação induzido por histamina, revelaram uma diminuição da inflamação nos animais tratados com cerveja de quefir quando comparada ao grupo da cerveja controle e outros tratamentos (Figura 9). Os dados enfatizam a participação da histamina na úlcera gástrica induzida por etanol nesse trabalho (Figuras 9 e 12), e sugerem uma proteção adicional da mucosa gástrica através da inibição da histamina promovida pela administração de cerveja de quefir.

Complementarmente à atividade antiulcerogênica (Figura 6), uma única dose de ambas as cervejas e da suspensão de quefir, administradas aos animais, foi capazes de reduzir as lesões gástricas induzidas pelo etanol. Além disso, os grupos tratados com a suspensão de quefir (Figura 11-4) e a cerveja de quefir (Figuras 11-5 e 11-6) apresentaram uma camada de cobertura na superfície epitelial, o que não foi visualizado na cerveja controle.

Magalhães *et al.*, (2011), encontraram um material similar aos achados de microscopia eletrônica de varredura relacionados a cobertura de superfície epitelial

dos animais tratados com a cerveja de quefir, bem como a suspensão de quefir. Os autores identificaram a porção superior dos grãos de quefir, por microscopia de varredura, como sendo o polissacarídeo quefirano (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

Assim, como a camada de cobertura emergiu apenas dos grupos tratados oralmente com a cerveja e a suspensão de quefir, podemos especular um papel funcional do material fibrilar de quefir, relacionado às atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas apresentadas neste trabalho (Figura 11).

De fato, o consórcio probiótico de quefir apresentou atividade anti-inflamatória e analgésica em modelo de contorção induzida por ácido acético (DINIZ *et al.*, 2003), reduzindo as contorções em  $28 \pm 2$  % ( $P < 0,05$ ). Em outro trabalho Cardoso *et al.*, (2003), reportaram que a suspensão de quefir foi capaz de melhorar em  $34,6 \pm 2,4$  % a motilidade intestinal em ratos comparada a água destilada. Esses achados sugerem que a suspensão de quefir poderia ser considerada para o tratamento de lesões gástricas e transtornos intestinais.

Considerando que os níveis de polifenóis foram similares em ambas as cervejas ao longo de quatro meses (Tabela 1), pode-se hipotetizar que o tratamento com a cerveja de quefir teria resultado por associação de constituintes pré/probióticos que originaram-se durante a produção da cerveja. Além da contribuição probiótica, esses achados poderiam favorecer o tempo de prateleira de cerveja não pasteurizada.

Tradicionalmente, o quefir é considerado bom para a saúde e muitos estudos sugerem que os grãos de quefir podem estimular a imunidade, produzir metabólitos como ácidos graxos de cadeia curta e bacteriocinas, melhorar a intolerância a lactose, melhorando o crescimento de bifidobactérias no intestino, reduzir o colesterol plasmático, possui propriedades cicatrizantes, antimicrobianas, anticarcinogênicas e anti-inflamatórias, entre outras (JOHN; DEESEENTHUM, 2015).

Apesar do mecanismo preciso que envolve as propriedades benéficas do quefir não estar ainda bem elucidado, Powell, (2006) reportou que o quefir cultivado no leite produz peptídeos e prebióticos, tais como lactacinas, bacteriocinas e quefirano. Contudo, o quefirano, um exopolissacarídeo solúvel em água geralmente produzido por *Lactobacillus kefiranofaciens* no leite ou *Lactobacillus hilgardii* na água, é o único prebiótico reportado em suspensão de quefir, como nesse estudo. Moreira *et al.*, (2008a), estudou um oligossacarídeo de 3,5 kDa isolado de grãos de quefir cultivados na água, composto por glicose (40 %), raminose (24 %), galactose

(10 %) e arabinose (26 %). Similarmente aos efeitos anti-inflamatórios observados nesse estudo, Moreira *et al.*, (2008b), reportou uma diminuição de  $30 \pm 4$  % ( $P < 0,001$ ) no edema de pata induzido por carragenina na terceira hora em ratos tratados com o oligossacarídeo.

Com o intuito de se analisar um possível bioativo presente na cerveja de quefir, foi realizada a purificação do polímero de carboidrato reconhecidamente bioativo, a partir dos grãos de quefir utilizados na produção da cerveja, seguindo-se a inclusão do quefirano na cerveja controle em diferentes concentrações para testar as atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas (Figuras 12 e 13).

A melhor resposta antiedematogênica apresentada pelas cervejas modificadas com quefirano (Figura 12) sugere seu papel significativo na atividade anti-inflamatória com a cerveja de quefir (Figura 12). Esse achado é corroborado pela atividade inibitória encontrada nos animais tratados com a cerveja de quefir autoclavada (Figuras 12 e 13). A autoclavagem é a forma mais rápida e confiável de esterilização, onde os microrganismos são mortos e as proteínas são desnaturadas pelo calor. Ocorre a quebra das cadeias de DNA e a perda da integridade funcional de lipídeos e membranas celulares.

Não obstante, a literatura apresenta exemplos de relativa preservação de estruturas de carboidratos sob autoclavagem, sendo um processo usual para esterilizar quitosana e outros carboidratos (JUMAA; MULLER, 1999). Assim, podemos especular que a principal fração molecular da cerveja de quefir relacionada aos efeitos benéficos encontrados nesse estudo, poderia ter sido o quefirano presente na amostra de cerveja autoclavada.

Como o quefirano foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por histamina, as cervejas controle modificadas foram testadas para analisar uma plausível atividade antiulcerogênica induzida por etanol juntamente com o pré-tratamento intraperitoneal de indometacina (Figura 13). Um possível mecanismo antiulcerogênico foi testado para a cerveja de quefir, relacionado à regulação de prostaglandinas. As amostras derivadas do quefir (cerveja controle modificada, cervejas de quefir e autoclavada) diminuíram as áreas de lesões gástricas induzidas por etanol, apesar de mostrarem menor redução quando comparadas às respostas observadas na indução de úlcera por etanol sem tratamento prévio com indometacina (Figuras 6 e 13).

De fato, as áreas gástricas de lesões relativas nos animais que receberam ou não tratamento prévio com indometacina (Figuras 6 e 13), foram diferentes entre os

grupos tratados com as cervejas controle e quefir (ANOVA de dois critérios,  $p < 0,001$ ).

Adicionalmente, foi feita uma estimativa do nível de polímeros de carboidratos, obtidos a partir do muco retirado da parede gástrica dos animais, após hidrólise ácida do material recolhido, seguindo-se reação com 3,5-ácido dinitrossalicílico (Tabela 3). Os resultados apresentaram um significativo conteúdo de polímeros no estômago dos animais tratados com as amostras derivadas do quefir quando comparado àqueles que receberam cerveja controle ou pantoprazol, embora não correlacionados linearmente com o teor de quefirano adicionado às cervejas controle (Tabela 3).

A indometacina é conhecida por inibir a cicloxigenase (COX-1 e COX-2), responsáveis pela síntese de prostaglandinas (Schmann; Switzerland, 1998), culminando em eventos que poderiam causar úlceras gástricas. A dose administrada nesse estudo (5 mg/kg), contudo, é insuficiente para causar sozinha, lesões ulcerosas, mas aumenta a predisposição a úlceras induzidas por etanol absoluto (KONTUREK; PAWLYK, 1986,).

Quantitativamente, a forma predominante de prostaglandinas na mucosa gástrica de humanos, felinos e caninos é a PGE2 (BENNETT *et al.*, 1968), embora seja PGI2 na mucosa de ratos (AHLQUIST *et al.*, 1982).

Sob essas condições, as amostras derivadas do quefir (cerveja de quefir autoclavada, cerveja de quefir e cervejas controle modificadas), apresentaram uma capacidade inibitória menor em relação ao grupo que não recebeu indometacina (Figuras 6 e 13). Assim, o mecanismo de ação antiulcerogênico promovido pelas cervejas derivadas de quefir ou quefirano, poderia estar associado a ação das prostaglandinas e/ou a uma possível resposta inibitória sobre a ação da histamina nas células parietais do estômago, inibindo a liberação de  $H^+$  para o meio gástrico.

À luz dos benefícios que têm sido associados ao consumo de bebidas derivadas de quefir, juntamente com os compostos fenólicos presentes nas cervejas, e a observação de um efeito sinérgico entre o quefir e a cerveja, é encorajador que se investigue outros potenciais benefícios promovidos por cervejas probióticas. Com esse objetivo, outras colônias simbióticas de bactérias e leveduras presentes em bebidas indígenas dos cinco continentes, tais como kombucha, boza, koumiss e borde, por exemplo, poderiam ser utilizadas para a produção de novas cervejas probióticas (SCHNEEDORF, 2014).

Entretanto, comparada a diversas bebidas probióticas, o quefir apresenta aparente vantagem pelo seu baixo custo e pela facilidade na aquisição de grãos iniciadores, manutenção simples e sem pressupostos assépticos para seu crescimento, alta taxa de produção de biomassa, e a presença comum de *Sacharomyces cerevisiae* em amostras variadas, além do amplo espectro de propriedades probióticas já identificado.

## 10 CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi produzida uma cerveja fermentada por grãos de quefir que apresentou atividade anti-inflamatória e antiulcerogênia superior àquelas observadas em seus constituintes isoladamente.

Os resultados sugerem um efeito sinérgico da cerveja de quefir, envolvendo o conteúdo de polifenóis dos maltes e lúpulos da cerveja juntamente às propriedades pré e probióticas inerentes do quefir.

Levando em consideração o aumento da popularidade dos probióticos, essa é a primeira vez que foi produzida e reportada na literatura uma “Specilaty beer”, um estilo de cerveja determinado pelo BJCP (Beer Judge Certification Program), contendo probióticos como única fonte de fermentação, e mesmo por um bioativo isolado de sua fonte original.

Os resultados apresentados nesse trabalho foram publicados pelo periódico *Journal of Functional Foods* (Apêndice 1).

## **11 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Para a complementação dos resultados obtidos nesse trabalho, faz-se necessário a realização de outros experimentos com os objetivos de investigar:

- a) Toxicidade da cerveja de quefir;
- b) Potencial para reduzir o apetite;
- c) Composição nutricional da cerveja de quefir;
- d) Caracterização microbiológica e produção de quefirano;
- e) Testes sensoriais;
- f) Vida de prateleira.

## REFERÊNCIAS

AHLQUIST, *et al.* Prostaglandin generation from gastroduodenal mucosa: Regional and species differences. **Prostaglandins** v. 24, p. 115-125, 1982.

AHMED, Z., *et al.* A. Kefir and health: a contemporary perspective. Critical reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 422-434, 2013.

ALBRECHT WENDEL. Meth. **Enzymol.** v. 77, p. 325, 1981.

AMITAVA DASGUPTA. Alcoholic Beverages: Chapter 14 –**Antioxidant and Other Health Benefits of Moderate Consumption**. Available online 11 February, 2014.

AQUARONE, E.; LIMA,, U. A.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. Série biotecnologia. 2ª ed. Editora Edgard Blüch Ltd, v. 5, 1983.

ASSADI, M. M.; POURAHMAD, R.; MOAZAMI, N. Use of isolated kefir starter cultures in kefir production. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 16, p. 541-543, 2000.

BAMFORTH, C. W. Beer: Tap into the Art and Science of Brewing, 2nd ed. New York: **Oxford University Press**. 2003.

BAMFORTH, C. W. Food, fermentation and micro-organisms. **Blackwell Science Ltda** Blackwell Publishing company. 2005.

BAXTER, E. DENISE, AND PAUL S. HUGHES. Beer: Quality, safety and nutritional aspects. Vol. 28. **Royal Society of Chemistry**. 2001.

BENNETT, J.G.; MURRAY; J.H. WYLLIE. Occurrence of prostaglandin e2 in the human stomach, and a study of its effects on human isolated **gastric** muscle. **British Journal of Pharmacological Chemotherapy**. v. 32, p. 339-349, 1968.

BENTO, C.V.; CARVALHO, G.B.M.; SILVA, J.B.A.; Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. Universidade de São Paulo (USP) e Escola de Engenharia de Lorena (EEL), departamentos de Biotecnologia. **Revista Analytica** Outubro/Novembro de 2006.

BEUTLER, E. Catalase in Red Cell metabolism: **A manual of Biochemical methods**. 2 ed. Grune & Stratton, New York. p. 89-90, 1975.

BOKULICH, N.A.; BAMFORTH, C.W.; MILLS, D.A. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. **PLoS One**. v. 7, p.35507, 2012.

BOYCE, J. Eicosanoid Mediators of Mast Cells: Receptors, Regulation of Synthesis, and Pathobiologic Implications. **Chemical Immunology and Allergy**. v. 87, p. 59-79, 2005.

BORGSTRÖM, B.; DAHLQVIST, A.; LUNDH, G.; SJÖVALL, J. Studies of intestinal digestion and absorption in the human. **Journal of Clinical Investigation**. v. 36, n. 10, p. 1521, 1957.

BRIEN, S.E., *et al.* Effect of alcohol consumption on biological markers associated with risk of coronary heart disease: systematic review and meta-analysis of interventional studies. **BMJ**. v. 342. d636, 2011.

BRODERICK, H. M., *et al.* El cervecero en la practica: Um manual para la industria cervecera. 2 ed. 1977.

CARDOSO, L. G., *et al.* Evaluation of a soured kefir on intestinal motility of rats. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. v. 1, n. 3, p. 107-109, 2003.

CHEN, T. H., *et al.* Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of Dairy Science**. v. 92, p. 3002-3013, 2009.

CHEN, ZHINA, *et al.* Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. **International Dairy Journal**. v. 43, p. 15-21, 2015.

CHIVA-BLANCH, G., *et al.* Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 25, n. 1, p. 36-45, 2015.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T (Eds.). **Robbins pathologic basis of disease**. 6 th ed. Philadelphia: Saunders,. cap. 3, p. 50-88, 1999.

COSTANZO, S., *et al.* Wine, beer or spirit drinking in relation to fatal and non-fatal cardiovascular events: a meta-analysis. **Eur J Epidemiol.** v. 26, n. 11, p. 833-50, 2011.

COUTINHO, C. A. T., A Cerveja e sua História. 2008. Disponível em <<http://www.cervesia.com.br/história-da-cerveja>>. Acesso em 02/05/2013.

DE KEUKELEIRE D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quimica Nova.** v. 23, p. 108–112, 2000.

DE MORENO, *et al.* Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. **Journal of Dairy Science.** v. 90, p. 1920–1928, 2007.

DE PAULA SANTOS, SÉRGIO. Os primórdios da cerveja no Brasil. **Atelie Editorial.** 2003.

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

DILLEHAY, D.L., *et al.* Dietary sphingomyelin inhibits 1,2-dimethylhydrazine–induced colon cancer in CF1 mice. **Journal of Nutrition.** v.124, p.v615-20, 1994.

DINIZ, R.O., *et al.* Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** p. 19-20, 2003.

EBNER, J., *et al.* Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. **Journal of proteomics.** v. 117, p. 41-57, 2015.

FAHMY, H. A.; ISMAIL, A. F. Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology.** v. 144, 85-93, 2015.

FARNWORTH, E.R.; MAINVILLE I. Kefir: a fermented milk product. In: Farnworth ER, editor. Handbook of Fermented Functional Foods. Florida: CRC Press. p. 77-112, 2003.

FATHI, Y., *et al.* Kefir drink leads to a similar weight loss, compared with milk, in a dairy-rich non-energy-restricted diet in overweight or obese premenopausal women: a randomized controlled trial. **European Journal of Nutrition**. p. 1-10, 2015.

FERK, F., *et al.* Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methyl-imidazo [4, 5-f] quinoline (IQ). **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v. 691, n. 1, p. 17-22, 2010.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R.. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **Eur Food Res Technol**. v. 211, p. 56–64, 2000.

FUMI, MARIA DARIA, ET AL. "Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers." *Journal of Food Composition and Analysis* 24.4: 568-573, 2011.

FURUKAWA N, MATSUOKA A, TAKAHASHI T, YAMANAKA Y. Anti-metastatic effect of kefir grain components on Lewis lung carcinoma and highly metastatic B16 melanoma in mice. **J Agric Sci Tokyo Nogyo Daigaku**. v. 45, p. 62–70, 2000.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Microbial interactions in kefir: A natural probiotic drink. In F. Mozzi, R.; Raya; M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria* (pp. 327–340). USA: **Blackwell Publishing Inc**, 2010.

GHASEMLOU, M., *et al.* Structural investigation and response surface optimisation for improvement of kefir production yield from a low-cost culture medium. **Food Chemistry**. v. 133, n. 2, p. 383-389, 2012.

GOLOWCZYC, M. A., *et al.* Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**. V. 118, p. 264–273, 2007.

GRABENWASSER, Como Estimar o Teor Alcoólico Usando Densímetro, disponível em: <<http://www.grabenwasser.blogspot.com.br/>>, Acesso em: 12 de maio de 2012.

GRØNNEVIK, H.; FALSTAD, M.; NARVHUS, J. A. Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. **International Dairy Journal**. v. 21, n. 9, p. 601–606, 2011.

GORINSTEIN; S.; CASPI, A.; ZEMSER, M.; TRAKHTENBERG, S. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. **Nutr Res.** v. 20, p. 131-9, 2000.

GOUPY, P., *et al.* Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. **Journal of the Science of Food and Agriculture.** v. 79, 1625 e 1634, 1999.

GULITZ, A., *et al.* The microbial diversity of water kefir, **International Journal of Food Microbiology.** v. 151, p. 284-288, 2011.

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(8), p. 412-416, 2003.

GUZEL-SEYDIM, Z. B., *et al.* Review: Functional properties of kefir. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** v. 51, p. 261–268, 2011.

HARDWICK, W. A. **Handbook of brewing.** New York: Dekker. 713P, 1995.

Hernanz, D., *et al.* Hydroxycinnamic acids and ferulic acid dehydrodimers in barley and processed barley. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v. 49, p. 4884-4888, 2001.

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

HLATKY, M. *Bier brauen Fuer Jedermann* . Leopold Stocker. Verlag. Germany, 2007.

HOLSAPPLE, M. P.; SCHNUR, M.; YIM, G. K. Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine. **Inflammation Research.** v. 10, n. 4, p.368-373, 1980.

HORNSEY I.S. *A History of Beer and Brewing.* **Royal Society of Chemistry.** Cambridge, UK 2003.

HUTZLER, M., *et al.* Beer Spoiling Microorganisms- A Current Overview. Fachverslag Hans Carl GmbH, **Brauwelt International I**, p. 23-25, 2013.

IRAPORDA, C., *et al.* The role of lactate on the immunomodulatory properties of the nonbacterial fraction of kefir. **Food Research International** v.62, p.247-253, 2014.

JACKSON, M. **Cerveja**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Zahar. 2007.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 2005.

JOHN, S. M.; DEESEENTHUM, S. Properties and benefits of kefir-A review. Songklanakarin **Journal of Science & Technology**. v. 37(3), p. 275-282, 2015.

JOOSTEN, M. M. Moderate alcohol consumption, adiponectin, inflammation and type 2. Diabetes risk. Prospective cohort studies and randomized crossover trials. Thesis Wageningen University, Wageningen, 2010.

JUMAA, M.; MÜLLER, B. W. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsions and their stability during the autoclaving process. **International journal of pharmaceutics**. v. 183(2), p. 175-184, 1999.

KARATZI, *et al.* Acute effects of beer on endothelial function and hemodynamics: A single-blind, crossover study in healthy volunteers. **Nutrition**. v. 29.9, p. 1122-1126, 2013.

KATJA ZAJŠEK; ANDREJA GORŠEK. Effect of natural starter culture activity on ethanol content in fermented dairy products. **International Journal of Dairy Technology**. v. 63, p. 113-118, 2010.

KLING, K., Bier SelbstGebraut. Die Werkstatt. Verlag. Germany, 2006.

KETTLE, A.J; WINTERBOURN, C.C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymol**. v. 233, p. 502-512, 1994.

KNORR F. UBER. Polyphenole im Brauprozess. Z Lebens Unters-Forsch, 166, 228–233, 1978.

KONDO, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. **Biofactors**. v. 22(1-4), p. 303-10, 2004.

KONTUREK, S. J.; PAWLIK, W. Physiology and pharmacology of prostaglandins. **Digestive diseases and sciences**. v. 31, n. 2, p. 6S-19S, 1986.

- KOURKOUTAS, Y. An economic evaluation of freeze-dried kefir starter culture production using whey. **Journal of Dairy Science**. v. 90, p. 2175-2180, 2007.
- KWAK, H. S.; PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. **Journal of Dairy Science**. .v. 79, p. 937-942, 1996.
- LEE, MEE-YOUNG, ET AL. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology**. v. 8, p. 647-654, 2007.
- LEGETTE, L. L. Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. **Phytochemistry**. v. 91, p. 236-241, 2013 .
- LEITAO, C., *et al.* Fate of polyphenols and antioxidant activity of barley throughout malting and brewing. **Journal of Cereal Science**. v. 55.3, p. 318-322, 2012.
- LIU, J. Hypocholesterolemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. **British Journal of Nutrition**. v. 95, p. 939-946, 2006.
- LIU, J.; WANG, S.; LIN, Y.; LIN, C. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. **Nutrition and Cancer**. v.44, p. 182-187, 2002.
- Liu, Q.; Yao, H. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry**. v. 102, p. 732-737, 2007.
- LONDERO, A. Inhibitory activity of cheese whey fermented with kefir grains. **Journal of Food Protection**. v. 74, p. 94-100, 2011.
- LOPITZ-OTSOA, E., A. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. **Rev. Iberoam. Micol.** v. 23, p. 67-74, 2006.
- LUDWIG N. Abriss der Bierbrauerei. 7th ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag; 2004.
- LUGASI, A. Polyphenol content and antioxidant properties of beer. **Acta Alim.** v. 32, n.2, p. 181-192, 2003.
- MADIGAN, D.; MCMURROUGH, I.; SMYTH, M.R. Determination of proanthocyanidins and catechins in beer and barley by high-performance liquid chromatography with dual-electrode electro-chemical detection. **Analyst**. v. 119, p. 863-868, 1994.

MAEDA, H. Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **Biofactors**. v. 22, p. 197-200, 2004.

MAGALHÃES, K.T., *et al.* Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir, *World J. Microbiol. Biotechnol.* v. 26, p. 1241-1250, 2011.

MATSUNO, K.; SASAKI, N.; OKABE, S. Gastric acid secretion in dogs in response to combinations of beer, ethanol and peptone meal—the role of endogenous gastrin. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 14(s1), p. 109-115, 2000.

MCKENNA T. *Food of the Gods*, Bantam Books, New York, 1992.

MCMURROUGH, I; BAERT, T. Identification of proanthocyanidins in beer and their direct measurement with a dual electrode electrochemical detector. **J Inst Brew.** v. 100, p. 409-416, 1994.

MEDRANO, M., *et al.* Oral administration of kefir induces changes in the balance of immune cells in a murine model. **J. Agric. Food Chem.** v. 59, p. 5299-5304, 2011.

MIGUEL, M. G., *et al.* Profile of microbial communities present in tibico (sugary kefir) grains from different Brazilian States. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 27, n. 8, p. 1875-1884, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. SDA/MAA 54, 2001. Disponível em: <[www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis](http://www.sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis)> Acesso em: Agosto, 2013.

MIURA, Y., *et al.* Dietary isohumulones, the bitter components of beer, raise plasma HDL-cholesterol levels and reduce liver cholesterol and triacylglycerol contents similar to PPAR $\alpha$  activations in C57BL/6 mice. **Br J Nutr.** v. 93, n. 4, p. 559-67, 2005.

MORADO, R. *Larousse da Cerveja*. São Paulo. ed. **LAROUSSE**, 2009.

MOREIRA, M. E., *et al.* Anti-inflammatory activity of carbohydrate produced from aqueous fermentation of kefir. **Química Nova**. v. 31, n. 7, p. 1738-1742, 2008<sup>a</sup>.

MOREIRA, M. E. C., *et al.* Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. **Journal of medicinal food**. v. 11(2), p. 356-361, 2008<sup>b</sup>.

MORIMOTO, Y., *et al.* Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **The Japanese Journal of Pharmacology**. v. 57(4), p. 495-505, 1991.

MOTEDAYEN, A. A.; KHODAIYAN, F; SALEHI, E. A. Development and characterisation of composite films made of kefir and starch. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3, p. 1231-1238, 2013.

NARDINI, M., *et al.* Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 17, n. 1, p. 14-22, 2006.

NAMBOU, KOMI, *et al.* A novel approach of direct formulation of defined starter cultures for different kefir-like beverage production. **International Dairy Journal**. v. 34.2, p. 237-246, 2014.

NOGUEIRA, L. C., *et al.* The effect of different alcoholic beverages on blood alcohol levels, plasma insulin and plasma glucose in humans. **Food Chemistry**. v. 158, p. 527-533, 2014.

PELUSO, M.R., *et al.* Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes: structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). **Planta Med.** v. 76, n. 14, p. 1536-40, 2010.

PESKAR, B. M., *et al.* Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa. **Prostaglandins**. v. 31, n. 2, p. 283-293, 1986 .

PINTO, C., *et al.* Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, n. 10, p. 3405-3412, 2012.

PINTO, C., *et al.* Xanthohumol, a prenylated flavonoid from hops (*Humulus lupulus* L.), protects rat tissues against oxidative damage after acute ethanol administration. **Toxicology Reports 1**: p. 726-733, 2014.

POWELL, J. E. Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains. Doctoral dissertation, Stellenbosch: **University of Stellenbosch**, 2006.

PUERARI, C., *et al.* New cocoa pulp-based kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. **Food Research International**. v. 48.2, p. 634-640, 2012.

QINGMING, Y., *et al.* Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress in vitro and in vivo. **Food Chemistry**. v. 118, p. 84-89, 2010.

QUIFER-RADA, P., *et al.* A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC–ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**. v. 169, p. 336-343, 2015.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.

RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**. v. 13(5), p. 485-492, 2005.

ROMANIN, D., *et al.* Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **International Journal of Food Microbiology**. v. 140, p. 102-108, 2010.

ROMEO, J., *et al.* Effects of moderate beer consumption on blood lipid profile in healthy Spanish adults. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**. v. 18, n. 5, p. 365-72, 2008.

RONKSLEY, P.E., *et al.* Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. **BMJ**. v. 342, p. 671, 2011.

ROTE, N.S. Inflammation. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. **Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children**. 3 th ed. St. Louis: Mosby, cap. 7, p. 205-236, 1998.

SAGRADAS, J., *et al.* Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 173, p. 134-138, 2015.

SALGA, M. S., *et al.* Gastroprotective activity and mechanism of novel dichlorido-zinc (II)-4-(2-(5-methoxybenzylideneamino) ethyl) piperazin-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceratio. **Chemico-biological Interactions**. v. 195(2), p. 144-153, 2012.

SANTOS, A., *et al.* The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. **Syst Appl Microbiol.** v. 26, p. 434-7, 2003.

SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. **British Food Journal.** v. 110, p. 283-295, 2008.

SCHMANN, A.; SWITZERLAND, B. Mechanisms of ulcer healing and effects of nonsteroidal drugs. **Am J Med.** v. 104, p. 435-515, 1998.

SCHNEEDORF J.M. Oligosaccharides from ancient beverages fermented by symbiotic cultures. In: Lori S. Schweizer; Stanley J. Krebs. (Org.). **Oligosaccharides: food sources, biological roles and health implications.** Nova York: NOVA Science Publishers, Inc, 287-341, 2014.

SIMOVA, E., *et al.* Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 28, p. 1-6, 2002.

SHIMURA, M., *et al.* Isohumulones modulate blood lipid status through the activation of PPAR alpha. **Biochim Biophys Acta.** v. 5, p. 51-60, 2005.

SRIKANTA, B. M.; SATHISHA, U. V.; DHARMESH, S. M. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E 2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie.** v. 92, n. 2, p. 194-203, 2010.

TROMMER, M. W., Brasilien–Bier markt mit Potenzial. Brauwelt. Hans Carl Fachverlag. Germany, 2011.

TSOCHPE, E. C., A História, a Arte e a Tecnologia. **Microcervejarias e Cervejarias.** São Paulo. Ed. Aden, p. 223, 2001.

URDANETA, E., *et al.* Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. **Nutrition Research.** v. 27, p. 653-658, 2007.

VALLS-BELLES, V., *et al.* Effect of beer consumption on levels of complex I and complex IV liver and heart mitochondrial enzymes and coenzymes Q9 and Q10 in adriamycin-treated rats. **Eur J Nutr.** v. 49, p. 181-187, 2010.

VALKO, M., *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological Interactions.** v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN LANDSCHOOT, A., *et al.* Peculiarities of seven refermented Belgian strong ales and their corresponding industrial yeasts. **Cerevisia**. v. 30, p. 181-188, 2005.

VANDERHAEGEN, B., *et al.* Bioflavoring and beer refermentation. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 62, p. 140-150, 2003<sup>a</sup>.

VENTURINI, W.G.F. **Bebidas alcoólicas**: ciência e tecnologia. São Paulo, 2010.

VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Acidic beers: enjoyable reminiscences of the past. **Cerevisia**. v. 30, p. 38-47, 2005.

VINDEROLA, G., *et al.* Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**. v. 72, p. 195-202, 2005.

WIEME, ANNELEEN D., *et al.* Identification of Beer-Spoilage Bacteria using Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. **International Journal of Food Microbiology**, 2014.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**. v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

WITTHUHN, R.C.; T. SCHOEMAN, T.J.; BRITZ. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains, **Int. J. Dairy Technol.** p. 5733-37, 2004.

YAJIMA, H., *et al.* Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator – activated receptor  $\alpha$  and  $\gamma$  and reduce insulin resistance. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 33456-62, 2004.

YEO, H. Q.; LIU, S. Q. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. **International Journal of Food Science & Technology**. v. 49(7), p. 1607-1618, 2014.

YAKUGAKU, Z., *et al.* Pharmaceutical study on kefir - a fermented milk product in Caucasus. **Antitumor Activit.**, p. 489-495, 1992.

ZHAO, H.; CHEN, W.; LU, J.; ZHAO, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**. v. 119, n. 3, p. 1150-1158, 2010.

## APÊNDICE

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)

# A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents

Kamila Leite Rodrigues <sup>a</sup>, Tomaz Henrique Araújo <sup>b</sup>,  
 José Maurício Schneedorf <sup>c</sup>, Cláudia de Souza Ferreira <sup>a</sup>,  
 Gabriel de Oliveira Isac Moraes <sup>c</sup>, Rita Sinigaglia Coimbra <sup>d</sup>,  
 Maria Rita Rodrigues <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Toxicological and Clinical Analysis, Farmaceutic Sciences Faculty, Federal University of Alfenas, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

<sup>b</sup> Department of Histology, Biomedical Sciences Institute, UNIFAL MG, Alfenas, MG, Brazil

<sup>c</sup> Department of Biochemistry, Biomedical Sciences Institute, UNIFAL-MG, Alfenas, MG, Brazil

<sup>d</sup> Electron Microscopy Center, Federal University of São Paulo, UNIFESP, São Paulo, SP, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 29 September 2015

Received in revised form 12

November 2015

Accepted 16 November 2015

Available online 9 December 2015

### Keywords:

Kefir

Beer

Probiotic beer

Anti-inflammatory

Anti-ulcerogenic

Aqueous kefiran

## ABSTRACT

Kefir grown in molasses was activated to ferment malt for the production of beer. As kefir and beer are known to exhibit some beneficial health properties, anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities of a beer made with kefir were assessed using rat paw edema and ethanol-induced gastric ulcer model, respectively. The polyphenol content presented in the beers was evaluated by HPLC, whereas serum cholesterol, triacylglycerol, HDL cholesterol, ALT, AST, catalase and glutathione peroxidase of treated animals were determined by molecular absorption. The results revealed similar levels of beer polyphenols and serum markers among all treated animals, but marked decreases in inflammatory and ulcerogenic responses in the group treated with kefir beer, and with a control beer modified with aqueous kefiran. Scanning electron microscopy showed a coating layer on the stomach of animals treated only with kefir-based samples. These results suggest a functionality of a specialty beer made with kefir as single fermenter.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Of all alcoholic beverages, beer is one of the oldest and most commonly consumed on a regular basis by many people around the world (Campbell-Platt, 1994). Beer is rich in nutrients as well as non-nutrient components, including carbohydrates,

amino acids, minerals, vitamin B complex, citric acid, ascorbic acid, silicic acid and phenolic compounds (Guido et al., 2007). Phenolic constituents of beer are derived from malt (70–80%) and hops (20–30%). These molecules may include coumarins and catechins, proanthocyanidins, flavonoids and chalcones, among others. Beta, alpha and iso-alpha acids are also found in moist hops (Gerhäuser, 2005). Malt derived from barley for

\* Corresponding author. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF, Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas, MG CEP-37130-000, Brazil. Tel.: +55 35 3299 1221; fax: +55 35 3299 1112.

E-mail address: [rodrigues.mrita@gmail.com](mailto:rodrigues.mrita@gmail.com) (M.R. Rodrigues).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.035>

1756-4646/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the manufacture of beer also contains several phenolic compounds that result from the malting process (Maillard reaction products). These compounds can play a significant role in malting and brewing via their antioxidant properties (Maillard, Soum, Boivin, & Berset, 1996). Malting contributes to both the total phenolic content and the antioxidant properties of beer (Lu et al., 2007). Food intake, including that of beer, may contribute to the total antioxidant capacity of plasma, which is an important strategy for inhibiting or delaying oxidative stress. Phenolic compounds such as tannin, flavonoids and diterpenes exhibit significant antioxidant activity (Ghiselli et al., 2000; Serafini, Maiani, & Ferro-Luzzi, 1998). As a consequence, several studies suggest that consuming one to two alcoholic beverages daily lowers the risk of coronary heart disease in middle-aged and older adults (Dietary Guidelines Advisory Committee, 2010; Rabi et al., 2011). Previous research also suggest that the additive or synergistic effects of alcohol and non-alcoholic compounds found in beer (e.g., antioxidants) inhibit all phases of the atherosclerotic process (Mann & Folts, 2004). Some studies have also demonstrated the anti-mutagenic effects of beer (Yoshikawa et al., 2002), beer-induced reduction of oxidative stress levels and products of lipid peroxidation in cerebral tissue (Gonzalez-Munoz et al., 2008), beer-induced protection from obesity, beer-induced regulation of type 2 diabetes and lipid metabolism (Kondo, 2004) and beer-induced reduction of central GABAergic activity in normotensive and hypertensive rats without any effect on cardiovascular function (Jastrzebski et al., 2007). Beer is commonly made using *Saccharomyces cerevisiae* as primary biofermenter, although it can also be manufactured using additional strains, such as *Brettanomyces* sp. In this work, we used kefir, a consortium of a dozen yeasts and lactic acid bacteria, including *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Torula*, *Kluyveromyces* and *Saccharomyces*, to ferment barley malt for the production of a kefir beer. Kefir is a fermented beverage originating from the Caucasian regions, and several health benefits have been claimed to be associated with both its probiotic and prebiotic content (Schneedorf, 2012). Kefir and its related products, e.g., kefiran, an exopolysaccharide produced by some strains, have been reported to have anti-inflammatory, antimicrobial, anti-neoplastic and antioxidant activities (Chen et al., 2015; Rodrigues, Caputo, Carvalho, Evangelista, & Schneedorf, 2005a). The present work was undertaken to produce a kefir-based beer to evaluate its plausible anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities to further the development of a potential candidate alcoholic functional food for the human diet.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Kefir culture

Dried starter grains (50 g) stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in our lab (UNIFAL-MG, Brazil) were thawed and continuously cultured in 50 g/L of molasses solution until 30 g/L was obtained for mash fermentation. The grains were placed in polyethylene vessels containing nutrient medium and allowed to grow for up to 48 h. The suspensions were withdrawn from the containers, and the grains were gently washed in distilled water and settled again

with a fresh nutrient preparation. The microbial profile of the starter grains was previously identified (Bergmann et al., 2010).

### 2.2. Beer production

Unfiltered and unpasteurized beers were made with kefir grains (kefir beer) or *Saccharomyces cerevisiae* (control beer). Kefir and control beers were produced using similar approaches. Briefly, 150 g/L of pilsen and vienna malt were ground to a fine powder to extract the fermentable sugars, followed by mashing at  $62\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 40 min and  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 20 min. During this process, the malt enzymes are activated, converting the starch of the grains to dextrins, and then to fermentable sugars, such as maltose. After which, the mixture was heated to  $75\text{ }^{\circ}\text{C}$  to inactivate the enzymes. The mash was then separated for gravity filtering and pumped to separate the wort from the grain husks. The wort was brought to a controlled boil for 60 min, followed by the addition of Northern Brewer hops (1.5 g/L), whirlpool and chilling processes. The latter was carried out by a counterflow plate heat exchanger that refrigerated the wort for 30 min at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To start the fermentation, *Saccharomyces cerevisiae* (10 mL/L,  $1 \times 10^6$  viable cells/mL) or kefir grains (30 g/L) were added to fermenter chambers and kept for 7 days at  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After this souring period, the beers were transferred to another container for maturation for 10 days. Finally, the beers were bottled with 5 g/L of sucrose to provide a second fermentation and carbonation. The wort was evaluated with a hydrometer to estimate alcohol by volume, and the samples containing  $4.0 \pm 0.2\%$  (v/v) ethanol were selected after 7 days of fermentation and 10 days of maturation. The bottled beers were stored at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in the dark for 10 days prior to beginning the experiments.

### 2.3. Determination of phenolic compounds in beers

Liquid chromatography (HPLC) profiles were obtained using Shimadzu LC-100 equipment with a UV/VIS detector at 280 nm, an automatic injector and LC solution software (Shimadzu, Kyoto, Japan). The HPLC apparatus was equipped with a C18 column (Shimadzu CLC-ODS; 4.6 mm  $\times$  250 mm; 5  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase consisted of 0.5 mM aqueous acetic acid (A) and acetonitrile (B) with a flow rate of 0.7 mL/min. The following elution profile was used: 0–5 min 95:5 (v/v; A:B) (isocratic); 5–13 min 87:13 (v/v; linear); 13–27 min 87:13 (v/v; isocratic) and 27–30 min 95:5 (v/v; linear). An equilibration period of 10 min was included between runs. Phenolic standards used for the runs were quercetin, catechin, gallic, caffeic, coumaric and chlorogenic acids (Nardini, Natella, Scaccini, & Ghiselli, 2006).

Phenolic compounds present in the beer preparations were identified at 0, 10, 20, 30, 60 and 90 days after bottling, by comparing their retention times and spectral parameters with those of the standards. The concentrations of individual phenolic compounds in beer were calculated using calibration lines prepared by plotting peak area as a function of concentration for a series of standards (0.01–1 mg/mL). The results are expressed as mg/L.

### 2.4. Animals

Male Wistar rats weighing 250–300 g were randomly separated and fed a standard chow diet and received water *ad*

libitum. The animals were housed in polypropylene cages and divided into groups for three different treatment approaches. Thirty animals ( $N = 5/\text{group}$ ) were treated for 30 days by gavage with 1.5 mL of kefir beer (test), control beer (positive control), kefir fermenting molasses (kefir control), water and 4% ethanol (negative controls), for serum analysis of a lipid profile, catalase, glutathione peroxidase, AST and ALT levels. After 7 days, 48 animals ( $N = 8/\text{group}$ ) were separated for use in a carrageenan-induced acute inflammatory assay. Similarly, 48 animals ( $N = 8/\text{group}$ ) were separated for use in an ethanol-induced gastric ulcer assay. The animals were acquired from the Central Animal Facility at the Federal University of Alfenas (Unifal-MG, Alfenas, MG, Brazil). All in vivo experiments followed the guidelines of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) and were conducted according to protocol no. 657/2015.

## 2.5. Serum analysis

After the 30-day treatment the rats were anesthetized and conducted to cardiac puncture. They were sacrificed by deepening anesthesia following the administration of 40 mg/kg sodium pentobarbital intraperitoneally. Blood samples for biochemical tests were collected from the cardiac puncture and stored in tubes without anticoagulant and centrifuged for 10 min. The serum was stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  for subsequent biochemical analysis. Serum cholesterol, triacylglycerol, HDL cholesterol, ALT and AST were determined by using an automated analyzer using commercial kit (Labmax Plenno®, Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Standard controls were run before each determination, and protein quantification was done by the method of Bradford. Catalase activity was monitored according to Beutler (1975) as the rate of enzymatic decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , which was monitored as a decrease of absorbance at 240 nm. One unit of catalase activity represented the amount of enzyme needed to hydrolyze 1  $\mu\text{mole}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg}$  protein at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a pH 8.0. Glutathione peroxidase was analyzed following Sinet, Michelson, Bazin, Lejeune, and Jerome (1975) by measuring NADPH oxidation at 340 nm in the presence of excess glutathione reductase, reduced glutathione,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and aliquots of the samples. The results are reported as GPx units, with one unit being the amount of enzyme necessary to oxidize 1  $\mu\text{mole}$  of NADPH/min/mg protein at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  and a pH 7.2.

## 2.6. Acute inflammatory model

Anti-inflammatory activity was measured using carrageenan (Winter, Risley, & Nuss, 1962; Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA) or histamine (Holsapple, Schnur, & Yim, 1980, Sigma-Aldrich) in rat paw edema assay. The groups were treated for 7 days (carrageenan challenge,  $N = 8/\text{group}$ ) or 30 min (histamine challenge,  $N = 4/\text{group}$ ) with 1.5 mL of kefir beer, kefir suspension in sugar molasses, control beer, water, and 4% ethanol and positive controls. These latter groups were used as a reference drug on the experiment day and consisted of 10 mg/kg indomethacin (Sigma-Aldrich) or 5 mg/kg cyproheptadine (Prodome, SP, Brazil) for carrageenan-induced or histamine-induced edema, respectively. Edema was induced by the subplantar injection of 100  $\mu\text{L}$  of 10 mg/mL freshly pre-

pared solution of each edematogenic agent in distilled water into the right hind paw of each rat. The left hind paw was injected with an equal volume of saline. The last dose was administered 30 min prior to stimuli. Paw thickness was measured immediately after injections (time 0) and at 1, 2, 3, 4, 5 h using a Vernier caliper to assess the degree of inflammation. The data are expressed as the difference between left and right hind paws of the same animal.

## 2.7. Ethanol-induced gastric ulcer model

The procedure for inducing ulcers with ethanol was adapted from Salga, Ali, Abdulla, and Abdelwahab (2012). After a 24-h fast, rats were divided into six groups ( $N = 8$  animals/group) and orally treated with kefir beer (1.5 mL/animal), kefir suspension in sugar molasses (1.5 mL/animal), control beer (1.5 mL/animal), water (1.5 mL/animal), and pantoprazole (0.1 mg/kg, Medley, SP, Brazil). Sixty minutes after the treatments, every animal received absolute ethanol (1 mL/200 g). Alternatively, the animals were previously treated i.p. with 5 mg/kg indomethacin before challenged with ethanol. After another 60 min, the animals were euthanized, and their stomachs were removed and opened along the greater curvature to determine the lesion area by planimetry, according to Morimoto, Shimohara, Oshima, and Sukamoto (1991), using ImageJ software release 1.5 (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## 2.8. Purification of aqueous kefiran

Aiming to evaluate a bioactive compound present in the beers made with kefir grains, we attempt to isolate a carbohydrate polymer named aqueous kefiran from a modified procedure reported elsewhere (Moreira et al., 2008a). Briefly, 450 g of kefir grains used for beer preparation was treated in boiling water (1:5) for 2 h. The mixture was centrifuged at 9000 g for 20 min at  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  to remove all undissolved portions of grains, and the clear supernatant was precipitated by addition of two volume of chilled ethanol and left at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  overnight. The precipitate was dispersed in hot water and the precipitation procedure was repeated twice. The suspension was centrifuged at 2000 g for 5 min, and resuspended in deionized water three times. The final precipitate was dried in Petri dishes at  $80\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 90 min, and the pellets were grinded to produce a fine powder. The sample was tested for the absence of proteins and free carbonyl groups by Bradford and 3,5-dinitrosalicylic acid methods, respectively. The white precipitate hereafter called aqueous kefiran gave about 0.2% per half kilogram of kefir biomass.

## 2.9. Mucin content of gastric cavity

The presence of carbohydrate polymers in the gastric cavity of the treated animals was determined after acid hydrolysis according to Borgström, Dahlqvist, Lundh, and Sjövall (1957) with adaptations. Briefly, the gastric cavity was washed with deionized water and gently swabbed with a sterile plastic swab. The samples were treated with 0.2 mL of concentrated HCl and centrifuged at 6000 g for 5 min. An aliquot of the supernatant (0.2 mL) was diluted with 0.5 mL of 44 mmol/L 3,5-dinitrosalicylic acid containing 1% potassium sodium tartrate.

The mixtures were vortexed and boiled for 5 min. Mixtures were diluted with 20 mL of deionized water, and the absorbance was measured spectrophotometrically at 540 nm.

### 2.10. Scanning electron microscopy

For scanning electron microscopy (SEM), the ulcer tissues were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol/L sodium cacodylate buffer at pH 7.2 for 6 h and post-fixed in 1% OsO<sub>4</sub> for 1 h and then impregnated with 1% tannic acid for 30 min and once again with 1% OsO<sub>4</sub> for 30 min to enhance electrical conductivity. The specimens were dehydrated in a graded ethanol series and critical point dried using a Balzers CPD 030 apparatus. Ulcer tissues were glued on the stub with the distal portion on top and then coated with a 20-nm layer of gold in a Balzers SCD 050 device. The samples were observed using a JEOL-JSM-5300 scanning electron microscope (Jeol Inc., Pleasanton, CA, USA).

### 2.11. Data analysis

The data are expressed as the means  $\pm$  SD for each treatment group. Significant differences were assessed using analysis of variance (ANOVA), after meeting the assumptions of normality (Shapiro–Wilk's test) and homogeneity of variances (Levene's test). Comparisons between groups were followed by Tukey's post-hoc test. Pairwise comparisons were done with Student's t-test with a Bonferroni correction. P values less than 0.05 were considered statistically significant. All data were analyzed using the open source statistical package R (The R Foundation).

## 3. Results

### 3.1. Body weight

A craft beer was produced using kefir (kefir beer) or *Saccharomyces cerevisiae* (control beer) as the fermentation source cells. The final products presented an ethanol content of  $4.0 \pm 0.2\%$  (v/v) and pH values ranging from 4.3 to 4.4. The body weight of each rat was measured every 5 days of treatments. Compared to water and 4% ethanol, both beer samples and kefir suspension significantly decreased the body weight of the

animals after 30 days of treatment ( $P < 0.001$ ). Kefir beer treatment resulted in a  $4.8 \pm 0.2\%$  reduction in animal body weight compared to a  $1.8 \pm 0.1\%$  decrease in the control beer treatment group.

### 3.2. Serum analytes

Although differences in body weight means showed considerable decrease with the beer samples, the serum parameters tested remained unchanged for total cholesterol, HDL cholesterol, triacylglycerols, AST, ALT, catalase, and glutathione peroxidase activities (Table 1). These findings suggest that both the beers and kefir suspensions did not alter the metabolic profile of the animals, preserving the redox status as well as the lipid and hepatic functions.

### 3.3. Rat paw edema

The anti-inflammatory response of carrageenan-induced paw edema is shown in Fig. 1A. A mean decrease of inflammation was observed after 7 days of oral treatment with beer samples and kefir, although the beer made with kefir had a more pronounced effect than the control beer throughout the whole experiment (Fig. 1A,  $P < 0.05$ ). The animals treated with kefir beer reduced the paw edema by  $41.4 \pm 5.1$  and  $47.5 \pm 2.9\%$  at the 1st and 3rd hours, respectively, whereas the control beer reduced  $14.5 \pm 1.5$  and  $28.1 \pm 1.3\%$  in the same period ( $P < 0.05$ ). Furthermore, kefir beer decreased the paw edema values continuously after the 3rd hour, while the control beer remained unchanged until the end of the assays (Fig. 1A), also showing a significantly lower value as compared to the kefir group itself ( $P < 0.05$ , 3rd hour). As the group treated with kefir beer presented an anti-inflammatory response against carrageenan at the 1st hour (Fig. 1A), the animals were assayed for paw edema using histamine as edematogenic agent (Holsapple et al., 1980). The results found in Fig. 1B revealed significant reduction of the hind paw edema in the kefir beer group ( $76.4 \pm 5.9\%$ ) whereas the control beer group did not present an effective inhibition ( $4.09 \pm 0.1\%$ ). These results suggest an improvement of an anti-inflammatory property arisen from the beer made with kefir grains.

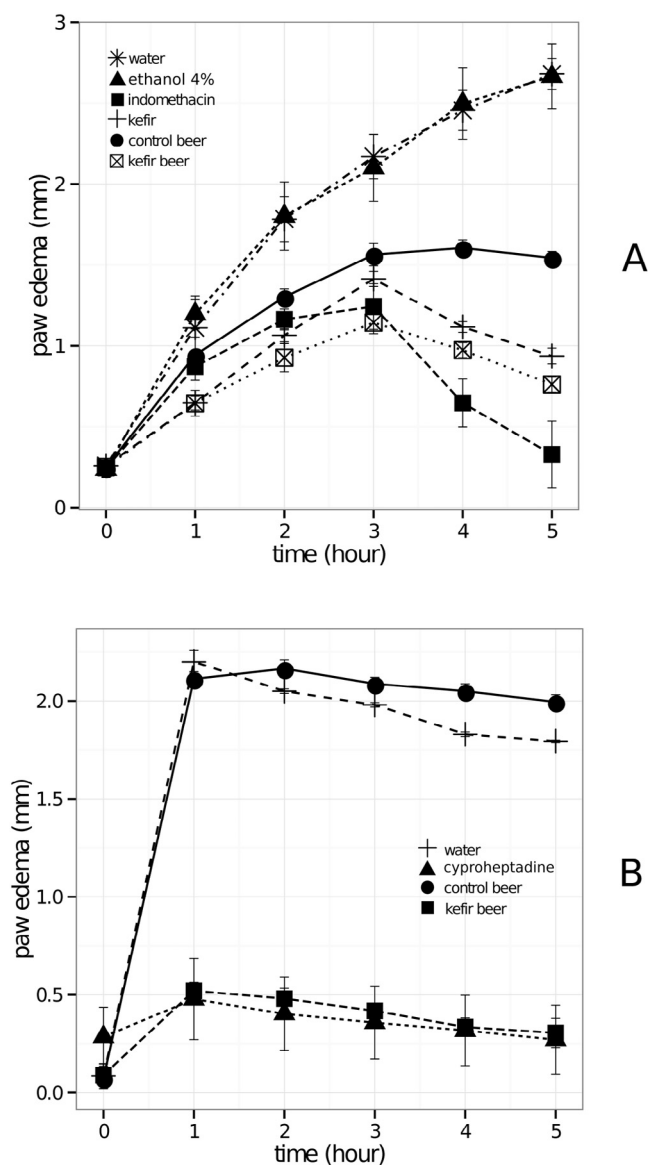
### 3.4. HPLC of phenolic compounds

The above findings could also be explained by the polyphenol content of both beers, with an enhancement due to the

**Table 1 – Concentrations of lipid metabolites and enzyme activities found after 30 days of oral administration of water, ethanol, kefir suspension, control or kefir beers.**

Analyte	Water	Ethanol 4%	Kefir	Control beer	Kefir beer	P-value
<i>Lipid fraction</i>						
Triacylglycerol (mg/dL)	55.0 $\pm$ 13.3	66.0 $\pm$ 6.4	69.2 $\pm$ 15.7	61.8 $\pm$ 12.7	71.3 $\pm$ 17.8	0.580
Total cholesterol (mg/dL)	61.0 $\pm$ 11.0	63.0 $\pm$ 9.5	65.6 $\pm$ 8.8	62.0 $\pm$ 10.1	66.8 $\pm$ 15.1	0.916
HDL cholesterol (mg/dL)	36.4 $\pm$ 3.5	38.0 $\pm$ 4.6	36.4 $\pm$ 4.8	37.5 $\pm$ 1.7	37.8 $\pm$ 6.3	0.634
<i>Enzymes</i>						
ALT (U/L)	42.8 $\pm$ 3.0	46.6 $\pm$ 15.0	45.4 $\pm$ 3.5	40.0 $\pm$ 5.0	45.2 $\pm$ 6.1	0.714
AST (U/L)	204.8 $\pm$ 60.4	178.8 $\pm$ 98.4	186.8 $\pm$ 62.1	132.0 $\pm$ 61.9	186.6 $\pm$ 17.2	0.146
Catalase ( $\mu$ mol/min/mg protein)	2.3 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.4	1.7 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.8	0.089
GPx ( $\mu$ mole NADPH/mg protein)	45.9 $\pm$ 7.0	65.8 $\pm$ 5.5	64.1 $\pm$ 6.7	57.2 $\pm$ 12.3	49.6 $\pm$ 26.0	0.370

Note: Results are expressed as mean  $\pm$  SD of five determinations, following one-way ANOVA.



**Fig. 1** – Change in paw thickness (mm) of rats treated orally with controls and beers. Edema was induced by injecting 100  $\mu$ L of 1% freshly prepared solution of carrageenan (A) or histamine (B) in distilled water into the sub plantar surface of the right hind paws. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 8/group).

probiotic and prebiotic characteristics of kefir, thus suggesting a synergistic effect of the kefir beer. Because of its polyphenol content, the anti-inflammatory properties of beer have been reported in some studies (Chiva-Blanch et al., 2015). Mean values of polyphenols, flavonoids (catechin and quercetin) and some hydroxycinnamic phenolic acids (coumaric, gallic, caffeic and chlorogenic acids) found in beer samples during 90 days after bottling are shown in Table 2. The individual phenolic compounds were similar for both beer preparations ( $P > 0.05$ , paired Student's *t* test) and showed close levels to that reported elsewhere (Quifer-Rada et al., 2015; Zhao, Chen, Lu, & Zhao, 2010).

**Table 2** – Polyphenol fractions found in control and kefir beers. Results are expressed as mean  $\pm$  SD of six measures. The values were obtained at 0, 10, 20, 30, 60 and 90 days after bottling.

Polyphenol	Beer (mg/L)	
	Control	Kefir
Caffeic acid	23.1 $\pm$ 6.0	25.1 $\pm$ 5.9
Chlorogenic acid	537.1 $\pm$ 63.2	409 $\pm$ 17.3
Coumaric acid	51.4 $\pm$ 16.4	44.5 $\pm$ 4.0
Gallic acid	655.4 $\pm$ 211.0	555.1 $\pm$ 22.6
Catechin	459.6 $\pm$ 10.1	501.6 $\pm$ 52.5
Quercetin	18.3 $\pm$ 7.2	21.6 $\pm$ 6.6

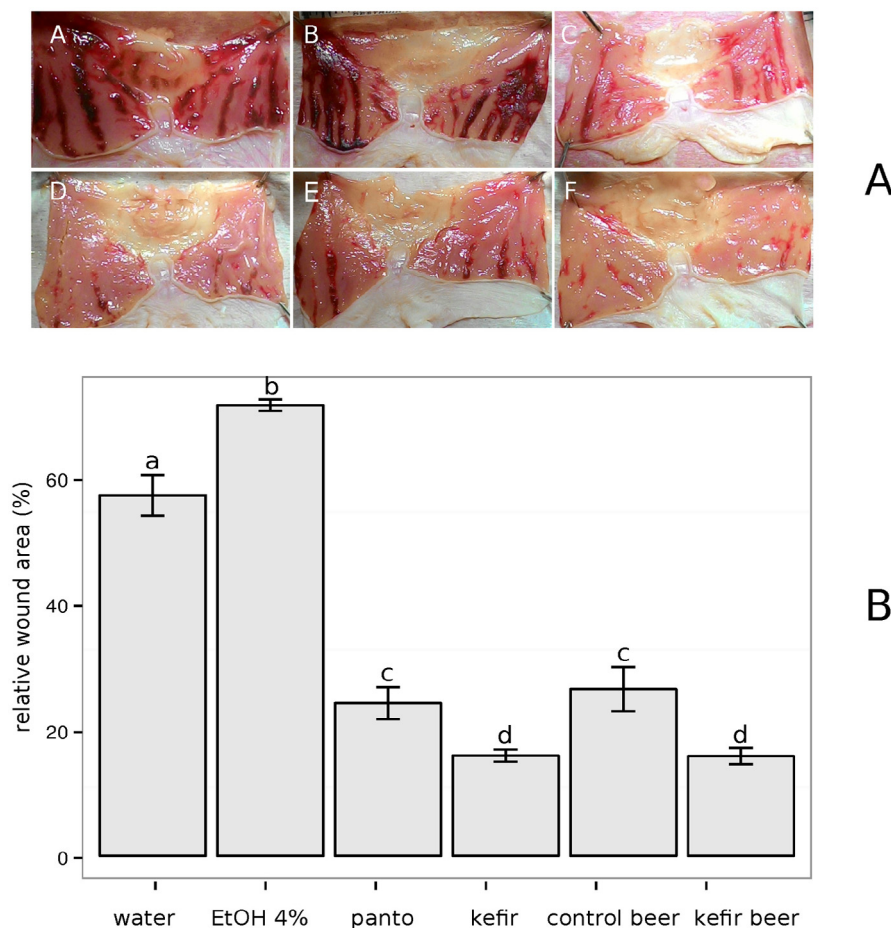
Notes: HPLC condition: C18 column Shimadzu, 250 mm  $\times$  4.6 mm I.D., 5 mm; solvent (A) 0.5 mM aqueous acetic acid and acetonitrile (B), flow rate of 0.7 mL/min; linear gradient as describe in section 2.3.

### 3.5. Gastric ulcers

Gastric ulcer is one of the major gastrointestinal disorders with increasing incidence and global prevalence (Brucker & Faucher, 1997; Salga et al., 2012). It is well-known that gastric lesions occur primarily due to the imbalance between the harmful and gastro-protective factors of the gastric mucosa (Laine, Takeuchi, & Tarnawski, 2008). A great number of synthetic drugs have been used for the treatment of gastric ulcers (Malfertheiner, Chan, & McColl, 2009). However, many of these drugs can produce undesirable adverse effects, parallel to the high cost of their treatments (Chan & Leung, 2002). Natural products of plant origin and probiotics that may present fewer side effects are emerging as a promising therapeutic resource for the development of new drugs in the management of gastrointestinal diseases. To this extent, we examined the protective effects of the craft beers on gastric development lesions induced by ethanol. The macroscopic observation of stomach tissues showing ethanol-induced ulcerated areas is depicted in Fig. 2A.

A prominent ulcer area was observed in both groups treated with water (A) and 4% ethanol (B). The reference drug pantoprazole administered to the rats prevented the formation of ulcerous tissues (C). Kefir suspension (D), control beer (E) and kefir beer (F) treatments showed a significant reduction in ulcer areas compared to the water group (Fig. 2A), and similar to the pantoprazole group. Lesion areas as determined by planimetry are presented in Fig. 2B. The relative wound areas for the groups treated with kefir beer (14.5  $\pm$  1.2%) and kefir itself (14.6  $\pm$  0.9%) showed anti-ulcer effects that were significantly greater to those in the control beer group (24.3  $\pm$  3.2%), and even in the pantoprazole group (22.2  $\pm$  2.3%). Furthermore, measures of serum cholesterol, triacylglycerol, HDL, ALT, AST, catalase and GPx were carried out again after ethanol-induced ulcerogenesis, but showed no mean differences ( $P > 0.05$ ).

An anti-ulcer effect of kefir was recently found in rats that received milky preparations after ethanol-induced gastric ulcers (Fahmy & Ismail, 2015). This effect was related to a decrease in HCl secretion by gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibition, and the stimulation of mucous secretion. Nonetheless, we could not rule out some antiulcerogenic activity of other constituents found in the craft beers tested in this work, as antioxidants



**Fig. 2 – Ethanol-induced ulcerogenesis in rats. (A) Gross appearances of stomachs of the treated animals challenged for ethanol-induced ulcerogenesis. The groups are: A – water, B – 4% ethanol, C – pantoprazole, D – kefir suspension, E – control beer, F – kefir beer. Rats received 1 mL of absolute ethanol (p.o.) to induce gastric lesions, and killed after 1 h. The control groups (water and ethanol) presented clear damage in the gastric mucosa and some ulcerations with hemorrhagic regions. (B) Relative ulcerated areas (%) of stomach excised from rats pretreated orally with absolute ethanol. Data are reported as mean  $\pm$  SD (N = 8/group) following one-way ANOVA and post-hoc Tukey's test. Different letters represent significant statistical difference among groups (P < 0.05). Note: panto – 0.1 mg/mL pantoprazole (positive control group).**

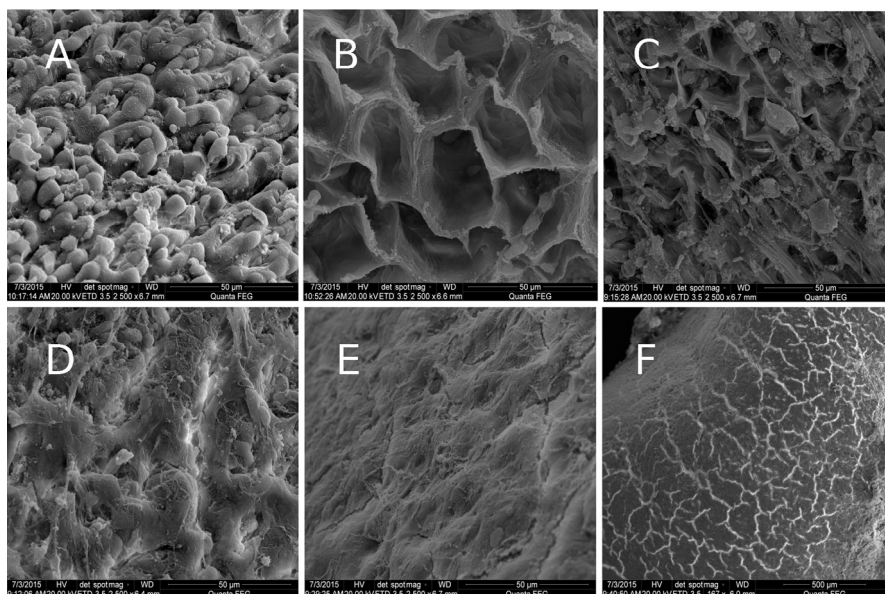
and polyphenols that might have a beneficial effect on erosion and ulceration shown here. In this regard,  $\beta$ -glucans normally present in beers are known to improve stress tolerance and offer protection against an adverse environment of low pH, ethanol and inhibitory hop acid to the gut microflora (Yeo & Liu, 2014).

### 3.6. Scanning electron microscopy

In addition to the ethanol-induced stomach wounds (Fig. 2), images from scanning electron microscopy (SEM) are shown in Fig. 3 for intact epithelial tissues (Fig. 3A), water (Fig. 3B), control beer (Fig. 3C), kefir (Fig. 3D), and kefir beer treatment groups (Fig. 3E and F). Interestingly, kefir suspension (Fig. 3D) and kefir beer groups (Fig. 3E and 3F) seem to have exhibited a coating layer on the epithelia. This layer would be related to some specific interactions with gastric mucin and/or other association with the stomach ultrastructure. This phenomenon was not observed in the control beer group.

### 3.7. Control beers modified with aqueous kefir

Aiming to evaluate the participation of a kefir-derived compound in the anti-inflammatory and anti-ulcerogenic responses, we carried out the purification of aqueous kefir, a bioactive isolated from kefir grains used for preparing beers (Moreira et al., 2008a). The final product was added to control beer samples, and tested for histamine paw edema (Fig. 4) and ethanol-induced ulcerogenesis with a pretreatment of indomethacin (i.p.) in rats (Fig. 5). Surprisingly, the anti-inflammatory activity of control beers modified with kefir was essentially close to those found with the kefir beer treatment (Figs 1B and 4A), and even with an autoclaved beer made with kefir. Nevertheless, the antiulcerogenic effect of autoclaved kefir beer or control beer samples modified with 1, 5 and 10 mg/mL of aqueous kefir (Fig. 5) was unlikely to cause the same inhibitory effect observed for the kefir beer treatment shown in Fig. 2, whenever the animals were pretreated i.p. with indomethacin.



**Fig. 3** – Scanning electron micrograph images of the treated animals after ethanol-induced gastric ulcer. Treatment groups are: **A** – intact epithelial tissue (2500 $\times$ ), **B** – water (1197 $\times$ ), **C** – control beer (2500 $\times$ ), **D** – kefir suspension (2500 $\times$ ), and kefir beer group (**E** and **F**). The latter presents a coating layer on the epithelial tissue observed at magnification of 2500 $\times$  (**E**) and 167 $\times$  (**F**).

A swabbed material harvested from the animal stomachs and tested for reducing sugars after acid hydrolysis (Table 3) showed higher absorbance values for the groups treated with kefir-based samples (kefir beers and control beers modified with kefir), as compared to the control groups (control beer and pantoprazole). This outcome suggests the presence of carbohydrate polymers in the gastric cavity of the animals treated with kefir-based samples.

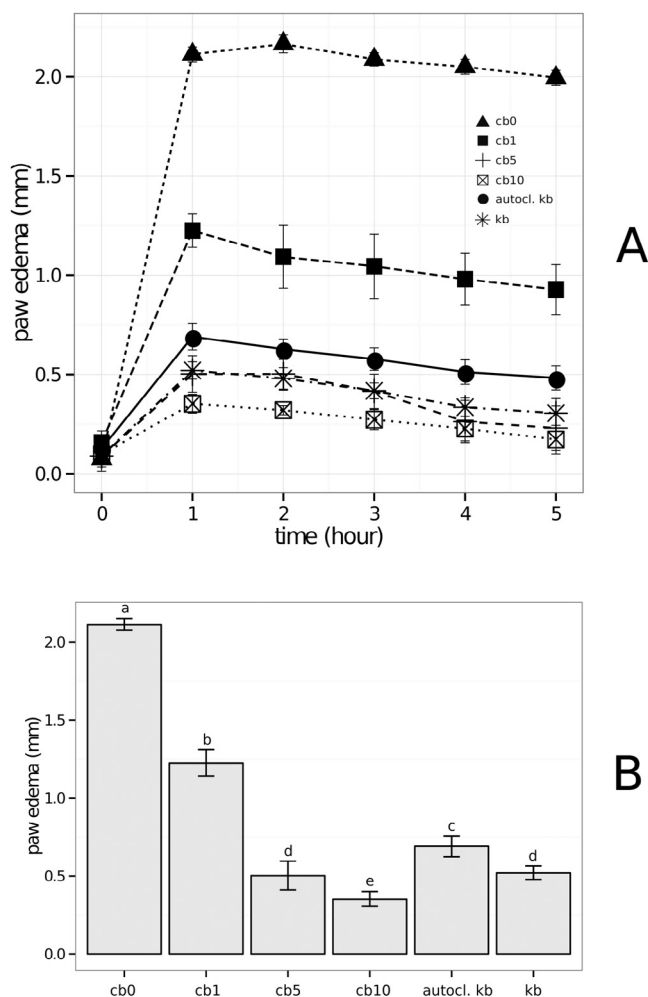
#### 4. Discussion

Kefir has a long tradition in human consumption due to its assumed beneficial health effects that include anti-inflammatory and anti-oxidant activities (Farnworth & Mainville, 2003). These effects are associated with the probiotic functions of lactic acid bacteria and yeasts and with the activities of the exopolysaccharide kefiran and peptides released during kefir production (Ebner et al., 2015; Farnworth, 2006). On the other hand, beer consumption may also contribute to the ingestion of naturally occurring compounds such as polyphenols and other antioxidants (Ferk et al., 2010), thus promoting health benefits as well. In this way, the aim of this study was to evaluate plausible probiotic activities of a beer made with kefir grains as a protective agent against damages induced in rat tissues after injection of inflammatory agents of carrageenan (rat paw edema), or acute intoxication due to ethanol administration (gastric ulcer). Commercial beers are generally made in a single fermentation stage promoted by *Saccharomyces cerevisiae*, although a secondary or alternative fermentation can be done with other strains, aiming to give distinct aroma and taste (e.g., *Lactobacillus* or *Brettanomyces* refermented beers, and lambic beers). In this respect, the current study is the first to inves-

tigate a gastroprotective and anti-inflammatory potential of a beer made with a probiotic association as unique biofermenter.

The kefir beer treatment resulted in greater weight loss as compared to the control beer group and even with the group receiving the kefir suspension ( $P < 0.001$ ), which is an intriguing finding that is probably linked to the combined antioxidant and probiotic activities of kefir beer. Weight loss was recently found by Fathi, Faghih, Zibaenezhad, and Tabatabaei (2015) in a study with overweight women after drinking milky kefir. In addition, a significant decrease in body weight was observed in male rats treated with beer containing xanthohumol (Legette et al., 2013). Hence, our findings would be explained by a beneficial association of beer polyphenols (Table 2) with pre and/or probiotics present in the kefir beer, as no polyphenols are found in kefir drinks. In this respect, Chiva-Blanch and coworkers (2015) recently reported a reduction in inflammatory biomarkers after beer consumption, which could ameliorate the weight loss response.

High concentrations of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) together with increased hepatic lipid concentrations present in the plasma are addressed to liver injury due to chronic ethanol intake. In this study, the beer samples apparently did not affect serum levels of transaminases, lipid fractions and the redox profile (Table 1), thus indicating a similar metabolic status of the treated animals with the control group. Notwithstanding, the inflammatory responses after administration of kefir beer and controls were quite different (Fig. 1). Both beers presented an anti-inflammatory activity in rats against carrageenan, and probably related to its polyphenol content (Chiva-Blanch et al., 2015). However, kefir beer presented a significant reduction in carrageenan-induced paw edema as compared to the control beer ( $P < 0.05$ ), and a pronounced inhibition with

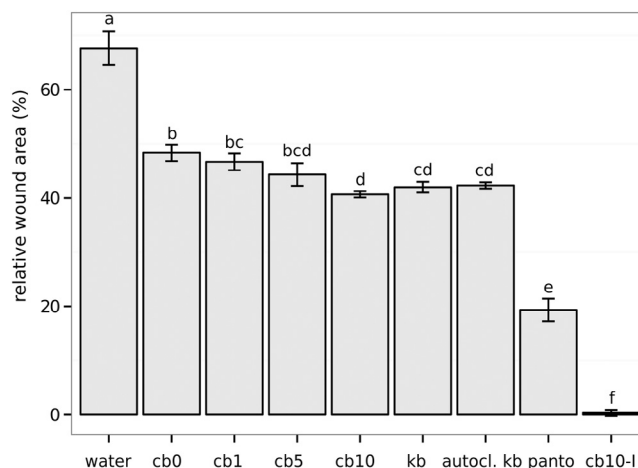


**Fig. 4 – Rat paw edema (mm) of rats treated orally with beer samples. (A) Edema induced by injecting 100  $\mu$ L of 1% freshly prepared solution of histamine in distilled water into the sub plantar surface of the right hind paws. (B) Thickness results after 1 h from the challenges. Data are expressed as mean  $\pm$  SD (N = 4/group) following one-way ANOVA and post-hoc Tukey’s test. Different letters represent significant statistical difference among groups (P < 0.05). Treatment groups are: Cb0 – control beer; cb1, 5 and 10 – control beers modified with 1, 5 and 10 mg/mL kefiran, respectively; autocl. Kb – autoclaved kefir beer; kb – kefir beer.**

histamine-induced edema in a more effective manner than the control beer (Fig. 1, P < 0.001).

This is in agreement with previous studies of anti-inflammatory activities of kefir and kefiran extract (Diniz, Perazzo, Carvalho, & Schneedorf, 2003; Rodrigues, Carvalho, & Schneedorf, 2005b), which revealed mean reduction of paw edema with carrageenan, dextran and histamine. The kefiran extract was also reported to reduce by 34  $\pm$  2% a granulomatous-induced tissue in rats, following oral administration after 2 h of injury, and treatment for 7 days (Rodrigues, Carvalho, & Schneedorf, 2005b)

Anti-inflammatory and antioxidant effects can also be related to phenolic content of beers in individuals who consume



**Fig. 5 – Relative ulcerated areas (%) of stomach pretreated orally with indomethacin before administration of absolute ethanol. Data are reported as mean  $\pm$  SD (N = 4/group) following one-way ANOVA and post-hoc Tukey’s test. Different letters represent significant statistical difference among groups (P < 0.05). Treatment groups are: water; Cb0 – control beer; cb1, 5 and 10 – control beers modified with 1, 5 and 10 mg/mL kefiran, respectively; kb – kefir beer; autocl. Kb – autoclaved kefir beer; panto – 0.1 mg/kg pantoprazole (positive control group); Cb10-I – control beer modified with 10 mg/mL kefiran without indomethacin pretreatment.**

it moderately (Karatzi et al., 2013). Phenolic compounds as hydroxyphenylacetic, coumaric, ferulic, vanillic and caffeic acids are known to exhibit a peak concentration after 30 min of beer ingestion in healthy subjects (Nardini et al., 2006). Although the polyphenol content of kefir and control beers was quite similar (Table 2), kefir is known to present some antioxidant activities (Güven & Gülmez, 2003), which could contribute to the anti-inflammatory effect promoted by the kefir-based samples (Fig. 1).

**Table 3 – Evaluation of carbohydrate polymers adsorbed in the gastric cavity of the treated animals after ethanol-induced ulcerogenesis. The values are expressed in absorbance units as the difference of the material obtained before and after hydrolysis with HCl followed by determination of reducing sugars with 3,5-dinitrosalicylic acid (Borgström et al., 1957).**

Group	$\Delta A_{540}$
Pantoprazole	0.009 $\pm$ 0.004
Cb0	0.026 $\pm$ 0.013
Cb1	0.101 $\pm$ 0.032
Cb5	0.036 $\pm$ 0.018
Cb10	0.080 $\pm$ 0.012
autocl. kb	0.039 $\pm$ 0.015
Kb	0.129 $\pm$ 0.032

Notes: Each result is expressed as mean  $\pm$  SD of four determinations. Legends are: Cb0 – control beer; Cb1, 5 and 10 – control beers modified with 1, 5 and 10 mg/mL kefiran, respectively; autocl. kb – autoclaved kefir beer; kb – kefir beer.

The antioxidant effects of barley polyphenols in beer have been reported elsewhere (Karatzi et al., 2013; Pinto, Duque, Rodríguez-Galdón, Cestero, & Macías, 2012), and include several mechanisms of action, e.g., changes in total redox capacity, radical scavenging, the prevention of chain initiation and the binding of transition metal ion catalysts. These mechanisms are associated with several health impairments, such as cancer, liver injury, cardiovascular disease (Karatzi et al., 2013; Pinto et al., 2012; Valko, Rhodes, Moncol, Izakovic, & Mazur, 2006), and gastrointestinal inflammation (Fahmy & Ismail, 2015).

The initial phase of acute inflammation (0–1 h) in carrageenan-induced paw model has been attributed to the release of histamine, serotonin and bradykinin, followed by a late phase (2–6 h) mainly sustained by prostaglandin release and attributed to the induction of COX-2 in the tissue (Winter et al., 1962). Therefore, the data presented in Fig. 1 suggest the participation of histamine, serotonin and prostaglandins mediators in the anti-inflammatory response of the rats receiving kefir suspension or beer samples.

Gastric ulcer induced by ethanol is generally accompanied by alterations in vascular structure and function. Ethanol is known to increase gastric injury through acute hemorrhagic lesions, mucosal edema, erosion and ulceration (Sagradas et al., 2015). The acute effects are attributed to solubilization of the protective mucus, protein precipitation of the cytoplasmic components in the superficial cells of the gastric mucosa, the release of vasoactive mediators such as leukotrienes C4 (LTC4) and histamine, and the release of inhibitors of mucosal prostaglandins (Peskar, Lange, Hoppe, & Peskar, 1986). Alcohol may also increase the flow of sodium and potassium into the lumen, increase pepsin release, and decrease the tissue levels of nucleic acids and proteins. These processes may damage the mucous membrane, thus leading to tissue injury.

Mucosal damage is an initial step in ulcer development and is correlated with oxidative stress due to the generation of reactive oxygen species (ROS) and the hypersecretion of HCl via H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (proton pump) action (Srikanta, Sathisha, & Dharmesh, 2010). In this respect, an antioxidant role of kefir together with its free radical scavenging activity may be related to the normalization of MDA, GSH and GSH-Px levels, leading to MMP-2 and MMP-9 regulation and DNA protection from oxidative damage (Fahmy & Ismail, 2015). The ethanol-stimulated gastric acid secretion appears to be unrelated to circulating gastrin, but linked to the acid regulatory mechanism involving histamine and acetylcholine (Matsuno, Sasaki, & Okabe, 2000).

The results with kefir beer on inflammation induced by histamine revealed a decrease in initial phase of inflammation when compared to the control beer and the other treatments (Fig. 1). These data emphasize the participation of histamine, serotonin and bradykinin on the ethanol-induced gastric ulcer found in this work (Fig. 2), and suggest an additional protection of gastric mucosa by histamine inhibition promoted by kefir beer.

Regarding the antiulcerogenic activity (Fig. 2), a single dose of the craft beers or kefir suspension was able to meaningfully reduce the ulcer lesions induced by absolute ethanol orally administered to the rats. Moreover, the groups treated with kefir suspension (Fig. 3D) and kefir beer (Fig. 3E and 3F) presented an additional coating layer of fibrillar material on the epithe-

lial surface, not shown in the control beer group (Fig. 3C). In another electron microscopy study, a similar material found in the outer portion of kefir grains was identified as the polysaccharide kefiran (Magalhães, Pereira, Campos, Dragone, & Schwan, 2011).

Hence, as this coating layer emerged from the groups treated only with kefir-based samples, one can suggest a functional role of this fibrillar material related to the anti-inflammatory and antiulcerogenic activities shown in this work (Figs 1–3). In fact, soured suspension of kefir grains was reported to exhibit an anti-inflammatory activity in an analgesia model of acetic acid-induced writhing reflex in mice (Diniz et al., 2003), reducing abdominal contorsions by  $28 \pm 2\%$  ( $P < 0.05$ ). In another work (Cardoso, Ferreira, Schneedorf, & Carvalho, 2003), souring suspensions of kefir enhanced the gastrointestinal transit in rats by  $34.6 \pm 2.4\%$ , as compared to distilled water. These findings suggest some pain relief and improvement of the peristaltic activity in the gastrointestinal tract of rats after oral administration of kefir that would be considered for treating gastric lesions and bowel diseases.

In this regard, as the polyphenol levels were similar for both beers along 3 months (Table 2), one can speculate that the kefir beer treatment could have resulted from some pre/probiotic constituents arisen during beer preparation. This finding may contribute to the probiotic activities and shelf life of an unpasteurized beer made with kefir.

Kefir has long been considered good for health and various studies suggested that kefir grains may stimulate the mucosal immunity; produce metabolites, such as short-chain fatty acids and bacteriocins; improve lactose intolerance, encouraging the growth of bifidobacteria in the gut; reduce plasma cholesterol; and exhibit wound healing properties and antimicrobial, anti-carcinogenic, and anti-inflammatory activities, among others (John & Deeseenthum, 2015). Although the precise mechanisms for these health-promoting properties have not been clarified, dairy kefir has been reported to produce peptide and sugar prebiotics, e.g., lactacin, bacteriocins, and kefiran (Powell, 2006). Notwithstanding, kefiran, a water-soluble exopolysaccharide generally produced by *Lactobacillus kefirianofaciens* in milk or *Lactobacillus hilgardii* in water, is the single prebiotic reported in aqueous suspensions of kefir, as in this work.

In recent years, our group has studied an oligosaccharide of about 3.5 kDa isolated from an aqueous fraction of kefir grains (Moreira et al., 2008a), and composed mainly by glucose (40%), rhamnose (24%), galactose (10%), and arabinose (26%). When testing for anti-inflammatory potential (Moreira et al., 2008b), the oligosaccharide reduced paw edema induced by carrageenan at the 3rd hour by  $30 \pm 4\%$  ( $P < 0.001$ ).

Therefore, we conducted a purification of a carbohydrate polymer (aqueous kefiran) from the kefir grains used to prepare the beer samples, and tested control beers modified with kefiran for anti-inflammatory and antiulcerogenic activities (Figs 4 and 5).

The increase in antiedematogenic effect of modified control beers with aqueous kefiran (Fig. 4B) suggests its major role in the anti-inflammatory activity observed with kefir beer (Fig. 1B). This is corroborated by the inhibitory activity found in animals treated with an autoclaved kefir beer (Fig. 4), as the steaming process is generally known to kill microorganisms and to promote heat denaturation of proteins.

As the fraction of aqueous kefir was able to reduce histamine-induced paw edema, we also test it in modified control beers for a plausible anti-ulcerogenic activity, but with an indomethacin pretreatment given to the animals (Fig. 5). This was done to investigate a plausible anti-ulcer mechanism for kefir beer related to prostaglandin regulation. The samples derived from kefir (modified control beers, autoclaved and kefir beers) reduced the wound areas of gastric lesions induced by ethanol, but with a lesser extent to those found in the absence of a previous treatment with indomethacin (Fig. 3). In fact, the relative wound areas of ethanol-induced ulcer for animals receiving or not indomethacin (Figs 5 and 2B) were different in the groups treated with control and kefir beers (two-way ANOVA,  $P < 0.001$ ), although similar to those treated with water and pantoprazole (Figs 5 and 2, two-way ANOVA,  $P > 0.05$ ).

It is worth noting that in the stomachs of the animals receiving a control beer modified with 10 mg/mL of aqueous kefir without the indomethacin pretreatment (Fig. 5, Cb10-I group), the ethanol-induced gastric lesions virtually disappeared, although giving off a strong ethanol stink.

An estimation of the level of carbohydrate polymers obtained from the smear of the gastric wall mucus of the treated animals was conducted after acid hydrolysis of the material following a reaction with 3,5-dinitrosalicylic acid to evaluate reducing sugars (Table 3). The results suggested a higher polymer content in the stomachs of the animals treated with kefir-based samples as compared to those receiving control beer or pantoprazole, although not correlated to the kefir levels (Table 3).

Indomethacin is well known to inhibit cyclooxygenases (COX-1 and COX-2) responsible for prostaglandin synthesis (Konturek & Pawlik, 1986), triggering events that could lead to gastric ulcers. At the dose that was administered in this work (5 mg/kg body weight), however, indomethacin is unable to cause such ulceration by itself, but enhances that caused by absolute ethanol (Konturek & Pawlik, 1986). Under these conditions, the kefir derivatives (regular, autoclaved and modified beers) seem to have lost the inhibitory effect observed in the group untreated previously with indomethacin (Figs 2B and 5). These findings suggest that the antiulcerogenic mechanism of action for the beers made with kefir or kefiran could be associated with the synthesis of prostaglandins, or reduction in its degradation.

In light of the health benefits that have been linked to the consumption of kefir drinks together with beer phenolics, the observation of increased synergistic effects between kefir and beer is encouraging, and should be further investigated in relation to potential health-promoting activities of probiotic beers. In this goal, other symbiotic colonies of bacteria and yeasts present in indigenous drinks distributed worldwide could also be used for the development of new probiotic beers, e.g., kombucha, boza, koumiss, and borde drinks (Schneedorf, 2014). As compared to these beverages and other probiotics, however, kefir presents apparent advantages as its low cost and facility to acquire starter grains, a quite simple condition for culture growth and maintenance without aseptic controls, high growth rate and biomass yield, the common presence of *S. cerevisiae*, and a broad spectrum of alleged probiotic activities.

## 5. Conclusion

In the present work, we prepared a beer fermented by kefir, and compared some of its anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities to those found separately in kefir souring molasses and craft beer, using rat paw carrageenan-induced edema and ethanol-induced ulcer as challenge models. The overall results suggest a synergistic effect of the kefir beer that involves the polyphenol content of barley malt together with some of the probiotic and prebiotic properties inherent to the kefir itself. Taking into account the increasing popularity of probiotics, this is the first time that a specialty beer produced by probiotics as single fermenter or by a bioactive isolated from its source has been reported and showed enhanced functional properties against inflammation and gastric ulcer compared to its constituents alone.

## Acknowledgements

The authors acknowledge the Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais – FAPEMIG, Brazil, for the financial support of this work.

## REFERENCES

- Bergmann, R. S. O., Pereira, M. A., Veiga, S. M., Schneedorf, J. M., Oliveira, N. M., & Fiorini, J. E. (2010). Microbial profile of a kefir sample preparations: Grains in natural and lyophilized and fermented suspension. *Food Science and Technology (Campinas)*, 30(4), 1022–1026. doi:10.1590/S0101-20612010000400029.
- Beutler, E. (1975). *Catalase in red cell metabolism: A manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton.
- Borgström, B., Dahlqvist, A., Lundh, G., & Sjövall, J. (1957). Studies of intestinal digestion and absorption in the human. *Journal of Clinical Investigation*, 36(10), 1521.
- Brucker, M. C., & Faucher, M. A. (1997). Pharmacologic management of common gastrointestinal health problems in women. *Journal of Nurse-Midwifery*, 42(3), 145–162.
- Campbell-Platt, G. (1994). Fermented foods – a world perspective. *Food Research International*, 27(3), 253–257.
- Cardoso, L. G., Ferreira, M. S., Schneedorf, J. M., & Carvalho, J. C. T. (2003). Evaluation of a soured kefir on intestinal motility of rats. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, 1(3), 107–109.
- Chan, F. K., & Leung, W. K. (2002). Peptic-ulcer disease. *The Lancet*, 360(9337), 933–941. doi:10.1016/S0140-6736(09)60938-7.
- Chen, Z., Shi, J., Yang, X., Nan, B., Liu, Y., & Wang, Z. (2015). Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produced by Tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 43, 15–21. doi:10.1016/j.idairyj.2014.10.004.
- Chiva-Blanch, G., Magraner, E., Condines, X., Valderas-Martínez, P., Roth, I., Arranz, S., & Estruch, R. (2015). Effects of alcohol and polyphenols from beer on atherosclerotic biomarkers in high cardiovascular risk men: A randomized feeding trial. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 25(1), 36–45. doi:10.1016/j.numecd.2014.07.008.
- Dietary Guidelines Advisory Committee (2010). Report of the dietary guidelines advisory committee on the dietary guidelines for Americans, 2010, to the Secretary of Agriculture

- and the Secretary of Health and Human Services. Agricultural Research Service.
- Diniz, R. O., Perazzo, F. F., Carvalho, J. C. T., & Schneenedorf, J. M. (2003). Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13, 19–20.
- Ebner, J., Arslan, A. A., Fedorova, M., Hoffmann, R., Küçükçetin, A., & Pischetsrieder, M. (2015). Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. *Journal of Proteomics*, 117, 41–57. doi:10.1016/j.jprot.2015.01.005.
- Fahmy, H. A., & Ismail, A. F. (2015). Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 144, 85–93. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.02.009.
- Farnworth, E. R. (2006). Kefir – A complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*, 2(1), 1–17.
- Farnworth, E. R., & Mainville, I. (2003). 4 Kefir – A fermented milk product. In *Handbook of fermented functional foods* (p. 77).
- Fathi, Y., Faghih, S., Zibaenezhad, M. J., & Tabatabaei, S. H. R. (2015). Kefir drink leads to a similar weight loss, compared with milk, in a dairy-rich non-energy-restricted diet in overweight or obese premenopausal women: A randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 1–10. doi:10.1007/s00394-015-0846-9.
- Ferk, F., Huber, W. W., Filipič, M., Bichler, J., Haslinger, E., Mišič, M., & Knasmüller, S. (2010). Xanthohumol, a prenylated flavonoid contained in beer, prevents the induction of preneoplastic lesions and DNA damage in liver and colon induced by the heterocyclic aromatic amine amino-3-methylimidazo [4, 5-f] quinoline (IQ). *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 691(1), 17–22.
- Gerhäuser, C. (2005). Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. *European Journal of Cancer*, 41(13), 1941–1954.
- Ghiselli, A., Natella, F., Guidi, A., Montanari, L., Fantozzi, P., & Scaccini, C. (2000). Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 11(2), 76–80.
- Gonzalez-Munoz, M. J., Meseguer, I., Sanchez-Reus, M. I., Schultz, A., Olivero, R., Benedí, J., & Sánchez-Muniz, F. J. (2008). Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food and Chemical Toxicology*, 46(3), 1111–1118.
- Guido, L. F., Curto, A. F., Boivin, P., Benismail, N., Gonçalves, C. R., & Barros, A. A. (2007). Correlation of malt quality parameters and beer flavor stability: Multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 728–733. doi:10.1021/jf0623079.
- Güven, A., & Gülmez, M. (2003). 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. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 50(8), 412–416.
- Holsapple, M. P., Schnur, M., & Yim, G. K. (1980). Pharmacological modulation of edema mediated by prostaglandin, serotonin and histamine. *Inflammation Research*, 10(4), 368–373.
- Jastrzebski, Z., Gorinstein, S., Czyżewska-Szafran, H., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Trakhtenberg, S., & Remiszewska, M. (2007). The effect of short-term lyophilized beer consumption on established hypertension in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45(2), 296–302.
- John, S. M., & Deeseenthum, S. (2015). Properties and benefits of kefir – A review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 37(3), 275–282.
- Karatzis, K., Rontoyanni, V. G., Protogerou, A. D., Georgoulia, A., Xenos, K., Chrysou, J., & Sidossis, L. S. (2013). Acute effects of beer on endothelial function and hemodynamics: A single-blind, crossover study in healthy volunteers. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 29(9), 1122–1126. doi:10.1016/j.nut.2013.02.016.
- Kondo, K. (2004). Beer and health: Preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. *Biofactors (Oxford, England)*, 22(1–4), 303–310. doi:10.1002/biof.5520220160.
- Konturek, S. J., & Pawlik, W. (1986). Physiology and pharmacology of prostaglandins. *Digestive Diseases and Sciences*, 31(2), 6S–19S.
- Laine, L., Takeuchi, K., & Tarnawski, A. (2008). Gastric mucosal defense and cytoprotection: Bench to bedside. *Gastroenterology*, 135(1), 41–60. doi:10.1053/j.gastro.2008.05.030.
- Legette, L. L., Luna, A. Y. M., Reed, R. L., Miranda, C. L., Bobe, G., Proteau, R. R., & Stevens, J. F. (2013). Xanthohumol lowers body weight and fasting plasma glucose in obese male Zucker fa/fa rats. *Phytochemistry*, 91, 236–241. doi:10.1016/j.phytochem.2012.04.018.
- Lu, J., Zhao, H., Chen, J., Fan, W., Dong, J., Kong, W., & Cai, G. (2007). Evolution of phenolic compounds and antioxidant activity during malting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10994–11001. doi:10.1021/jf0722710.
- Magalhães, K. T., Pereira, G. V., Campos, C. S., Dragone, G., & Schwan, F. (2011). Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(2), 693–702. doi:10.1590/S1517-83822011000200034.
- Maillard, M. N., Soum, M. H., Boivin, P., & Berset, C. (1996). Antioxidant activity of barley and malt: Relationship with phenolic content. *LWT – Food Science and Technology*, 29(3), 238–244. doi:10.1006/ftsl.1996.0035.
- Malfetheriner, P., Chan, F. K., & McColl, K. E. (2009). Peptic ulcer disease. *The Lancet*, 374(9699), 1449–1461. doi:10.1016/S0140-6736(09)60938-7.
- Mann, L. B., & Folts, J. D. (2004). Effects of ethanol and other constituents of alcoholic beverages on coronary heart disease: A review. *Pathophysiology*, 10(2), 105–112. doi:10.1016/j.pathophys.2003.10.011.
- Matsuno, K., Sasaki, N., & Okabe, S. (2000). Gastric acid secretion in dogs in response to combinations of beer, ethanol and peptone meal – The role of endogenous gastrin. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 14(s1), 109–115. doi:10.1046/j.1365-2036.2000.014s1109.x.
- Moreira, M. E. C., Santos, M. D., Zolini, G. P. P., Wouters, A. T. B., Carvalho, J. C. T., & Schneenedorf, J. M. (2008b). Anti-inflammatory and cicatrizing activities of a carbohydrate fraction isolated from sugary kefir. *Journal of Medicinal Food*, 11(2), 356–361.
- Moreira, M. E., Santos, M. H., Pereira, I. O., Ferraz, V., Barbosa, L. C., & Schneenedorf, J. M. (2008a). Anti-inflammatory activity of carbohydrate produced from aqueous fermentation of kefir. *Química Nova*, 31(7), 1738–1742.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., & Sukamoto, T. (1991). Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 57(4), 495–505. doi:10.1254/jjp.57.495.
- Nardini, M., Natella, F., Scaccini, C., & Ghiselli, A. (2006). Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(1), 14–22. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.03.026.
- Peskar, B. M., Lange, K., Hoppe, U., & Peskar, B. A. (1986). Ethanol stimulates formation of leukotriene C4 in rat gastric mucosa.

- Prostaglandins, 31(2), 283–293. doi:10.1016/0090-6980(86)90054-7.
- Pinto, C., Duque, A. L., Rodríguez-Galdón, B., Cestero, J. J., & Macías, P. (2012). Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3405–3412. doi:10.1016/j.fct.2012.07.035.
- Powell, J. E. (2006). Bacteriocins and bacteriocin producers present in kefir and kefir grains (Doctoral dissertation), Stellenbosch: University of Stellenbosch.
- Quiñer-Rada, P., Vallverdú-Queralt, A., Martínez-Huélamo, M., Chiva-Blanch, G., Jáuregui, O., Estruch, R., & Lamuela-Raventós, R. (2015). A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chemistry*, 169, 336–343. doi:10.1016/j.foodchem.2014.07.154.
- Rabi, D. M., Daskalopoulou, S. S., Padwal, R. S., Khan, N. A., Grover, S. A., Hackam, D. G., & Hamet, P. (2011). The 2011 Canadian Hypertension Education Program recommendations for the management of hypertension: Blood pressure measurement, diagnosis, assessment of risk, and therapy. *Canadian Journal of Cardiology*, 27(4), 415–433.
- Rodrigues, K. L., Caputo, L. R. G., Carvalho, J. C. T., Evangelista, J., & Schneedorf, J. M. (2005a). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(5), 404–408. doi:10.1016/j.ijantimicag.2004.09.020.
- Rodrigues, K. L., Carvalho, J. C. T., & Schneedorf, J. M. (2005b). Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. *Inflammopharmacology*, 13(5), 485–492.
- Sagradas, J., Costa, G., Figueirinha, A., Castel-Branco, M. M., Cabrita, A. M. S., Figueiredo, I. V., & Batista, M. T. (2015). Gastroprotective effect of *Cymbopogon citratus* infusion on acute ethanol-induced gastric lesions in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 134–138.
- Salga, M. S., Ali, H. M., Abdulla, M. A., & Abdelwahab, S. I. (2012). Gastroprotective activity and mechanism of novel dichlorido-zinc (II)-4-(2-(5-methoxybenzylideneamino) ethyl) piperazine-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceration. *Chemico-Biological Interactions*, 195(2), 144–153. doi:10.1016/j.cbi.2011.11.008.
- Schneedorf, J. M. (2012). Kefir D'Aqua and Its probiotic properties. In E. C. Rigobelo (Ed.), *Probiotic in animals*. Intech Open Access Publisher. 284 pp.
- Schneedorf, J. M. (2014). Oligosaccharides from ancient beverages fermented by symbiotic cultures. In L. S. Schweizer & S. J. Krebs (Eds.), *Oligosaccharides: Food sources, biological roles and health implications* (pp. 287–341). Nova York: NOVA Science Publishers, Inc.
- Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1998). Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 1003–1007.
- Sinet, P. M., Michelson, A. M., Bazin, A., Lejeune, J., & Jerome, H. (1975). Increase in glutathione peroxidase activity in erythrocytes from trisomy 21 subjects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 67(3), 910–915. doi:10.1016/0006.
- Srikanta, B. M., Sathisha, U. V., & Dharmesh, S. M. (2010). Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E 2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. *Biochimie*, 92(2), 194–203. doi:10.1016/j.biochi.2009.10.005.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160(1), 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- Winter, C. A., Risley, E. A., & Nuss, G. W. (1962). Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, 111(3), 544–547.
- Yeo, H. Q., & Liu, S. Q. (2014). An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(7), 1607–1618.
- Yoshikawa, T., Kimura, S., Hatano, T., Okamoto, K., Hayatsu, H., & Arimoto-Kobayashi, S. (2002). Pseudouridine, an antimutagenic substance in beer towards N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Food and Chemical Toxicology*, 40(8), 1165–1170. doi:10.1016/S0278-6915(02)00060-1.
- Zhao, H., Chen, W., Lu, J., & Zhao, M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. *Food Chemistry*, 119(3), 1150–1158. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.028.