

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA**

CARLA AZEVEDO BILAC

Kefir de leite: caracterização físico-química, composição da microbiota e atividade inibidora da bebida sobre bactérias patogênicas

BRASÍLIA, DF

2021

CARLA AZEVEDO BILAC

Kefir de leite: caracterização físico-química, composição da microbiota e atividade inibidora da bebida sobre bactérias patogênicas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
Co-orientadora: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF

2021

Bilac, Carla
BB595k Kefir de leite: caracterização físico-química,
composição da microbiota e atividade inibidora da
bebida sobre bactérias patogênicas / Carla Bilac;
orientador Daniela Orsi; coorientador Izabel
Silva. -- Brasília, 2021.
54 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -
Universidade de Brasília, 2021.

1. Atividade antimicrobiana. 2. Características
físico-químicas. 3. Potencial probiótico. 4.
Antagonismo microbiota kefir. I. Orsi, Daniela,
orient. II. Silva, Izabel, coorient. III. Título.

CARLA AZEVEDO BILAC

**Kefir de leite: caracterização físico-química, composição da microbiota e
atividade inibidora da bebida sobre bactérias patogênicas**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Prof. Dr. Alex Leite Pereira
(FCE/ Universidade de Brasília)

Farmacêutica Letícia Fernandes Silva Rodrigues
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2021

DEDICATÓRIA

Aos amores da minha vida, meus filhos Pedro e Arthur, meu esposo e amigo Marcelo, aos meus pais Zilma e Mario e minhas irmãs Patrícia, Leiliane e Lilian (in memorium).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proteger, guiar meus passos e iluminar minha caminhada.

A minha orientadora Daniela Orsi, por sua dedicação e incentivo durante toda a pesquisa, pela disposição em me orientar, esclarecendo minhas dúvidas e pelas sugestões que foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa. Pela oportunidade e confiança nesse projeto.

Aos meus pais, por me mostrarem que o sucesso é alcançado através da dedicação, pelo amor incondicional, pelo incentivo, pela formação do meu caráter e por me incentivarem a lutar pelos meus ideais.

Aos meus filhos, que alegrem a minha vida todos os dias, por serem pacientes e compreenderem minhas ausências nos momentos mais difíceis.

Ao meu esposo Marcelo Bilac, que me deu muita força e coragem, por me ajudar com seus conselhos, pela paciência nos momentos difíceis, pela compreensão, pelo cuidado com os nossos filhos na minha ausência e especialmente pelo seu amor e nossa grande amizade.

As minhas amigas Gabriela, Patrícia e Tayane, que mostraram verdadeiro valor da amizade, me apoiaram e torceram pelo meu sucesso. Construimos um grande vínculo, regada a uma boa comida, chocolate quente e risadas.

Aos professores da graduação que me forçaram a buscar novas metodologias de aprendizado, me proporcionando experiências únicas, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

E por fim a todos que contribuíram direta e indiretamente à minha pesquisa e formação durante a graduação.

RESUMO

O kefir é uma bebida fermentada de textura cremosa, sabor ácido e levemente gaseificada, produzida pela fermentação do leite por grãos de kefir. A composição microbiológica dos grãos de kefir consiste em bactérias lácticas, bactérias acéticas e leveduras, vivendo em uma comunidade simbiótica, que utiliza o leite como substrato e durante o processo de fermentação produz vários metabolitos como os ácidos láctico e acético, exopolissacarídeos, bacteriocinas, dentre outros. O kefir é mundialmente conhecido por seus benefícios a saúde, em especial por suas propriedades probióticas. O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos físico-químicos do kefir, a sua capacidade antimicrobiana durante o processo de fermentação, além de isolar seus microrganismos e testar a atividade antagonista contra cepas potencialmente patogênicas. Observou-se que durante o processo de fermentação do kefir, houve diminuição do pH do leite de 6,60 para 4,58-4,38 em 24 h. e para 3,74-3,60 em 48 h. As análises de acidez mostraram um aumento da concentração de ácido láctico nas amostras de kefir em relação ao leite (0,16%), com valores de 1,03-1,10% em 24 h. e 1,70-1,71% em 48 h. E houve diminuição dos açúcares redutores do leite de 5,12% para 4,66% em 24 h. e 2,72-2,73% em 48 h. Em relação à atividade antagonista do kefir, as amostras fermentadas em 24 h. não inibiram completamente o crescimento dos microrganismos patogênicos testados (*S. aureus*, *S. enterica*, *E. coli*). Porém as amostras de kefir fermentadas em 48 h. inibiram completamente o crescimento bacteriano dos microrganismos patogênicos, demonstrando uma potente atividade antagonista do kefir. No teste de antagonismo dos microrganismos isolados das amostras de kefir, parte das bactérias e leveduras mostraram atividade antagonista e capacidade de inibir tanto as cepas Gram-negativas (*S. enterica*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) quanto as cepas Gram-positivas (*S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*) potencialmente patogênicas testadas neste estudo. Alguns microrganismos isolados do kefir (7 cepas de 29 no total) apresentaram forte atividade antimicrobiana com zonas de inibição > 30 mm das bactérias potencialmente patogênicas testadas.

Palavras-chaves: Grãos de kefir; probióticos; composição microbiológica; antagonismo do kefir; atividade antimicrobiana

ABSTRACT

Kefir is a fermented drink with a creamy texture, acid flavor and slightly carbonated, produced by the fermentation of milk by kefir grains. The microbiological composition of kefir grains consists of lactic bacteria, acetic bacteria, and yeasts, living in a symbiotic community, which uses milk as a substrate and during the fermentation process produces various metabolites such as lactic and acetic acids, exopolysaccharides, bacteriocins, among others. Kefir is known worldwide for its health benefits, especially for its probiotic properties. The aim of this study was to evaluate the physical-chemical aspects of kefir, its antimicrobial capacity during the fermentation process, in addition to isolating its microorganisms to test antagonistic activity against potentially pathogenic strains. It was observed that during the fermentation process of kefir, there was a decrease in the pH of the milk from 6.60 to 4.58-4.38 in 24 h. and to 3.74-3.60 in 48 h. The acidity analyzes showed an increase in the concentration of lactic acid in the kefir samples in relation to milk (0.16%), with values of 1.03-1.10% in 24 h. and 1.70-1.71% in 48 h. And there was a decrease in the reducing sugars of milk from 5.12% to 4.66% in 24 h. and 2.72-2.73% in 48 h. Regarding the antagonist activity of kefir, samples fermented in 24 h. did not completely inhibit the growth of the pathogenic microorganisms tested (*S. aureus*, *S. enterica*, *E. coli*). However, samples of kefir fermented in 48 h. completely inhibited the bacterial growth of pathogenic microorganisms, demonstrating a potent antagonist activity of kefir. In the antagonism test of microorganisms isolated from kefir samples, part of the bacteria and yeasts showed antagonistic activity and the ability to inhibit both Gram-negative strains (*S. enterica*, *E. coli* and *K. pneumoniae*) and Gram-positive strains (*S. aureus*, *B. cereus* and *S. mutans*) potentially pathogenic tested in this study. Some microorganisms isolated from kefir (7 strains out of 29 in total) showed strong antimicrobial activity with zones of inhibition >30 mm from the potentially pathogenic bacteria tested.

Keywords: kefir grains, probiotics, microbiological composition, kefir antagonism, antimicrobial activity

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Semeadura em linha reta dos microrganismos isolados das amostras de kefir.....	23
Figura 2. Classificação da atividade inibitória dos microrganismos do kefir.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Microrganismos presentes no kefir	16
Tabela 2. Padrões físico-químicos do kefir	18
Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas do leite e das amostras de kefir de leite	27
Tabela 4. Microrganismos isolados das amostras de kefir	29
Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados do kefir contra cepas Gram-negativas	30
Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados do kefir contra cepas Gram-positivas	33
Tabela 7. Atividade inibidora do kefir sobre bactérias patogênicas durante o processo de fermentação	34

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Kefir: definições e origem.....	14
2.2 Grãos de kefir e microbiota	15
2.3 Características físico-químicas do kefir	17
2.4 Propriedades funcionais e terapêuticas do kefir.....	18
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral:	21
3.2 Objetivos específicos:	21
4 JUSTIFICATIVA	21
5 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5.1 Obtenção dos grãos de kefir	22
5.2 Armazenamento e ativação dos grãos de kefir	22
5.3 Caracterização físico-química das amostras de kefir.....	22
5.4 Isolamento dos microrganismos das amostras de kefir	23
5.5 Armazenamento e ativação dos microrganismos isolados das amostras de kefir	23
5.6 Estudo da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de kefir (teste de antagonismo in vitro)	24
5.7 Classificação da atividade inibitória dos microrganismos do kefir	25
5.8 Estudo da atividade antimicrobiana do kefir durante o processo de fermentação	26
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6.1 Análises físico-químicas do leite e das amostras de kefir.....	27
6.2 Isolamento dos microrganismos das amostras de kefir	28
6.3 Atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de kefir (teste de antagonismo in vitro)	29
6.4 Atividade antimicrobiana das amostras de kefir durante o processo de fermentação	34
CONCLUSÃO.....	36
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
8 ANEXOS.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus celsius
µL	Microlitro
ADNS	Ácido 3,5-Dinitrossalicílico
ANOVA	Análise de variância
APT	All Purpose Tween
ATCC	American Type Culture Collection
BAA	Bactérias do ácido acético
BAL	Bactérias do ácido láctico
BHI	Brain Heart Infusion
D.O	Densidade Óptica
EPS	Exopolissacarídeos
FAO	Food And Agriculture Organization
h	Horas
HS	Hestrin-Schamm
LB	Luria Bertani
m/m	Massa por massa
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
nm	Nanômetro
p/v	Peso por volume
pH	Potencial Hidrogeniônico
UFC	Unidades formadora de colônia
WHO	World Health Organization
YM	Yeast Malt

1 INTRODUÇÃO

A demanda por um estilo de vida mais saudável vem aumentando nos últimos anos, fazendo com que o consumidor busque não apenas atividades que promovam bem-estar, mas também mudanças nos hábitos alimentares, priorizando produtos que conferem benefícios e funcionalidades à saúde. Dentre os alimentos com características funcionais, os probióticos se destacam, pelo efeito positivo na modulação da microbiota intestinal (BOURRIE et al., 2016; DIAZ, et al., 2019; ZHAO, 2019).

Os probióticos são descritos como uma associação de microrganismo vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas, como parte de uma dieta, apresentam efeitos benéficos à saúde (BRASIL, 2018; JAMES; WANG, 2019). Dentre os alimentos funcionais contendo culturas vivas de microrganismos probióticos temos: iogurte, leite acidófilo, coalhada e kumys que integram o grupo de leites fermentados junto com o kefir (BRASIL, 2007), que por sua vez é considerado uma suplementação probiótica de baixo custo e de produção artesanal.

O kefir é uma bebida de sabor ácido e de textura cremosa, produzida no processo de fermentação láctica a partir do cultivo de grãos de kefir inoculados no leite. Esse produto é resultado do metabolismo de bactérias e leveduras presente nos grãos, que tem uma complexa mistura microbiana simbiótica. O kefir é classificado na categoria de leites fermentados, assim como o iogurte, e o que os diferem são algumas características nutricionais e sensoriais (BRASIL, 2018; REIS, 2015; ROSA et.al., 2017; SANTOS, 2008).

É uma bebida tradicional originária das montanhas do Cáucaso, localizadas na região da Europa Oriental, Rússia e Sudeste da Ásia (ARSLAN, 2015). Nos últimos anos, o consumo do kefir vem crescendo em muitos países. O produto é comercializado, por exemplo, nos Estados Unidos e em vários países da Europa e da Ásia (SANTOS, 2008).

O kefir é amplamente consumido devido as suas propriedades promotoras de saúde (LEITE et al., 2013), sendo que muitos desses benefícios foram atribuídos às atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva, antialérgica, redutora de colesterol, ao equilíbrio da microbiota, imunomoduladora (BOURRIE et al., 2016) e

antitumoral (HATMAL et al., 2018; REIS, 2015). No intuito de avaliar tais efeitos no organismo, o kefir está no foco de muitas pesquisas científicas já há algum tempo.

Os grãos de kefir tem uma forma irregular semelhante a couve-flor, essa biomassa é composta por uma complexa microbiota, que é responsável pela produção dos grãos. A comunidade microbiana é composta por bactérias do ácido láctico, bactérias do ácido acético e leveduras (LEITE et al., 2013), que trabalham em um equilíbrio dinâmico na biossíntese de exopolissacarídeos (EPS) e aminoácidos, levando a um aumento no volume dos grãos (BENGOA et al., 2019; DONG et al., 2018). A bebida final é resultado de uma composição nutricional rica em ácido láctico, ácido acético, dióxido de carbono, acetaldeído, diacetil, ácidos fórmicos, outros ácidos orgânicos e bacteriocinas (BENGOA et al., 2019; SANTOS, 2008), sendo todos produtos do metabolismo de bactérias e leveduras presentes nos grãos do kefir, sugerindo uma verdadeira simbiose (PRADO et al., 2015; WANG, 2018).

Vários estudos mostraram que o kefir possui atividade antimicrobiana, com a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos através do antagonismo, da alteração do pH e de seus metabólitos como os ácidos orgânicos (DIAS et al., 2008; SANTOS, et al., 2013; WESCHENFELDER et al., 2018).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Kefir: definições e origem

O kefir é uma bebida de consistência cremosa, semelhante ao iogurte, levemente efervescente, resultante da fermentação láctica e alcoólica por ação de microrganismos como bactérias do ácido láctico, bactérias acéticas e leveduras, presentes nos grãos de kefir (FARAG et al. 2020, BOURRIE et al. 2016). Segundo FAO/WHO (2003) o kefir é um leite fermentado produzido por uma cultura inicial a partir de grãos de kefir, com uma relação simbiótica forte entre as espécies dos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus kefiri*, *Leuconostoc*, *Acetobacter* e leveduras. Considerada uma bebida tradicional na Ásia e no Norte da Europa, diversos autores afirmam que a origem do kefir foi nas montanhas do Cáucaso, na Rússia, desde os tempos remotos onde essas terras eram habitadas pelos tártaros e povos caucasianos (NEJATI et al. 2020; KABAK, DOBSON, 2011; SAVASTANO et al. 2019). Entretanto,

estudos recentes em tumbas no cemitério de Xiaohe, na China, analisaram fragmentos de queijos encontrados nos artefatos dentro das tumbas, e descobriram que eram queijos de kefir, datados por carbono-14 entre 1650 e 1450 a.C. (YANG et al. 2014). Devido a suas propriedades promotoras de saúde, o kefir ocupa um lugar importante na dieta em muitas partes do mundo, em especial na Europa, Ásia e América do Norte. Na Rússia e EUA há produção industrial, no entanto, boa parte da produção se dá de forma artesanal (NEJATI et al. 2020).

A bebida de kefir é obtida após um período de incubação de grãos de kefir com leite fresco em temperatura ambiente. No processo ocorre um aumento dos grãos, possibilitando a recuperação e uma nova fermentação. Tradicionalmente a fermentação é iniciada pela adição de grãos de kefir em leite, numa proporção aproximada de 5 a 12% (p/v), e fermentado à 23-25°C por 24 horas (HAN et al., 2018; SILVA et al., 2019).

2.2 Grãos de kefir e microbiota

Os grãos de kefir apresentam uma matriz gelatinosa com forma irregular, branca ou levemente amarelada, suas estruturas são semelhantes ao couve-flor ou pipoca (ARYANA e OLSON, 2017). Os grãos encontram-se encapsulados por um complexo polissacarídeo que é secretado por microrganismos específicos durante o processo de fermentação. Esse complexo, é chamado de kerifan ou kefirano (HAN, WU, ZHAO, 2018).

Pesquisadores observaram a produção do kefirano durante a fermentação e constataram que cepas com características específicas de agregação microbiana, secretavam polímeros durante a síntese do kefirano, posteriormente, outros microrganismos se fixaram ao biofilme, deixando-o mais grosso e levando à formação do grão de kefir. Foi observado que o biofilme da matriz era constituído por glicose e galactose em uma proporção de 1: 1 (HAN, WU, ZHAO, 2018; WANG et al., 2012).

Dong et al. (2018) descobriram que as bactérias do ácido acético iniciavam a secreção do EPS, ativando as bactérias do ácido láctico, que por sua vez iniciaram auto agregação, produzindo uma grande quantidade de polissacarídeos e depois se fixaram ao biofilme, juntamente com as leveduras. Ao longo do processo de

fermentação esses microrganismos criaram uma rede complexa e após um equilíbrio dinâmico as cepas se distribuíram uniformemente pelos grãos.

Em um estudo com kefir Russo, os pesquisadores tentaram criar grãos de kefir e para isso foram separadas culturas puras isoladas do kefir que foram inoculadas separadamente, sendo observado a formação de agregados, no entanto, as culturas não foram capazes de formar grãos de kefir, demonstrando que a formação desses dependem das interações entre os microrganismos (KOTOVA, CHERDYNTSEVA, NETRUSOV, 2016).

A composição microbiológica dos grãos de kefir pode ser muito diversificada e dependerá da origem dos grãos, das condições de fermentação e dos métodos utilizados na produção do kefir (ARSLAN, 2015). Setyawardani et al. (2014) mostraram que diferentes concentrações de grãos de kefir (1, 3 e 5%) e diferentes pH de fermentação (5,5, 5,0 e 4,5) resultaram em diferentes características físico-químicas e organolépticas do kefir. Concluiu-se que a concentração de grãos de kefir de 1% e pH de 4,5 produziu o menor teor de álcool (0,28%) e teve o sabor e aroma preferido do kefir de leite de cabra, com base no teste de análise sensorial.

Os grãos de kefir tem uma população muito complexa de espécies microbianas identificadas conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos presentes no kefir

Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Acetobacter fabarum</i>	<i>Issatchenkia occidentalis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Acetobacter lovaniensis</i>	<i>Kazachstania aeróbia</i>
<i>Lactobacillus diolivorans</i>	<i>Acetobacter orientalis</i>	<i>Kazachstania exígua</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Kazachstania unispora</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>		<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>		<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Lactobacillus kefirii</i>		<i>Lachancea meyericii</i>
<i>Lactobacillus mali</i>		<i>Lachancea meyersii</i>
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>		<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>		<i>Pichia kudriavzevii</i>
<i>Lactobacillus parafarraginis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Lactobacillus parakefirii</i>		<i>Zygosaccharomyces cerevisiae</i>

*Lactobacillus perolens**Zygosaccharomyces unisporus**Lactobacillus plantarum**Lactobacillus satsumensis**Lactococcus lactis**Leuconostoc lactis**Leuconostoc mesenteroides*

Fonte: (DIOSMA et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; GAO et al., 2018; GAROFALO et al., 2015; HAN, 2018; LEITE et al., 2015; MAGALHAES et al., 2011; MIGUEL et al., 2011; VARDJAN et al., 2013; ZANIRATI et al., 2015; ZHOU et al., 2009).

Gao et al. (2018), demonstraram que em algumas amostras de kefir houve predominância da microbiota de leveduras, enquanto em outras foi de bactérias lácticas. Dados semelhantes foram observados por Zhou et al. (2009), nos quais bactérias lácticas representavam 78% de algumas amostras de kefir e as leveduras representavam quase 92% em outras amostras de kefir. Em outro estudo com grãos de kefir, os autores encontraram uma maior população de bactérias lácticas (97,5%) (ORYAN, ALEMZADEH, ESKANDARI, 2018). Mesmo ocorrendo essa variação entre os estudos, no geral as bactérias do ácido láctico são os microrganismos mais abundantes no kefir (EBNER et al., 2015; ERDOGAN et al., 2018). Plessas et al. (2017) observaram que as diferenças na composição da microbiota do kefir podem ocorrer devido as características particulares de cada região, inclusive da metodologia utilizada para identificação dos microrganismos.

2.3 Características físico-químicas do kefir

As características físico-químicas do kefir dependem de vários fatores como: tipo de leite utilizado, condições de fermentação (tempo e temperatura) e a quantidade de grãos inoculados no leite, que interferem nas concentrações dos metabólitos produzidos pelos microrganismos na bebida (ALVES et al., 2018; GUL et al., 2016). Setyawardani et al. (2014) observaram que diferentes concentrações de grãos de kefir (1, 3 e 5%) afetaram o teor de proteínas, gordura e álcool e interferiram no sabor e textura da bebida.

As propriedades físico-químicas do kefir foram analisadas por vários autores e esses observaram que a composição variou de 79,0-89,4% de umidade, 2,9-6,9% de proteínas, 1,7-2,9% de lipídios, 4,9-9,6% de açúcares, 0,6-1,0% de cinzas, 0,6-2,8% de ácido láctico, 0,38-0,59% de etanol e pH de 3,0-4,0 (ALVES et al., 2019; WESCHENFELDER et al., 2018; WINDAYANI, KURNIATI, LISTIAWATI, 2019).

A composição físico-química para o kefir recomendada pelo Regulamento Técnico de Identidade Qualidade de Leites Fermentados (BRASIL, 2007) e pela Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO/WHO, 2003) está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Padrões físico-químicos do kefir

Parâmetros	BRASIL (2007)	FAO/WHO (2003)
Proteínas (% m/m)	Min. 2,9%	Min. 2,7%
Gordura (% m/m)	3,0 a 5,9%	<10,0%
Ácido Láctico (% m/m)	<1,0%	Min. 0,6%
Etanol (% p/v)	0,5 a 1,5%	Não mencionado

Fonte: BRASIL, 2007; FAO/WHO, 2003

Entre os metabólitos do kefir estão os compostos voláteis, que são produtos de metabolismo lipídico, proteico e de carboidratos. Derli, Çon (2017) identificaram diversos compostos voláteis nas amostras de kefir pertencentes aos grupos dos ácidos, álcoois, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, cetonas e compostos de enxofre. As maiores concentrações desses compostos foram nos grupos do ácido carboxílico e do álcool e esses compostos conferem sabor e aroma únicos ao kefir.

Além dos compostos voláteis, o kefir contém proteínas parcialmente digeridas, bem como aminoácidos (valina, isoleucina, metionina, lisina, treonina, fenilalanina, triptofano), vitaminas (B1, B2, B5, B6, B9, C, A, K, caroteno) e minerais (potássio, cálcio, fosforo, magnésio, cobre, zinco, ferro, manganês, cobalto) (ARSLAN, 2015 apud LIUTKEVICIUS; SARKINAS, 2004).

2.4 Propriedades funcionais e terapêuticas do kefir

Os alimentos probióticos são encontrados em produtos como o kefir, que em síntese, possuem diversos efeitos promotores da saúde, descritos como uma associação de microrganismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas, como parte de uma dieta, apresentam efeitos benéficos à saúde (BRASIL, 2018; JAMES; WANG, 2019). Além disso, os microrganismos vivos devem ser tolerantes ao pH estomacal e intestinal, resistir as secreções gástricas, aderir a mucosa intestinal, colonizar e serem ativos metabolicamente (XIE, ZHOU, LI, 2012). Considerando isso, estudos in vivo, demonstraram que *Lactobacillus* e leveduras presentes no kefir foram encontrados em amostras fecais de camundongos, demonstrando a capacidade destes em resistirem ao trânsito gastrointestinal (ERDOGAN et al., 2018). Outro estudo com *Lactobacillus paracasei* isolado de kefir, simularam as condições gastrointestinais in vitro e observaram que as bactérias sobreviveram as condições de estresse ácido e biliar (BENGOA, et al., 2018), indicando uma resistência as secreções gastrointestinais (KIM et al, 2017).

Diversos estudos demonstraram as atividades probióticas do kefir, inclusive os seus efeitos protetores e moduladores diante de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* (SILVA et al., 2019; PLESSAS et al., 2017). Os peptídeos microbianos isolados do kefir, tiveram uma ação bacteriostática contra *Escherichia coli*. Além de fornecer condições favoráveis para a microbiota, o kefir inibe o aumento de bactérias patogênicas. A atividade inibidora, não está apenas nos microrganismos presentes no kefir, mas também em seus metabolitos e estudos demonstram que os ácidos orgânicos têm ação inibitória diante de bactérias patogênicas (IRAPORDA, 2017). No estudo KIM et al. (2015) foi avaliado o efeito do kefir em ratos e após 3 semanas de consumo do kefir incorporado na ração, houve uma redução de *Enterobacteriaceae* e *Proteobacteria* e um aumento de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e leveduras totais nas fezes dos ratos, sugerindo antagonismo dos microrganismos presentes no kefir contra *Enterobacteriaceae*.

Weschenfelder et al. (2018) analisaram cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e constataram que houve uma ação antagonista do kefir contra essas bactérias. Dias, et al. (2018) testaram a atividade antagonista de 60 microrganismos isolados de grãos de kefir, no qual 85% (51 microrganismos) apresentaram atividade inibitória para *E. coli*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*.

Os resultados demonstraram a sensibilidade dos patógenos diante da microbiota do kefir. Outros estudos também mostraram uma atividade antagonista da microbiota do kefir frente a microrganismos potencialmente patogênicos (ABDEL-MOGHEITH et al., 2017; ORYAN, ALEMZADEH, ESKANDARI, 2018)

Uma das características nutricionais encontradas no kefir é a fácil digestibilidade, além de ser uma excelente fonte de probiótico. O processo de fermentação aumenta a hidrólise de proteínas e libera peptídeos funcionais (LIMA et al., 2018). Pesquisadores relataram que a microbiota do kefir foi capaz de hidrolisar β e α -caseína do leite, porém não hidrolisou a β -lactoglobulina. Ainda observaram que as amostras de kefir apresentaram 609 peptídeos, destes 25 peptídeos foram classificados como funcionais com atividade biológica como antimicrobiano, anti-hipertensivo, imunomodulador, opioide e antioxidante (DALLAS et al., 2016).

As propriedades funcionais e probióticas do kefir são estudadas por diversos autores, além das atividades antimicrobianas eles também são classificados como anticarcinogênica (SHARIFI et al., 2017; HATMAL et al., 2018), anti-inflamatória (IRAPORDA et al., 2015), antiobesidade (BOURRIE et al., 2020), redutora de colesterol (SANTANA et al., 2016) e antioxidante (ROMANIN et al., 2016; ORYAN, ALEMZADEH, ESKANDARI, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos físico-químicos do kefir, a sua capacidade antimicrobiana durante o processo de fermentação, além de isolar seus microrganismos e testar a atividade antagonista contra cepas potencialmente patogênicas.

3.2 Objetivos específicos:

- Analisar aspectos físico-químicos das amostras de kefir;
- Isolar a microbiota presente no kefir e realizar testes de antagonismo in vitro com os microrganismos isolados;
- Determinar a atividade antimicrobiana do kefir.

4 JUSTIFICATIVA

Probióticos são microrganismos vivos que proporcionam benefícios à saúde, quando ingeridos em quantidades adequadas (BRASIL, 2018). Estudos mostram que uma microbiota saudável contribui com efeitos metabólicos e fisiológicos desejáveis à manutenção de um corpo saudável e em equilíbrio (BOURRIE et al., 2016; DIAZ, et al., 2019; JAMES, WANG, 2019; ZHAO, 2019). As numerosas vantagens relacionadas aos probióticos levam à um aumento de consumo de produtos que utilizam microrganismos vivos e que estão disponíveis em forma de suplementos e bebidas fermentadas, dentre eles destaca-se o kefir, muito conhecido mundialmente, mas que no Brasil, até pouco tempo, era novidade, mas vem se tornando cada vez mais popular entre os consumidores que buscam alimentos que apresentam efeitos benéficos à saúde. O kefir possui características nutricionais vantajosas, como a capacidade de equilibrar a microbiota intestinal e evitar que patógenos intestinais proliferem e exerçam seus efeitos prejudiciais.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos grãos de kefir

As duas amostras de grãos de kefir foram doadas por pessoas que mantêm culturas artesanais em casa. Para o processo de fermentação foi utilizado leite integral industrializado de um mesmo fabricante durante toda a pesquisa. As amostras foram nomeadas como Kefir 1 e Kefir 2.

5.2 Armazenamento e ativação dos grãos de kefir

Os grãos de kefir foram armazenados sob refrigeração (4 a 8°C) ou congelados (-20°C) em leite integral. Para a ativação dos grãos de kefir congelados (-20°C), em frascos autoclavados, os grãos na proporção de 10 a 15% (p/v) foram inoculados em leite integral e mantidos em estufa a 30°C por 5 dias. Para a ativação dos grãos de kefir mantidos sob refrigeração (4 a 8°C), em frascos autoclavados, os grãos na proporção de 10 a 15% (p/v) foram inoculados em leite integral e mantidos em estufa a 30°C por 3 dias. Após o processo de ativação, os grãos foram inoculados na proporção de 5% (p/v) em 100 mL leite integral e mantidos em estufa a 25°C por 24 h. Após, o produto foi refrigerado (4 a 8°C) por mais 24 h para a fermentação completa.

5.3 Caracterização físico-química das amostras de kefir

Para as análises físico-químicas, em frascos de vidro autoclavados foram acrescentados 100 mL de leite integral e 5 gramas de grãos de kefir, ou seja, 5% p/v. As amostras foram mantidas em estufa a 30°C por 24 h e 48 h. A determinação da concentração de ácido láctico foi feita por meio da acidez titulável (IAL, 2008); o pH foi medido com auxílio de um pHmetro digital calibrado Gehaka® modelo PG 1800 (AOAC, 2006). A medida da concentração de açúcares redutores foi realizada pelo método do ADNS (MILLER, 1959). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos através dos valores da média e desvio padrão. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado e quando as médias foram significativamente diferentes a $p < 0,05$, o teste de Tukey foi usado para

comparação das médias. Os dados foram analisados com uso do software STATISTICA®, versão 10.0.

5.4 Isolamento dos microrganismos das amostras de kefir

Foram utilizados meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias lácticas, leveduras e bactérias acéticas. Para o isolamento de bactérias lácticas foi usado o meio ágar All Purpose Tween (APT) (peptona de caseína 1%, extrato de levedura 0,75%, cloreto de sódio 0,5%, fosfato de sódio 0,5%, citrato de potássio 0,5%, glicose 1%, sulfato de magnésio 0,08%, cloreto de manganês 0,014%, sulfato ferroso 0,004%, carbonato de sódio 0,125% e ágar 2%, pH 6,7). Para o isolamento de bactérias acéticas foi usado o meio ágar Hestrin-Schamm (HS) (glicose 2%, ágar 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 0,5%, ácido cítrico 0,115%, fosfato de sódio dibásico anidro 0,27%, pH 5,0). E para o isolamento de leveduras foi usado o meio ágar Yeast Malt (YM) (extrato de malte 3%, peptona 0,5% e ágar 2%, pH 5,6).

Para o isolamento dos microrganismos das amostras de kefir, após a ativação dos grãos de kefir e fermentação do leite, foram feitas diluições seriadas do kefir (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). Para isso adicionou-se 25 mL de kefir em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v), em recipiente estéril (obtendo-se a diluição 10^{-1}) e após homogeneização da amostra adicionou-se 1 mL da diluição 10^{-1} em tubo esterilizado contendo 9 mL de água peptona 0,1% (p/v), obtendo-se a diluição 10^{-2} e assim por diante. A partir das diluições decimais foram pipetadas 0,1 mL de cada diluição em placas contendo os meios de cultivo APT, HS e YM e houve espalhamento do inóculo com uso de alça de Drigalsky. As placas foram incubadas em condições de aerobiose em estufa à 25°C por 24 h para APT e por 72 h para HS e YM. Então foi realizado o isolamento das colônias de distintas morfologias dos meios de cultivo para obtenção das culturas puras.

5.5 Armazenamento e ativação dos microrganismos isolados das amostras de kefir

As colônias puras foram transferidas para tubos Falcon contendo 20 mL leite integral esterilizado, incubadas em estufa à 25°C por 72 h e foram armazenadas congeladas a -20°C. Para a ativação das culturas puras, foram preparados caldo APT para as bactérias do ácido láctico, caldo HS para as bactérias do ácido acético e caldo YM para as leveduras. Os tubos contendo as bactérias congeladas foram incubados em estufa à 30°C por 24 h. Para ativação dos microrganismos isolados foram pipetados 1 mL das culturas puras em tubos com 9 mL do caldo apropriado (APT, HS ou YM). Após a homogeneização, os tubos foram incubados por 24 h à 25°C.

5.6 Estudo da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de kefir (teste de antagonismo in vitro)

O estudo da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de kefir (teste de antagonismo in vitro) foi realizado segundo metodologia descrita por Jacobsen et al. (1999), com adaptações. Para inocular os microrganismos isolados das amostras de kefir, após a ativação destes e com um auxílio de uma alça calibrada de 1 µL estéril, os microrganismos foram semeados na placa fazendo uma linha reta de um lado a outro no meio da placa (Figura 1). As placas de APT foram incubadas à 25°C de 24 a 48 h e as placas de HS e YM foram incubadas à 25°C por 72 h.



Figura 1. Semeadura em linha reta dos microrganismos isolados das amostras de kefir

As cepas potencialmente patogênicas utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175

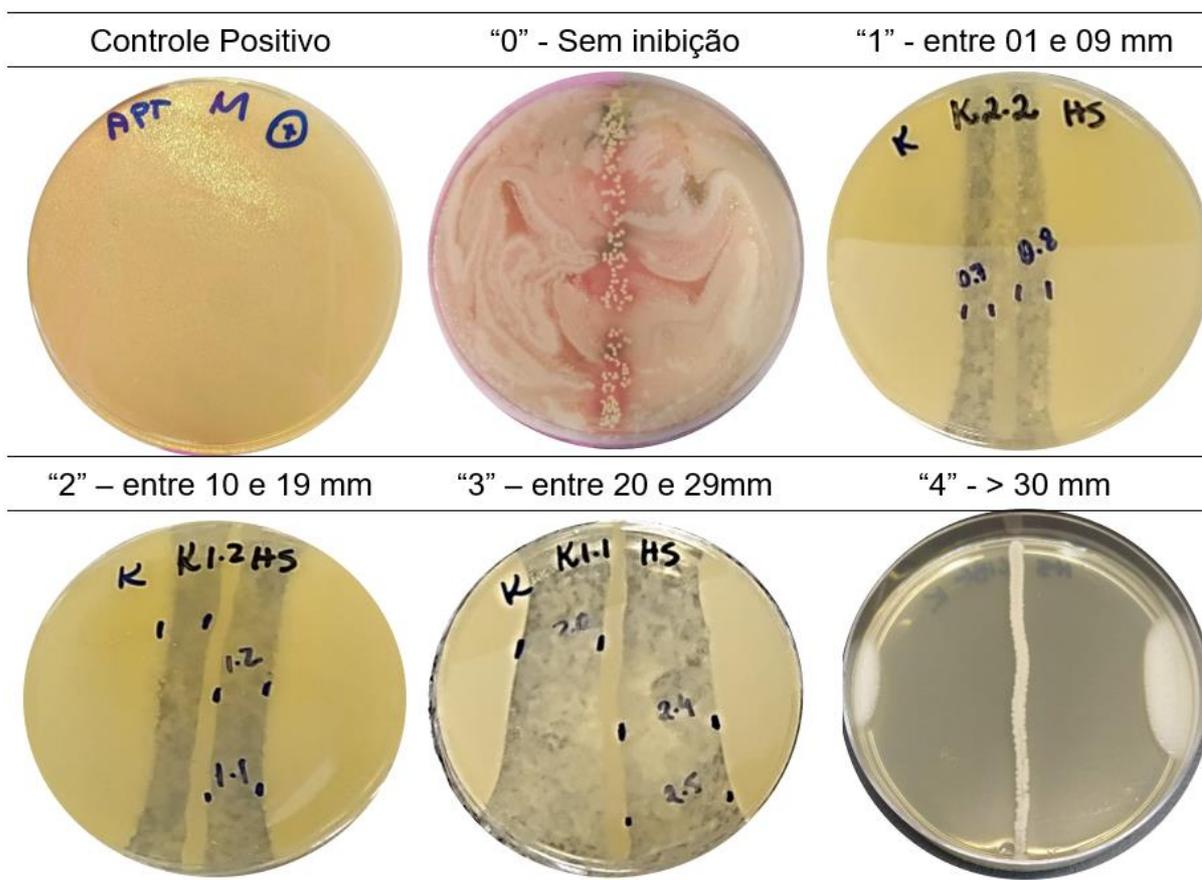
(Gram-positivas) e *Salmonella enterica* ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706 (Gram-negativas). Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,8 e 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro.

O volume de 50 µL de cada cepa ATCC foi misturado com 7 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 0,7% (p/v) de ágar bacteriológico. O caldo BHI acrescido de 0,7% de ágar bacteriológico foi autoclavado à 121°C por 15 minutos e após foi mantido em estufa à 45°C até o momento do uso, para evitar a gelificação. Essa mistura de ágar BHI e cepa ATCC foi vertida sobre as placas (APT, HS ou YM) contendo os microrganismos isolados das amostras de kefir, já crescidos na placa em forma de estria reta (Figura 1). As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h. As cepas ATCC foram inoculadas nos meios APT, HS e YM como controle positivo do crescimento bacteriano. Os testes foram realizados em duplicata.

5.7 Classificação da atividade inibitória dos microrganismos do kefir

Após 24 h de incubação mediu-se a zona de inibição da cepa ATCC ao redor do microrganismo isolado do kefir. Na classificação da atividade inibitória dos microrganismos do kefir, as zonas de inibição foram numeradas de 0 a 4, sendo “0” para os microrganismos do kefir que não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana, “1” para os microrganismos do kefir que apresentaram uma zona de inibição de 1 a 9 mm, “2” para 10 a 19 mm, “3” para 20 a 29 mm e “4” para os microrganismos do kefir com zona de inibição acima de 30 mm e para aqueles no qual a inibição foi total (Figura 2).

Figura 2. Classificação da atividade inibitória dos microrganismos do kefir



5.8 Estudo da atividade antimicrobiana do kefir durante o processo de fermentação

A atividade antimicrobiana foi estudada através do teste de antagonismo durante o processo de fermentação do kefir com cepas de bactérias ATCC. Os inóculos utilizados foram *S. aureus* ATCC 25923, *S. enterica* ATCC 14028 e *E. coli* ATCC 25922. Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ($1,0 \times 10^8$ UFC/mL) sendo ajustada entre 0,10 e 0,15 de densidade óptica (D.O) a 625 nm em espectrofotômetro. Os inóculos de cepas ATCC (1 mL) foram incubados junto com o Kefir 1 e o Kefir 2 (em frascos de vidro autoclavados foram acrescentados 100 mL de leite e 5 gramas de grãos de Kefir, ou seja, 5% p/v), em quintuplicata, e colocados para fermentar por 24 h e 48 h Após

incubação, foram realizadas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-4}), adicionando 25 mL de kefir em 225 mL de água peptonada 0,1% (10^{-1}) e a partir desta foram feitas diluições seriadas sucessivas com 1 mL da diluição anterior em tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1%. De cada diluição foi inoculado 0,1 mL em placas de meios seletivos (Ágar Sal Manitol para *S. aureus* e Ágar Mac Conkey para *S. enterica* e *E. coli*), para verificar a ação antimicrobiana durante o processo de fermentação do kefir sobre as bactérias ATCC. Os meios seletivos impediram o crescimento da microbiota do kefir.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análises físico-químicas do leite e das amostras de kefir

Os resultados das análises físico-químicas do leite e das amostras de kefir deste estudo estão apresentados na Tabela 1. Observou-se que durante o processo de fermentação, houve diminuição do pH do leite de 6,60 para 4,58-4,38 em 24 h e para 3,74-3,60 em 48 h.

Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas do leite e das amostras de kefir de leite

Variáveis	Leite		Kefir 1		Kefir 2	
	0 h	24 h	48 h	24 h	48 h	
pH	6,60±0,16 ^a	4,38±0,34 ^b	3,60±0,07 ^c	4,58±0,04 ^b	3,74±0,05 ^c	
Acidez Total (%)	0,16±0,00 ^a	1,03±0,53 ^b	1,71±0,10 ^c	1,10±0,35 ^d	1,70±0,10 ^c	
Açúcares redutores (%)	5,12±0,07 ^a	4,66±0,08 ^b	2,72±0,15 ^c	4,66±0,21 ^b	2,73±0,12 ^c	

Os resultados foram expressos como média de análises em triplicata. O valor de p calculado foi obtido por meio do teste de ANOVA não pareado. As médias na mesma linha com letras diferentes são significativamente diferentes a $p < 0,05$ de acordo com o teste de Tukey

O pH do leite foi de 6,60 e estava de acordo com o esperado para o leite de vaca, cujo valor deve ficar entre 6,60 e 6,80. Para o iogurte o valor do pH é de 4,50, no entanto, a legislação não define valores padrões de pH para o kefir (BRASIL, 2007). Windayani, Kurniati, Listiawati (2019) reportaram resultados similares e o pH de várias

amostras de kefir variou de 3,31 a 3,54 após 48 h de fermentação. Em outro estudo conduzido por Alves et al. (2018), o pH do kefir de leite, produzido de maneira artesanal em Viçosa, teve uma variação de 4,08 a 3,02.

As análises de acidez total mostraram um aumento da concentração de ácido láctico nas amostras de kefir em relação ao leite, atingindo valores elevados após 48 h de fermentação. Os resultados obtidos foram de 1,03-1,10% em 24 h e 1,70-1,71% em 48 h. O leite deste estudo teve uma acidez de 0,16% e estava de acordo com a legislação brasileira que estabelece que o leite de vaca deve ter uma concentração de ácido láctico entre 0,14 e 0,18% (BRASIL, 2018). Para o iogurte, a legislação brasileira estabelece os limites de ácido láctico entre 0,6 e 1,5%, e para o kefir o limite de ácido láctico é de no máximo 1% (BRASIL, 2007). Os resultados de ácido láctico encontrados nesse estudo para as amostras de kefir estavam acima do limite estabelecido na legislação. No entanto, outros trabalhos na literatura reportaram valores de ácido láctico semelhantes aos encontrados no nosso estudo. No estudo de Alves et al. (2018), o kefir de leite produzido de maneira artesanal em Viçosa teve uma concentração de ácido láctico entre 0,76 e 1,76%. E no trabalho de Alves et al. (2019) os resultados de duas amostras de kefir provenientes de diferentes domicílios de Votuporanga apresentaram uma concentração de ácido láctico mais elevada de 1,60% em 24 h e 2,20% 48 h de fermentação.

Observou-se que durante o processo de fermentação, houve diminuição dos açúcares redutores do leite de 5,12% para 4,66% em 24 h e 2,72-2,73% em 48 h. O teor de açúcares redutores de 5,12% do leite deste estudo estava dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, sendo o teor mínimo de lactose no leite de 4,30% (BRASIL, 2018). A lactose inicial do leite é um fator importante na qualidade do kefir, levando em consideração que esse açúcar é o principal substrato usado pela microbiota do kefir na metabolização em ácido láctico, formado durante a fermentação junto com outros metabólitos, tais como: ácido acético, vitaminas, etanol, acetaldeído, diacetil, dióxido de carbono e bacteriocinas, enriquecendo sensorial e nutricionalmente o produto (BENGOA et al., 2018).

6.2 Isolamento dos microrganismos das amostras de kefir

No total, 29 microrganismos foram isolados das amostras de kefir, sendo 17 cepas classificadas como bactérias do ácido láctico (BAL), 9 cepas classificadas como bactérias do ácido acético (BAA) e 3 cepas classificadas como leveduras (Tabela 4).

Tabela 4. Microrganismos isolados das amostras de kefir

Grupo de bactérias/ Meio de cultura	Número de cepas isoladas (%)
Bactérias lácticas (APT)	17 (58,6%)
Bactérias acéticas (HS)	9 (31,0%)
Leveduras (YM)	3 (10,4%)
Total	29 (100%)

As BAL representaram a maior população (58,6%) das amostras de kefir, enquanto as BAA e leveduras representaram 31% e 3%, respectivamente. As BAL são relatadas em muitos trabalhos como a população mais dominante no kefir de leite (DERLI e ÇON, 2017; GAO et al., 2016).

6.3 Atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados das amostras de kefir (teste de antagonismo in vitro)

A Tabela 5 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados do kefir contra as cepas Gram-negativas (*S. enterica* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706). Parte das bactérias e leveduras isoladas do kefir mostraram atividade antagonista e capacidade de inibir as cepas Gram-negativas potencialmente patogênicas testadas neste estudo. Para *E. coli*, dos 24 microrganismos do kefir testados, 25% não apresentaram atividade antimicrobiana e 75% apresentaram classificação 1, 2, 3 ou 4. Para *S. enterica*, dos 25 microrganismos do kefir testados, 28% não apresentaram atividade antimicrobiana e 72% apresentaram classificação 1, 2 ou 4. E para *K. pneumoniae*, dos 25 microrganismos do kefir testados, 48% não apresentaram atividade antimicrobiana e 52% apresentaram classificação 1, 2, 3 ou 4.

As bactérias lácticas que apresentaram antagonismo tiveram classificação 1 ou 2 para as cepas de Gram-negativas testadas. As bactérias acéticas que apresentaram antagonismo tiveram classificação 2, 3 ou 4 para as cepas de Gram-negativas testadas. E a maioria das leveduras que apresentaram antagonismo tiveram classificação 1 para as cepas de Gram-negativas testadas. Assim as bactérias acéticas foram as inibidoras mais potentes das cepas Gram-negativas testadas.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados do kefir contra cepas Gram-negativas

Classificação	Antagonismo <i>E. coli</i> n (%)			Total
	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras	
0	4 (16,7%)	2 (8,3%)	0	6 (25,0%)
1	7 (29,3%)	0	2 (8,3%)	9 (37,6%)
2	5 (20,9%)	1 (4,1%)	0	6 (25,0%)
3	0	2 (8,3%)	0	2 (8,3%)
4	0	1 (4,1%)	0	1 (4,1%)
Total	16	6	2	24 (100%)
Classificação	Antagonismo <i>S. enterica</i> n (%)			Total
	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras	
0	5 (20,0%)	2 (8,0%)	0	7 (28,0%)
1	6 (24,0%)	0	2 (8,0%)	8 (32,0%)
2	5 (20,0%)	2 (8,0%)	1 (4,0%)	8 (32,0%)
3	0	0	0	0
4	0	2 (8,0%)	0	2 (8,0%)
Total	16	6	3	25 (100%)
Classificação	Antagonismo <i>K. pneumoniae</i> n (%)			Total
	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras	
0	9 (36,0%)	2 (8,0%)	1 (4,0%)	12 (48,0%)
1	3 (12,0%)	0	2 (8,0%)	5 (20,0%)
2	4 (16,0%)	2 (8,0%)	0	6 (24,0%)
3	0	1 (4,0%)	0	1 (4,0%)
4	0	1 (4,0%)	0	1 (4,0%)
Total	16	6	3	25 (100%)

0 = sem inibição; 1 = zona de inibição com valores de 1-9 mm; 2 = zona de inibição de 10-19 mm; 3 = zona de inibição de 20-29 mm; 4 = zona de inibição com valores acima de 30 mm.

Resultados similares ao nosso estudo foram reportados para atividade antagonista de bactérias lácticas em relação a bactérias Gram-negativas. Yerlikaya e Akbulut (2018) testaram a atividade antagonista de *Lactobacillus lactis* e obtiveram

halos de inibição do crescimento de *S. enterica* e de *E. coli* variando de 9 a 16 mm. No estudo de Ul-Sadat et al. (2020), cepas de *Lactobacillus* foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* com halos de inibição de 20 a 30 mm. Leite et al. (2015), testaram 32 bactérias isoladas do kefir, classificadas como *Lactobacillus*, sendo que 23 cepas apresentaram inibição contra *E. coli* e 22 cepas apresentaram inibição contra *S. enterica*.

As bactérias do ácido láctico possuem propriedades antimicrobianas, inibindo o crescimento de cepas patogênicas. Durante a fermentação do kefir, ocorre a síntese de muito metabólitos como os ácidos orgânicos, em especial o ácido láctico, além de bacteriocinas, exopolissacarídeos (EPS) e novos peptídeos e todos esses metabólicos apresentam propriedades antimicrobianas contra cepas patogênicas (LEITE et al., 2015; IRAPORDA et al. 2017)

As bactérias do kefir são conhecidas pela síntese de EPS que são descritos por vários autores como produtos sintetizados pelas bactérias durante a produção dos grãos de kefir (KIM et al., 2015; YERLIKAYA, AKBULUT, 2020). Para avaliar a propriedade antibacteriana desses EPS, Jeong et al. (2017) isolaram 22 cepas de BAL e purificaram os EPS produzidos por elas, removendo restos celulares e proteínas para melhor investigar a atividade inibitória desses EPS purificados. Foi observado que *Listeria monocytogenes* e *S. enterica* foram completamente inibidas em caldo nutritivo suplementado com 1 a 2,5% dos EPS. Campana, Hemert, Baffone (2017), analisaram as propriedades antimicrobianas de sobrenadantes de BAL livres de células e as cepas de *S. enterica* e *E. coli* apresentaram zonas de inibição de 10 a 12 mm, assim, esse resultado demonstrou que os metabólitos das bactérias lácticas têm efeitos antibacterianos.

Miao et al. (2014), relataram uma nova bacteriocina produzida por *Lactobacillus paracasei*, que era um peptídeo que foi isolado do kefir tibetano e testado contra *E. coli*. Os resultados demonstraram que o peptídeo exerceu efeitos antimicrobianos, aumentando a permeabilidade da membrana interna de *E. coli*, causando danos à célula, promovendo o vazamento de material intracelular e ainda o peptídeo foi capaz de se ligar ao DNA genômico interferindo nas funções celulares, e levando à morte celular.

Além das BAL, as leveduras também são estudadas pelas suas propriedades probióticas e antagonistas. No estudo conduzido por Lima et al. (2017), os autores

analisaram a capacidade antagonista de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e obtiveram resultados de inibição contra *Klebsiella pneumoniae* (halos de inibição de 15,7 a 47,4 mm) e *Pseudomonas aeruginosa* (halos de inibição de 13,2 a 37,2 mm), além de comprovarem sua capacidade de resistência ao trato gastrointestinal em ratos, entre outras atividades.

As bactérias do ácido acético (BAA) do nosso estudo foram as inibidoras mais potentes das cepas Gram-negativas testadas. Embora alguns autores relatem a ausência das bactérias acéticas em algumas amostras de kefir de diferentes regiões no mundo, o kefir coreano apresenta uma abundância de BAA na composição da sua microbiota (PLESSAS et al., 2017; GARAFALO et al., 2015; KIM et al. 2014). Kim et al. (2019), isolaram BAA do kefir coreano e testaram contra patógenos, e observaram uma inibição parcial contra *E. coli* e *S. enterica*. No estudo Haghshenas et al. (2015), os autores isolaram BAA de leites fermentados e observaram a presença de halos de inibição que variavam entre 11,7 e 22,3 mm contras diversas cepas patogênicas. Segundo Haghshenas et al. (2015), as propriedades antagonistas das BAA podem estar relacionadas à produção de ácido acético, que apresenta maior atividade antimicrobiana do que o ácido láctico. Esses ácidos orgânicos induzem a morte celular por meio de diferentes mecanismos, como o aumento da permeabilidade da membrana celular e interrupção de outras funções celulares, incluindo biossíntese e geração de energia.

A Tabela 6 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados do kefir contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus mutans* ATCC 25175 e *Bacillus cereus* ATCC 14579). Para *S. aureus*, dos 24 microrganismos do kefir testados, 29,2% não apresentaram atividade antimicrobiana e 70,8% apresentaram classificação 1, 2, 3 ou 4. Para *B. cereus*, dos 22 microrganismos do kefir testados, 22,7% não apresentaram atividade antimicrobiana e 77,3% apresentaram classificação 1, 2, 3 ou 4. E para *S. mutans*, dos 25 microrganismos do kefir testados, 24% não apresentaram atividade antimicrobiana e 76% apresentaram classificação 1, 2 ou 3.

Tabela 6. Atividade antimicrobiana dos microrganismos isolados do kefir contra cepas Gram-positivas

Classificação	Antagonismo <i>S. aureus</i> n (%)			
	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras	Total
0	5 (20,9%)	2 (8,3%)	0	7 (29,2%)
1	8 (33,4%)	0	2 (8,3%)	10 (41,7%)
2	2 (8,3%)	1 (4,2%)	1 (4,2%)	4 (16,7%)
3	0	2 (8,3%)	0	2 (8,3%)
4	0	1 (4,1%)	0	1 (4,1%)
Total	15	6	3	24 (100%)
Classificação	Antagonismo <i>B. cereus</i> n (%)			
	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras	Total
0	4 (18,1%)	0	1 (4,6%)	5 (22,7%)
1	5 (22,7%)	0	1 (4,6%)	6 (27,3%)
2	2 (9,1%)	0	1 (4,6%)	3 (13,6%)
3	4 (18,1%)	2 (9,1%)	0	6 (27,3%)
4	0	2 (9,1%)	0	2 (9,1%)
Total	15	4	3	22 (100%)
Classificação	Antagonismo <i>S. mutans</i> n (%)			
	Bactérias lácticas	Bactérias acéticas	Leveduras	Total
0	4 (16,0%)	1 (4,0%)	1 (4,0%)	6 (24,0%)
1	6 (24,0%)	0	2 (8,0%)	8 (32,0%)
2	5 (20,0%)	1 (4,0%)	0	6 (24,0%)
3	1 (4,0%)	4 (16,0%)	0	5 (20,0%)
4	0	0	0	0
Total	16	6	3	25 (100%)

0 = sem inibição; 1 = zona de inibição com valores de 1-9 mm; 2 = zona de inibição de 10 -19 mm; 3 = zona de inibição de 20-29 mm; 4 = zona de inibição com valores acima de 30 mm.

Outros estudos reportaram a atividade antagonista de bactérias isoladas do kefir contra bactérias patogênicas Gram-positivas. Ghasempour et al. (2013) compararam as zonas de inibição de *S. mutans* entre clorexidina 0,2%, penicilina e o kefir e observaram a presença de halos de inibição de 27,38 mm para clorexidina 0,2%, 43,29 mm para penicilina e 19,88 mm para o kefir. Os autores concluíram que o kefir pode ser usado como um aliado na prevenção da carie causada pelo *S. mutans*. No estudo de Dias et al. (2018), dos 60 microrganismos isolados do kefir, 56 foram positivos no teste de antagonismo contra *S. aureus*.

No estudo de Lima et al. (2017), cepas de *S. cerevisiae* isoladas de kefir foram testadas contra *S. aureus* e apresentaram halos de inibição de 15 a 35 mm, por outro lado, os autores observaram que as leveduras não apresentaram antagonismo contra *B. cereus*, contrastando com o nosso estudo, dentre as bactérias Gram-positivas, foi a que apresentou maior sensibilidade aos microrganismos do kefir.

No estudo de Kim et al. (2019), bactérias acéticas isoladas de um kefir coreano foram testadas contra *B. cereus* e foram capazes de inibir o crescimento total do *B. cereus*. No estudo de Kakisu et al. (2007), *B. cereus* foi inoculado durante o processo de fermentação do kefir de leite e os autores observaram um decréscimo na população do *B. cereus*, atribuindo tais resultados a queda do pH e altas concentrações de ácidos orgânicos, além disso, durante o processo de fermentação do kefir, a microbiota competitiva foi capaz impedir a produção de enterotoxinas pelo *B. cereus*.

6.4 Atividade antimicrobiana das amostras de kefir durante o processo de fermentação

A Tabela 7 apresenta a atividade antimicrobiana das amostras de kefir, que foram testadas em relação a sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados das amostras de fermentação de 48 h não apresentaram crescimento bacteriano, demonstrando inibição total dos microrganismos patogênicos. Os resultados obtidos nesse trabalho corroboram com outros estudos da literatura (DIAS et al., 2018; SANTOS et al., 2013; WESCHENFELDER et al., 2018).

Tabela 7. Atividade inibidora do kefir sobre bactérias patogênicas durante o processo de fermentação

Amostras de Kefir	Repetição	<i>S. enterica</i>			<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>		
		0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h	0 h	24 h	48 h
	1	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	2	+	+	-	+	+	-	+	+	-

Kefir 1	3	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	4	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	5	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Kefir 2	1	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	2	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	3	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	4	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	5	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Controle positivo		++	++	++	++	++	++	++	++	++
Controle negativo		-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) = amostra com crescimento bacteriano; (++) = amostra com maior crescimento bacteriano em relação a amostra (+); (-) = amostra sem crescimento bacteriano; Controle positivo = elaborado com leite ausente de grãos de Kefir e com inóculos patogênicos; Controle negativo = elaborado com leite contendo grãos de Kefir e ausente de inóculos patogênicos.

Nos resultados, todas as amostras com fermentação de 24 horas apresentaram crescimento de microrganismos patogênicos após serem plaqueadas em meio Ágar Mac Conkey para *Salmonella* e *E. coli* e em meio Ágar Sal Manitol para *S. aureus*, mas quando comparados com o controle positivo esse crescimento foi menor. Em seus estudos, Weschenfelder et al. (2018) e Kivanc, Yapici (2018), também observaram uma redução na concentração de microrganismos patogênicos em 24 horas de fermentação de duas formulações distintas de Kefir no estudo de atividade antagonista frente a *S. aureus* e *E. coli*.

Vários estudos demonstraram a capacidade de inibição dos microrganismos patogênicos quando expostos a microbiota presente no kefir de leite e explicaram que tal inibição foi decorrente do pH ácido da bebida que exerceu a atividade antibacteriana. De acordo com Dias et al. (2018), além do pH ácido do kefir, as substâncias resultantes do metabolismo das bactérias durante o processo de fermentação (como bacteriocinas) são fatores de inibição. Outros estudos que

controlaram o pH em 6,0 durante todo o processo de fermentação do kefir, observaram que as inibições não ocorreram em função do pH ácido, mas sim por substâncias inibidoras, como bacteriocinas e ácidos orgânicos, presentes na bebida fermentada à base de leite e grãos de kefir (SANTOS, 2013; SANTOS et al., 2008; ARSLAN, 2015. SETYAWARDANI et al. 2014).

Assim, nesse estudo foi possível demonstrar que frente a um ambiente competitivo com uma população de diversos microrganismos vivendo em simbiose nos grãos de kefir de leite, a atividades das bactérias potencialmente patogênicas foram inibidas, demonstrando a atividade antagonista do kefir.

CONCLUSÃO

No presente estudo foram realizadas análises físico-químicas e determinação da atividade antimicrobiana de duas amostras de kefir de leite. A fermentação das amostras de kefir em 24 h apresentaram pH de 4,38-4,58, próximo ao do iogurte (4,50) e estavam com menor acidez. Em relação à atividade antagonista do kefir, as amostras fermentadas em 24 h não inibiram completamente o crescimento dos microrganismos patogênicos testados (*S. aureus*, *S. enterica*, *E. coli*), mas houve diminuição do crescimento bacteriano em relação ao controle positivo, onde o leite ausente de grãos de kefir foi inoculado com as cepas patogênicas. Já as amostras de kefir fermentadas em 48 h, apresentaram maior acidez e pH menor de 3,60-3,74. Essas amostras de kefir inibiram completamente o crescimento bacteriano dos microrganismos patogênicos, demonstrando uma potente atividade antagonista do kefir.

No teste de antagonismo dos microrganismos isolados das amostras de kefir, parte das bactérias e leveduras mostraram atividade antagonista e capacidade de inibir tanto as cepas Gram-negativas (*S. enterica*, *E. coli* e *K. pneumoniae*) quanto as cepas Gram-positivas (*S. aureus*, *B. cereus* e *S. mutans*) potencialmente patogênicas testadas neste estudo. Das bactérias Gram-negativas testadas a mais sensível foi *E. coli* e das Gram-positivas testadas a mais sensível foi *B. cereus*. A bactéria que apresentou menor sensibilidade foi *K. pneumoniae*, porém ainda assim mais de 50% das cepas isoladas do kefir mostram antagonismo contra *K. pneumoniae*. O estudo do antagonismo das cepas isoladas, fora do seu ambiente simbiótico no kefir, foi

importante para avaliar a capacidade antimicrobiana individual de cada cepa. O resultado do estudo mostrou que algumas cepas possuem potente atividade antagonista e mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo da atividade antimicrobiana. E na atualidade com o aumento de bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos, é de suma importância explorar novas alternativas antimicrobianas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MOGHEITH, S. et al. Exploring the antimicrobial and hepatoprotective effects of kefir; a probiotic fermented milk. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 11 n. 2, 2018.

ALVES, R. et al. Avaliação físico-química do leite fermentado de kefir produzido de maneira artesanal em Viçosa. **Revista Científica Univiçosa**, v. 10 n.1, 2018.

ALVES, J. et al. Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de kefir coletado em diferentes domicílios frente a cepas de Escherichia coli NEWP 0022. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 22 n. 2 p. 165-177, 2019.

ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA – Journal of Food**, v.13, n. 3, p. 340-345, 2015.

ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: yogurt and other cultured dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 100 n. 12 p. 9987-10013, 2017.

BENGOA, A. A. et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126 n. 3 p. 686-700, 2019.

BENGOA, A. A. et al. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of Lactobacillus paracasei strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. **Food Research International**, v. 103 p. 462-467, 2018.

BOURRIE, B. C. T. et al. The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. **Frontiers in Microbiology**. v. 7 n. 647, p. 1-17, 2016.

BOURRIE, B. C. T. et al. Kefir microbial composition is a deciding factor in the physiological impact of kefir in a mouse model of obesity. **British Journal of Nutrition**, v. 20 p. 1-10, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Diário Oficial da União. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 46, de 23 de outubro de 2007**. Adota o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União. 2007.

CAMPANA, R. HEMERT, S. BAFFONE, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 12, 2017.

DALLAS, D. C. et al. Peptidomic analysis reveals proteolytic activity of kefir microorganisms on bovine milk proteins. **Food Chemistry**, v. 197, p. 273– 284, 2016.

DERLI, E. ÇON, A. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **Food Science and Technology**, v. 85 p. 151-157, 2017.

DIAS, P. et al. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de Kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1-8, 2018.

DIAZ, J. et al. Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**. v. 10, n. 1, p. 49-66, 2019.

DIOSMA, G. Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic Characterization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 43-53, 2013.

DONG, J. et al. The biofilm hypothesis: The formation mechanism of Tibetan kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, p. 44-50, 2018.

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.18 n.117 p. 41-57, 2015.

ERDOGAN, F.S. et al. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. **Food Research International**, v. 115 p. 408-413, 2018.

FARAG, M. A. et al. The many faces of kefir fermented dairy products: quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. **Nutrients**, v.12 n. 2 p. 346, 2020.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). Codex Standard for Fermented Milks, n°. 243 p. 1-11, 2003. Washington. Disponível em: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>. Acesso em: 15 outubro 2020.

FERREIRA, Z.D. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32 p. 70–76, 2015.

GAO, J. et al. Kefir: composição e avaliação da atividade antagonista in loco frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49 n. 3 p. 450-457, 2018.

GARAFALO, et al. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**. v. 49 p. 123-133, 2015.

GHASEMPOUR M, et al. Comparison of the Effect of Probiotic Yogurt-Drink Kefir, % 0.2 Chlorhexidine and % 0.2 Sodium Fluoride Mouthwashes on *Streptococcus Mutans*: An In vitro Study. **Journal of Babol University of Medical Sciences**. v. 15 n. 6 p. 12-18, 2013.

GUL, O. et al. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1517–1525, 2015.

HAGHSHENAS, B. et al. Potentially probiotic acetic acid bacteria isolation and identification from traditional dairies microbiota. **Food Science Technology**. n. 50 p. 1056-1064, 2015.

HAN, X., WU, HY., ZHAO, LJ. Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.111 p. 2361–2370, 2018.

HATMAL, M. et al. Exploring the influence of culture conditions on kefir's anticancer properties. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, 2018.

IRAPORDA, C. et al. Biological activity of the non-microbial fraction of kefir: antagonism against intestinal pathogens. **Journal of Dairy Research**, v. 84 p. 339–345. 2017.

IRAPORDA, C. et al. Lactate and short chain fatty acids produced by microbial fermentation downregulate proinflammatory responses in intestinal epithelial cells and myeloid cells. **Immunobiology**, v. 220, n. 10, p. 1161-1169, 2015.

JACOBSEN, C. et al. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.11, p. 4949–4956,1999.

JAMES, A; WANG, Y. Characterization, health benefits and applications of fruits and vegetable probiotics. **CyTA – Journal of Food**, v. 17, n. 1, p. 770-780, 2019.

JEONG, D. et al. Characterization and antibacterial activity of a novel exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* DN1 isolated from kefir. **Food Control**. v. 78 p. 436-442, 2017.

KAKISU, E. et al. Inhibition of *Bacillus cereus* in milk fermented with kefir grains. **Journal of Food Protection**. v. 70, n. 11, p. 2613-2616, 2007.

KIM, DH. et al. Detection and enumeration of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast in kefir grain and milk using quantitative real-time PCR. **Journal Food Safety**. 2014.

KIM, DH. et al. Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, p.1397–1403, 2015.

KIM, DH. et al. Dual function of *Lactobacillus kefir* DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR- α in adipose tissue. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, p.11, 2017.

KIM, DH. et al. Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 59 n. 11, 2019

KIVANC, M. YAPICI, E. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during the fermentation and storage of kefir. **Food Science and Technology**. v. 39 n. 1, 2018.

KOTOVA, I.B., CHERDYNTSEVA T.A., NETRUSOV A.I. Russian Kefir Grains Microbial Composition and Its Changes during Production Process. **Advances in Microbiology**, n. 932, 2016.

LEITE, A. et al. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 341-349, 2013.

LEITE, A. et al. S. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 98 p. 3622–3632, 2015.

LIMA, M. et al. *Saccharomyces cerevisiae* from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. **Microbial Pathogenesis**. v. 110 p. 670-677, 2017.

LIMA, M. et al. Brazilian kefir-fermented sheep's milk, a source of antimicrobial and antioxidant peptides. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10 p. 446-455, 2018.

KABAK, B & DOBSON, A. An Introduction to the traditional fermented foods and beverages of Turkey, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51 n. 3 p. 248-260, 2011.

MAGALHAES, K.T. et al. Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42 p. 693–702, 2011.

MIAO, J. et al. Inhibitory effects of a novel antimicrobial peptide from kefir against *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 42, p. 48-53, 2014.

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

NEJATI, F. et al. Big world in small grain: a review of natural milk kefir starters. **Microorganisms**, v. 8 p.192, 2020.

ORYAN, A., ALEMZADEH, E. & ESKANDARI, M.H. Kefir accelerates burn wound healing through inducing fibroblast cell migration in vitro and modulating the expression

of IL-1 β , TGF- β 1, and bFGF genes in vivo. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11 p. 874–886, 2019.

PLESSAS, S. et al. Microbiological exploration of different types of kefir grains. **Fermentation**, v. 3, n. 1 p. 1-1, 2017.

PRADO, M. et al. Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1177-1177, 2015.

REIS, S. **Efeito do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar**. 2015. 91 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

ROMANIN, D.E. et al. Probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus* CIDCA 8154 shows anti-inflammatory and anti-oxidative stress properties in vivo models. **Beneficial Microbes**, v. 7 n. 1 p. 83-93, 2016.

ROSA, D. et al. Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**. v.30, p. 82-96, 2017.

SANTANNA, AF. et al. Chronic administration of the soluble, nonbacterial fraction of kefir attenuates lipid deposition in LDLr/ mice. **Nutrition**. v. 35 p. 100-105, 2016.

SANTOS, J. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas**. 2008. 50 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos Viçosa, 2008.

SANTOS, J. et al. Evaluation of antagonistic activity of milk fermented with kefir grains of different origins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 56, p. 823-827, 2013.

SAVASTANO, M.L. et al. Influence of the production technology on kefir characteristics: evaluation of microbiological aspects and profiling of phosphopeptides. **Food Research International**, v. 129 p. 108853, 2019.

SETYAWARDANI, T. et al. Physiochemical and organoleptic features of goat milk kefir made of different kefir grain concentration on controlled fermentation. **Animal Production**, v. 16 n. 1, 2014.

SHARIFI, M. et al. A. Kefir: um poderoso probiótico com propriedades anticâncer. **Medical Oncology**, v. 34 p.183, 2017.

SILVA, M.A. et al. Kefir ameliorates hypertension via gut–brain mechanisms in spontaneously hypertensive rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 77 p. 108318, 2019.

UL-SADAT, M. et al. Biochemical study and molecular identification of bacteria with probiotic potential in traditional yogurt, kefir, and curd and their antimicrobial effect on *Escherichia coli* in Mazandaran Province of Iran. **Pakistan Journal of Medical e Heart Sciences**. v. 14 n.4 p. 1443-1448, 2020.

VARDJAN, T. et al. Characterization and stability of lactobacilli and yeast microbiota in kefir grains. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 27-29, 2013.

XIE, N.; ZHOU, T; LI, B. Kefir yeasts enhance probiotic potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: the positive effects of coaggregation between the two strains. **Food Research International**, v. 45 n. 1, p. 394-401, 2012.

WANG, X. et al. *Lactobacillus kefiranofaciens*, the sole dominant and stable bacterial species, exhibits distinct morphotypes upon colonization in Tibetan kefir grains. **Heliyon**, v. 4, n. 6 p. 00649, 2018.

WESCHENFELDER, S. et al. Kefir: composition and evaluation of in situ antagonistic activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 3 p. 450-457, 2018.

WINDAYANI, N; KURNIATI, T; LISTIAWATI, M. Psychochemical and Organoleptic Characteristics of Colostrum Kefir as Antibacterial. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1175 p. 01, 2019.

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

YERLIKAYA, O. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. **Journal of Dairy Science**. v. 102 p. 124-134, 2018.

YERLIKAYA, O. AKBULUT, N. Identification, biochemical and technological properties of *Enterococcus* species isolated from raw milk and traditional dairy products. **Ukrainian Food Journal**. v. 9 n. 4 p. 809-819, 2020.

ZANIRATI, D. F. Seleção de bactérias lácticas de grãos de kefir brasileiros para uso potencial como starter ou culturas probióticas. **Anarobe**, v. 32 p. 70–76, 2015.

ZHAO, W. et al. Probiotics database: a potential source of fermented foods. **International Journal of Food Properties**, v. 22, n. 1, p. 198-217, 2019.

ZHENG, YC. et al. Probiótico Propriedades de cepas de *Lactobacillus* isoladas de grãos de kefir tibetano. **PLoS One**, n. 8, 2013.

ZHOU, J. et al. Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. **Food Microbiology**, v. 26 p. 770–775, 2009.

8 ANEXOS

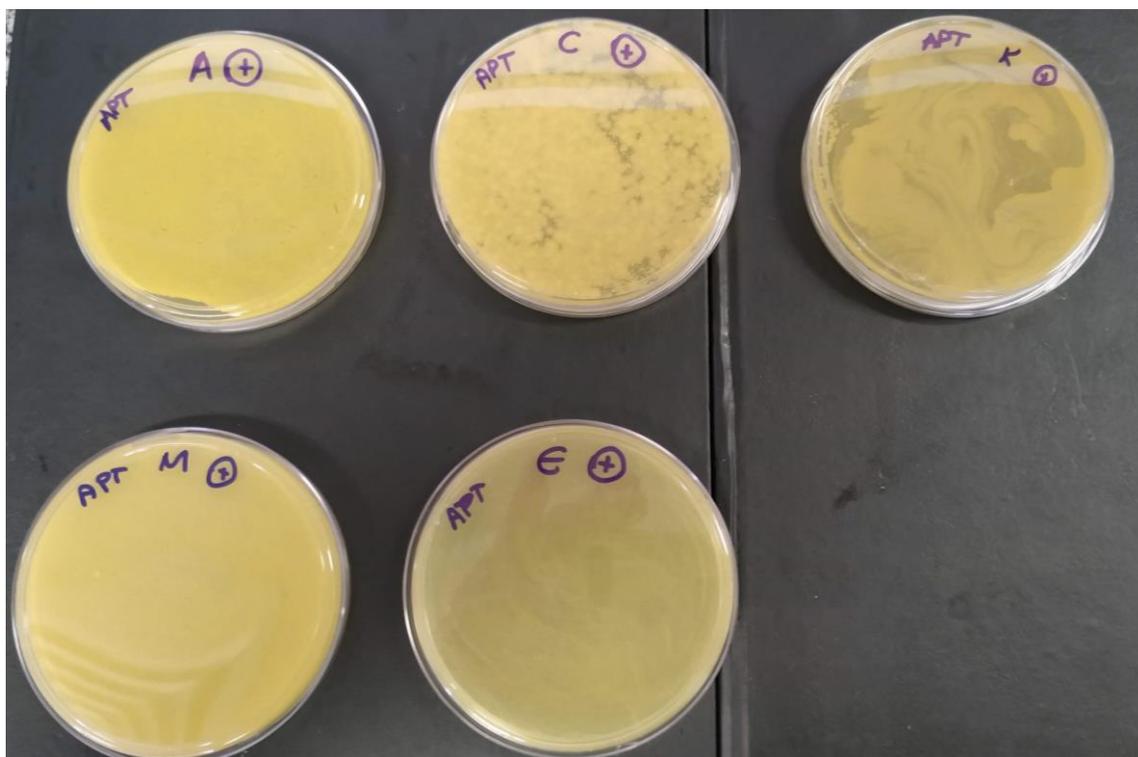
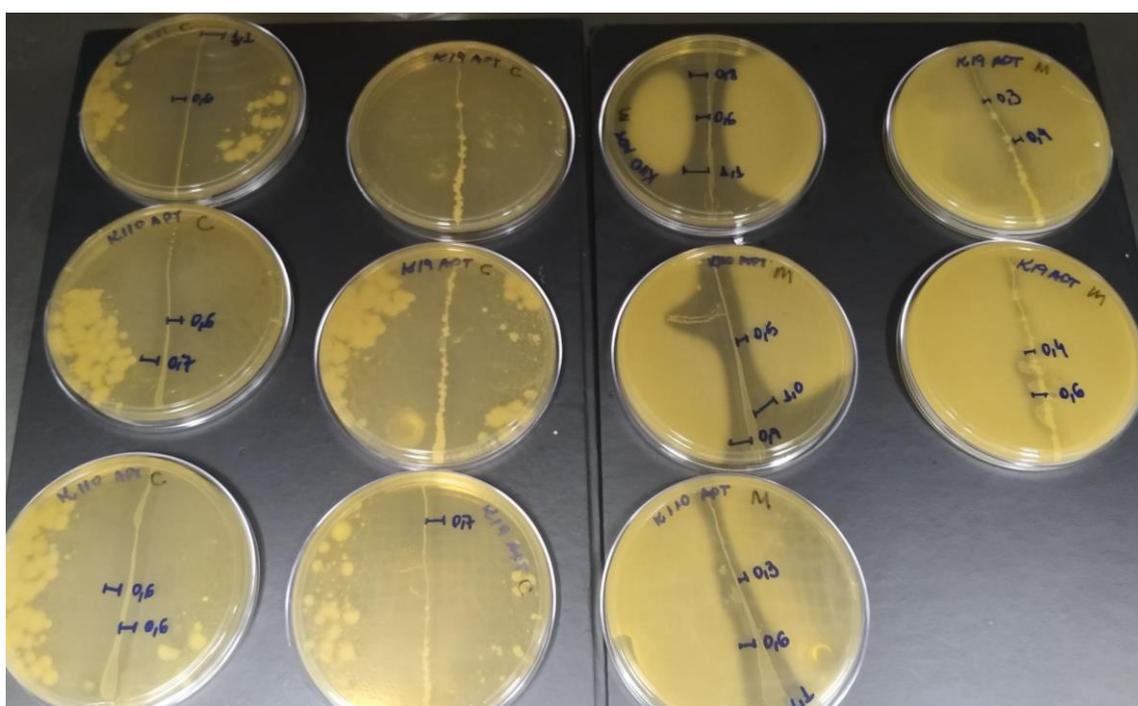


Figura 1. Placas de controle positivo

Figura 2. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans* e *B. cereus*.

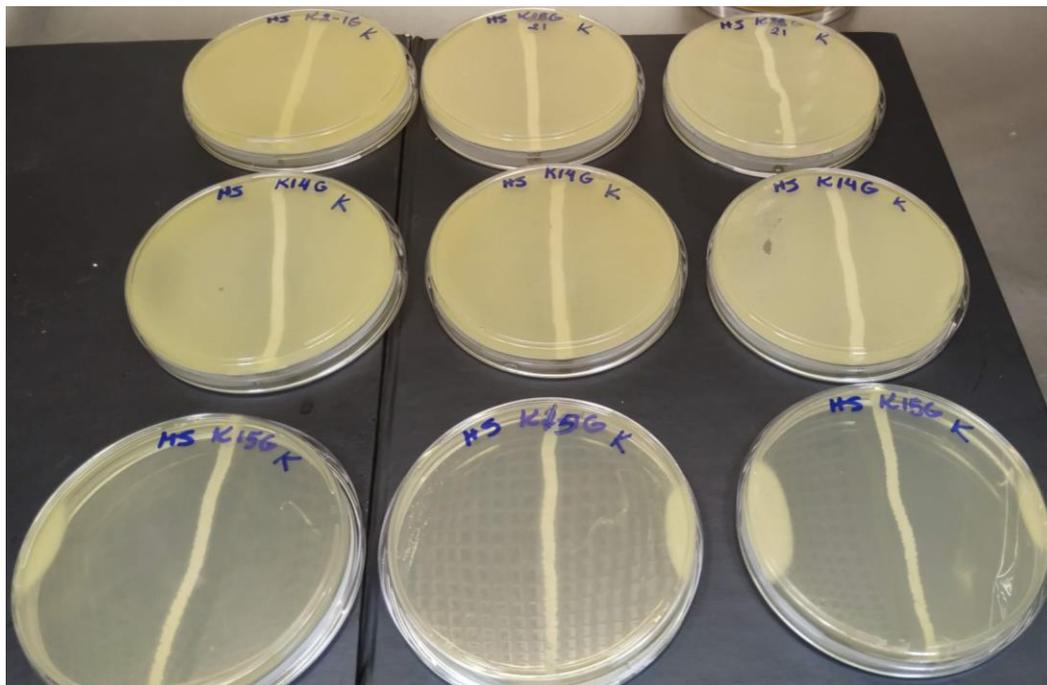


Figura 3. Teste de antagonismo em placas de HS contra *K. pneumoniae*.

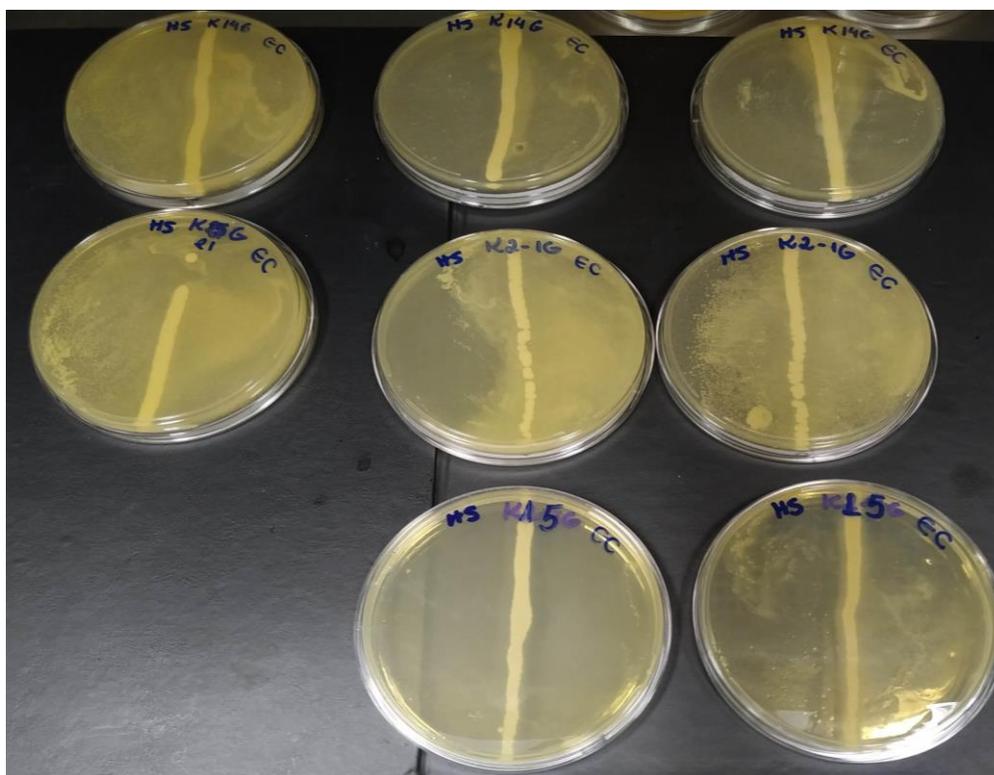


Figura 4. Teste de antagonismo em placas de HS contra *E.coli*.

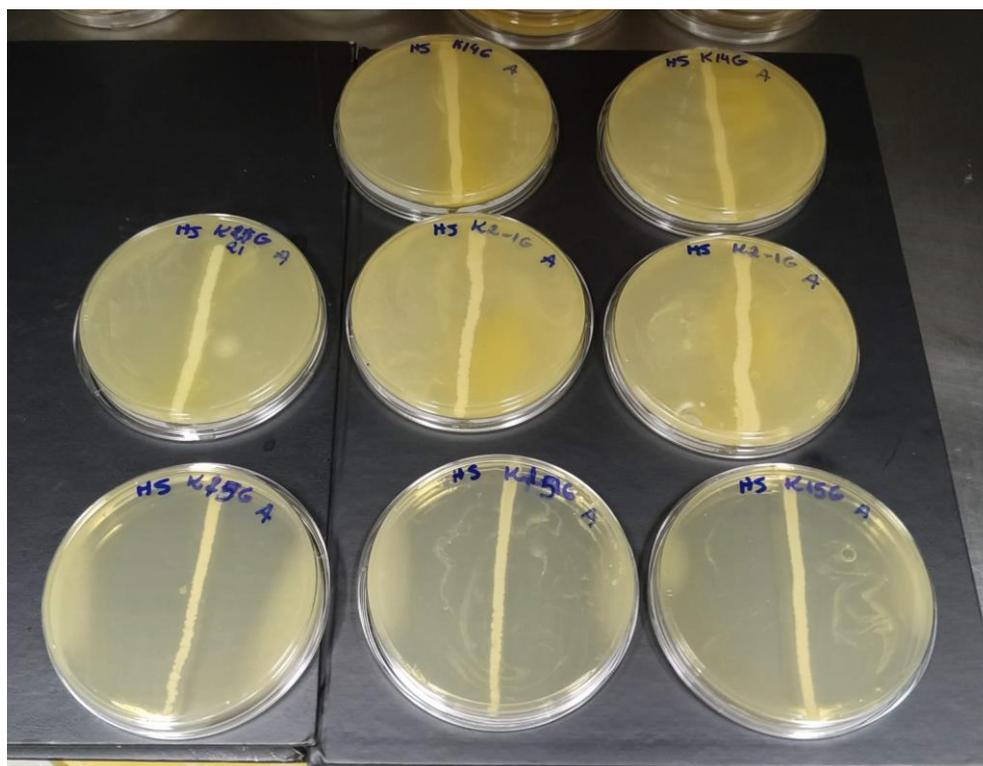


Figura 5. Teste de antagonismo em placas de HS contra *S. aureus*.

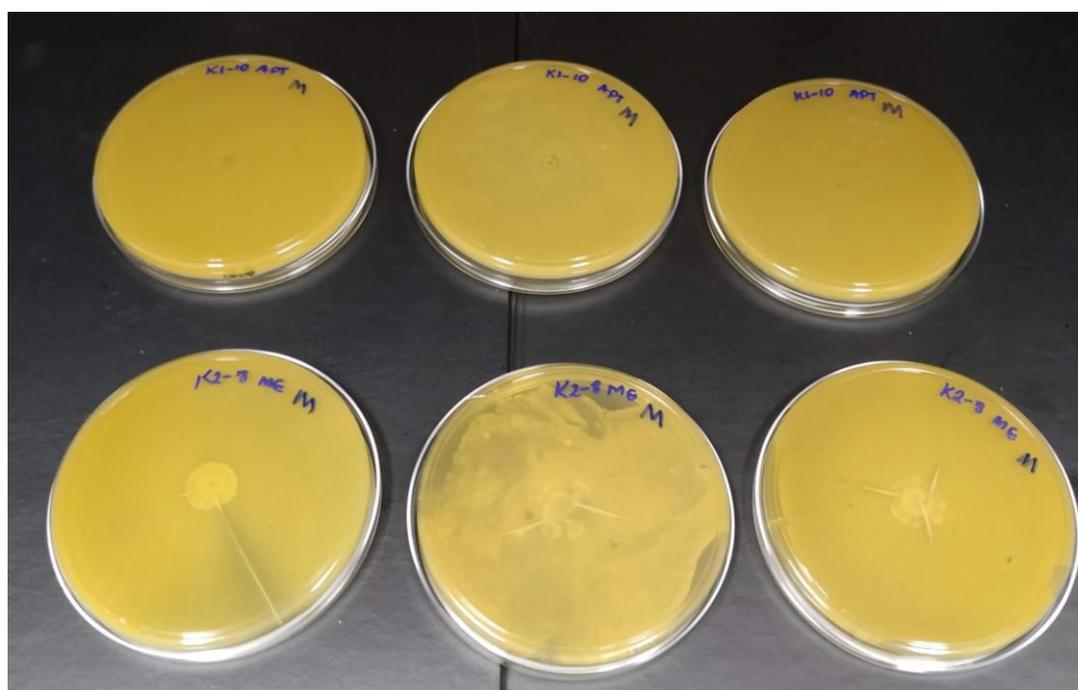


Figura 6. Teste de antagonismo em placas de YM contra *S. mutans*.

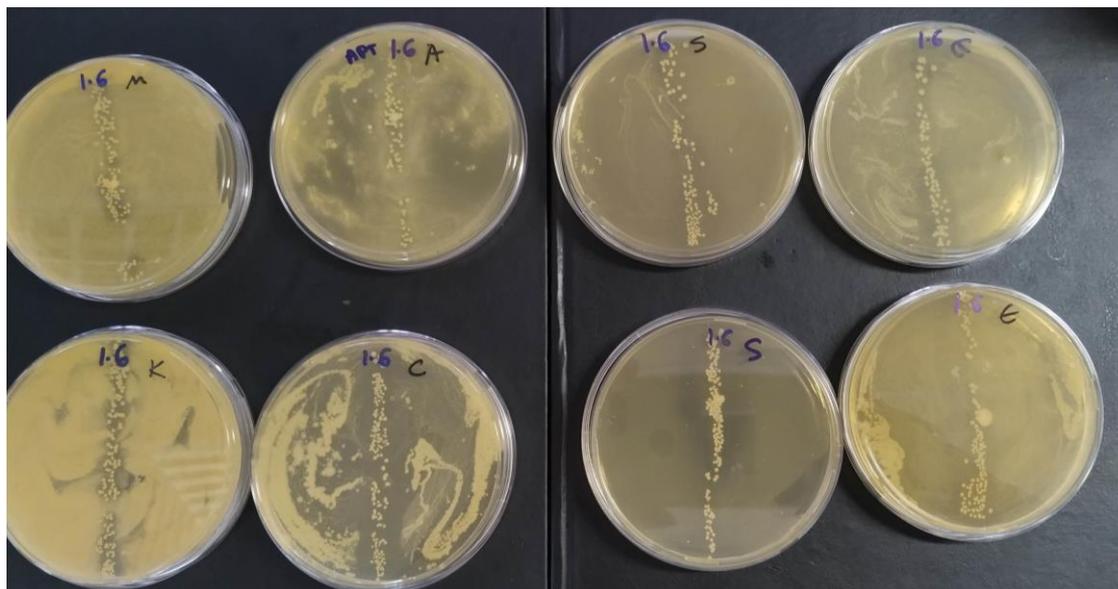


Figura 7. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

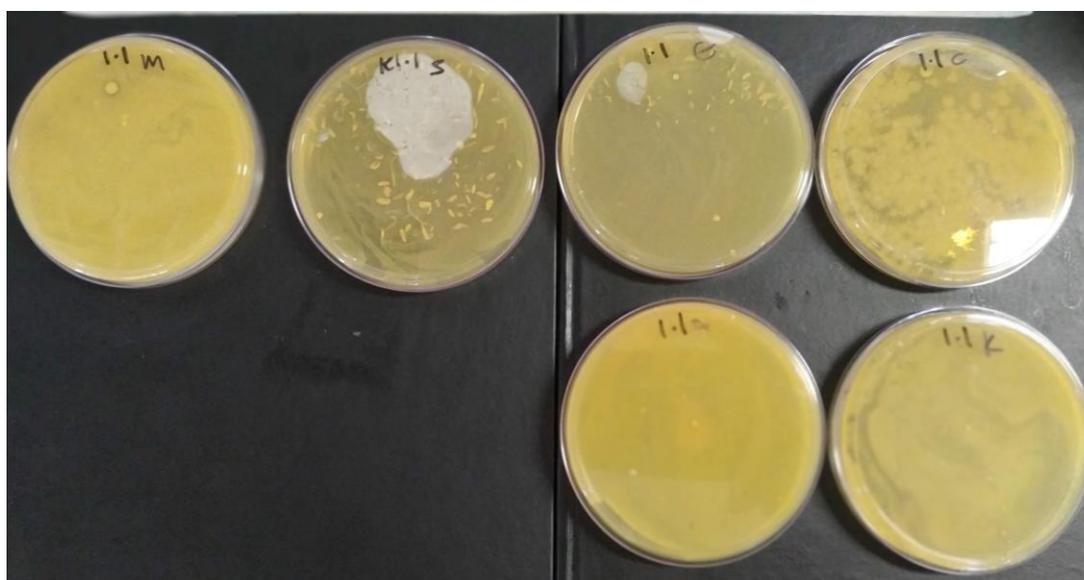


Figura 8. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

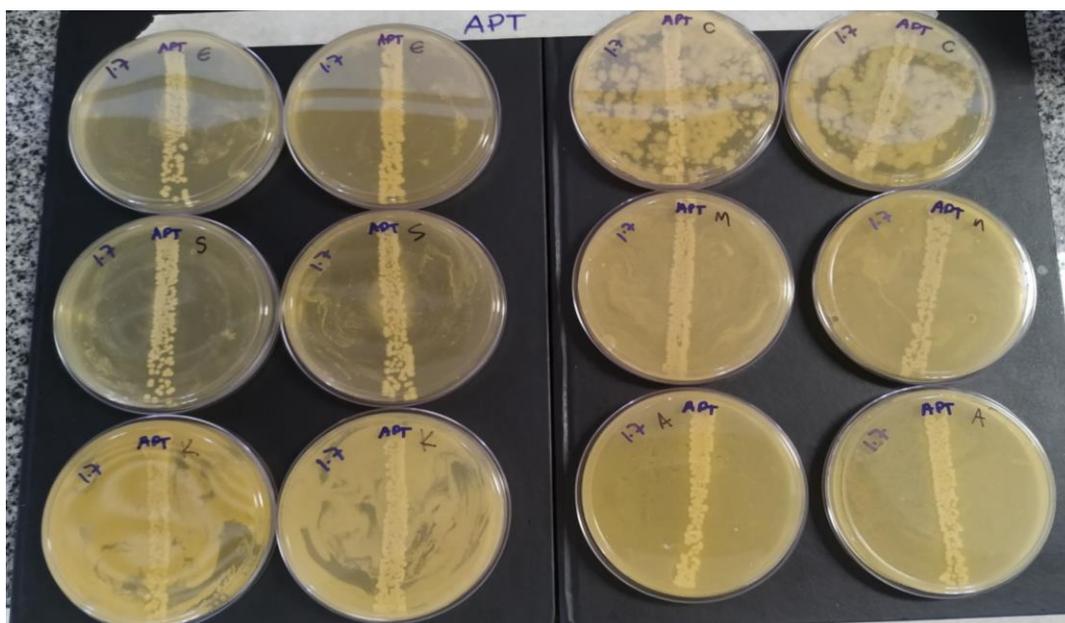


Figura 9. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

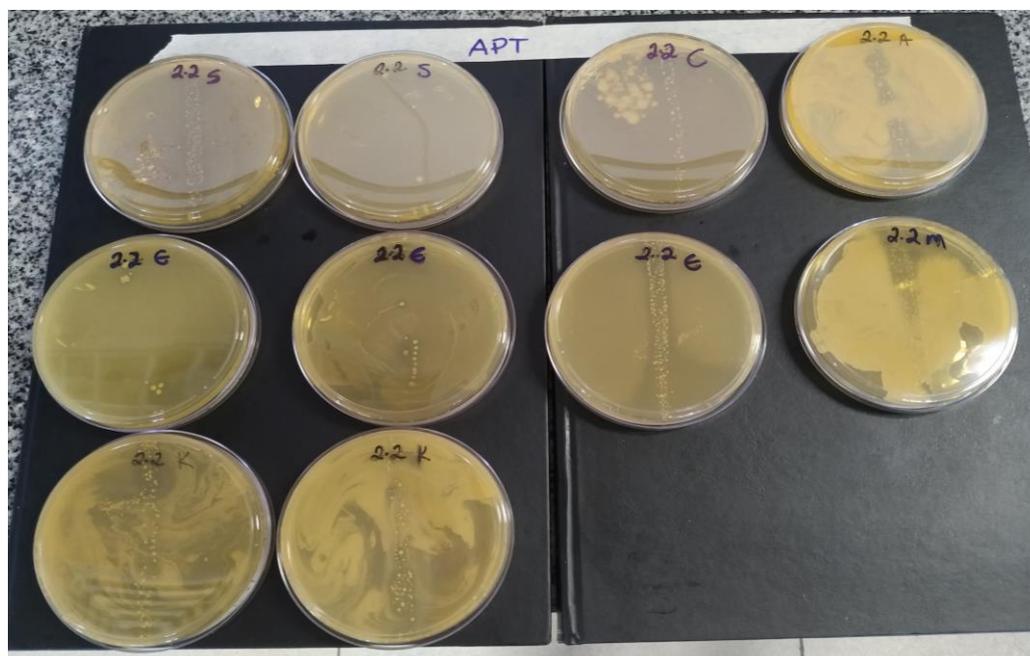


Figura 10. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

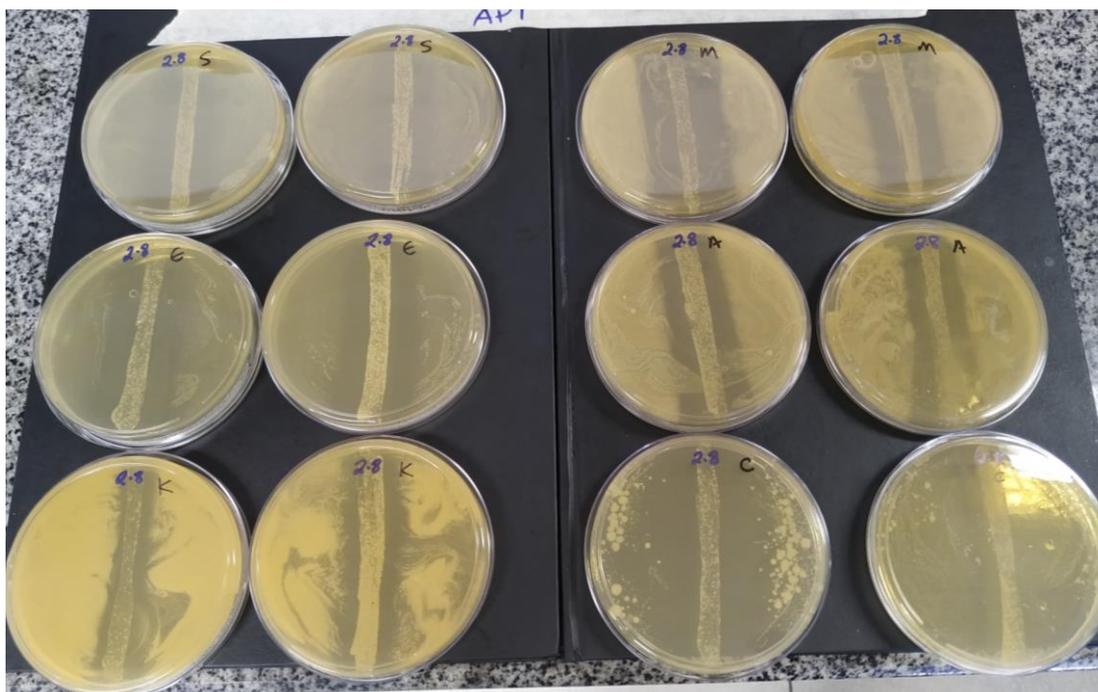


Figura 11. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

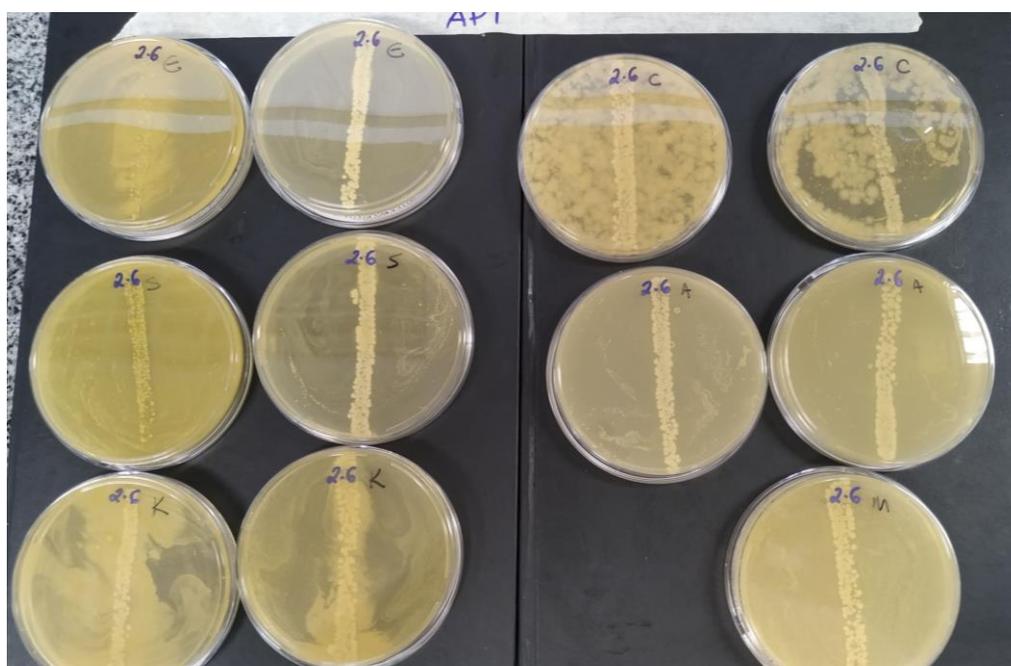


Figura 12. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

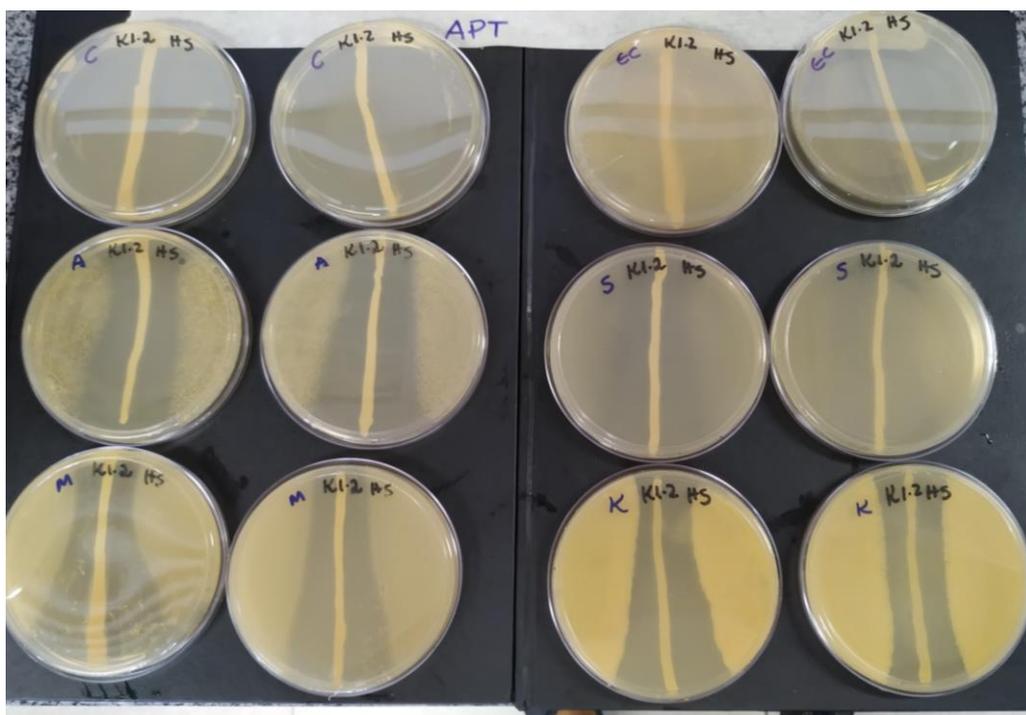


Figura 13. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

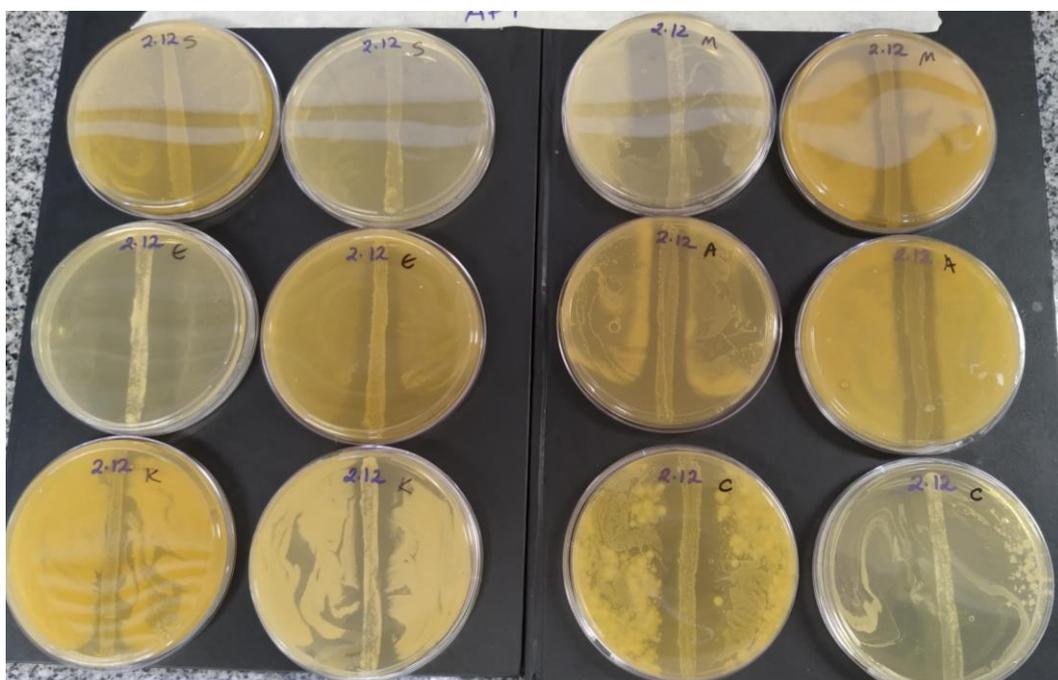


Figura 14. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

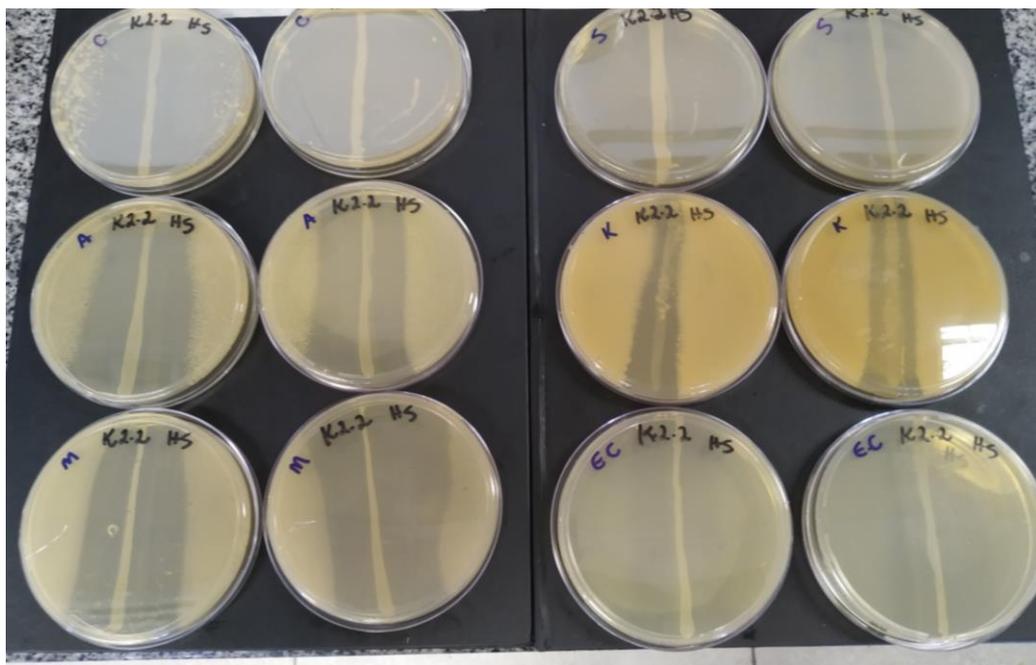


Figura 15. Teste de antagonismo em placas de HS contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

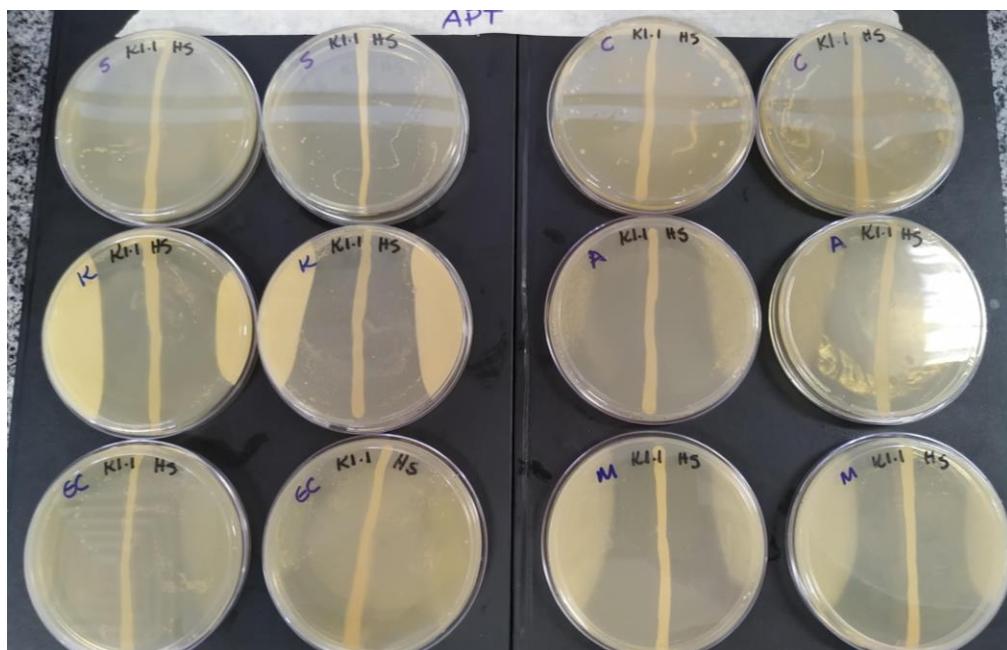


Figura 16. Teste de antagonismo em placas de HS contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

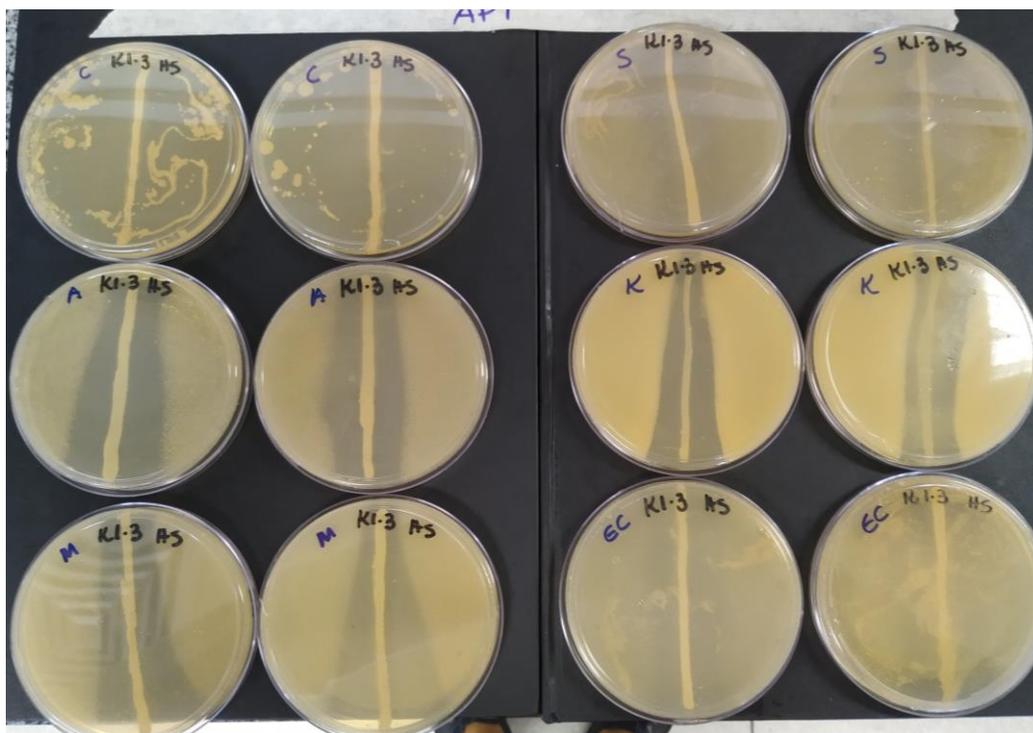


Figura 11. Teste de antagonismo em placas de HS contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

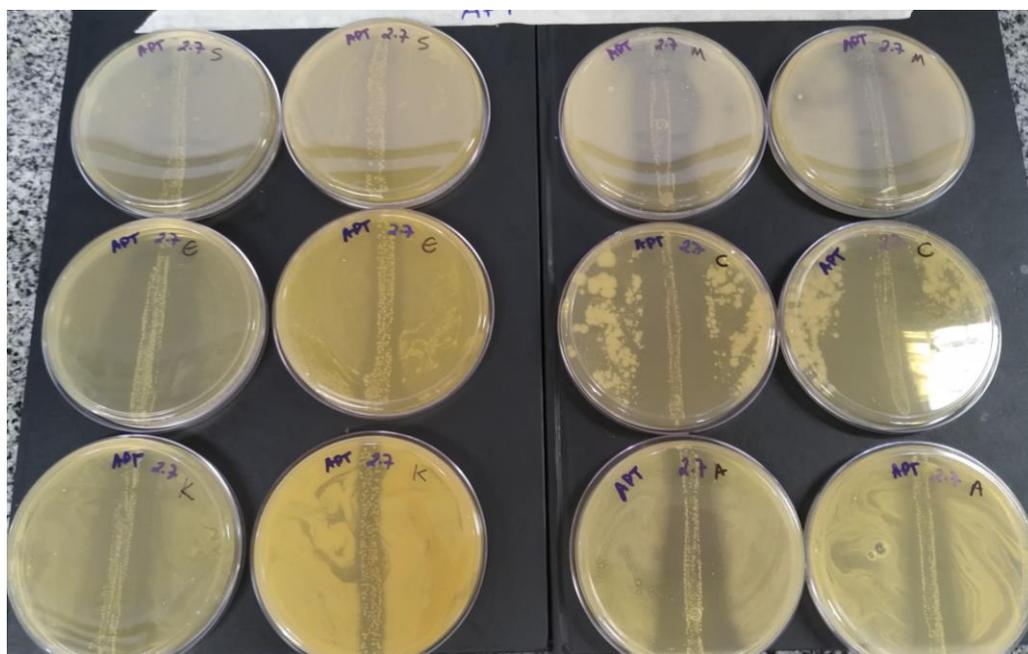


Figura 12. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

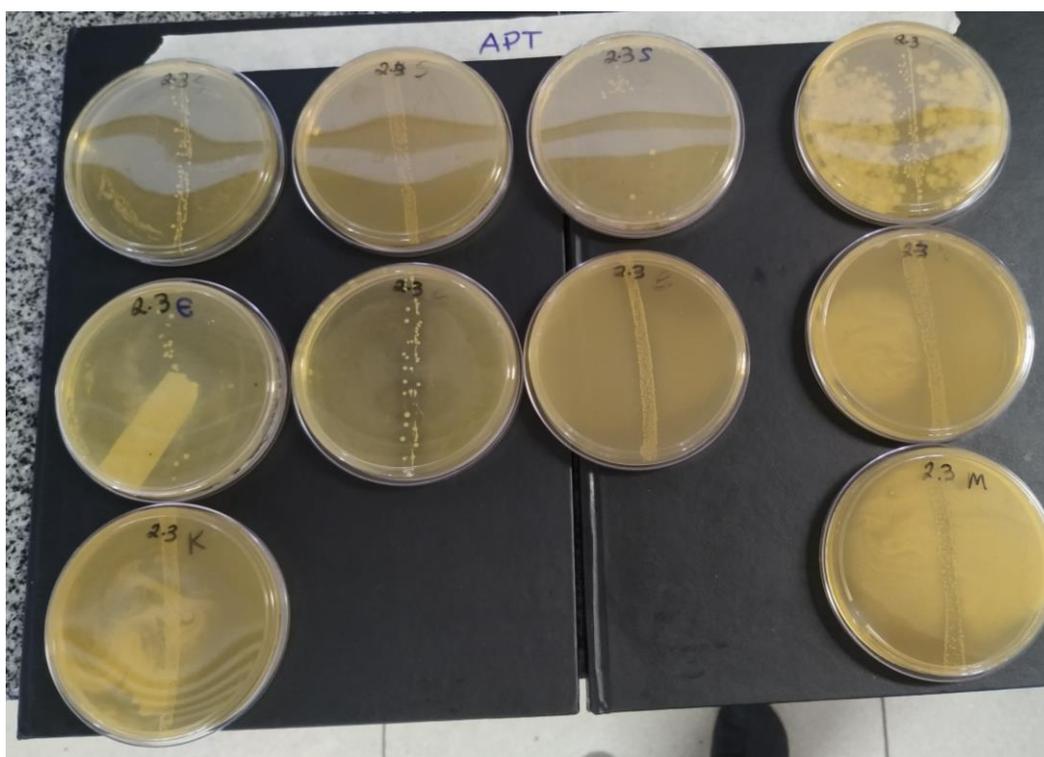


Figura 13. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.

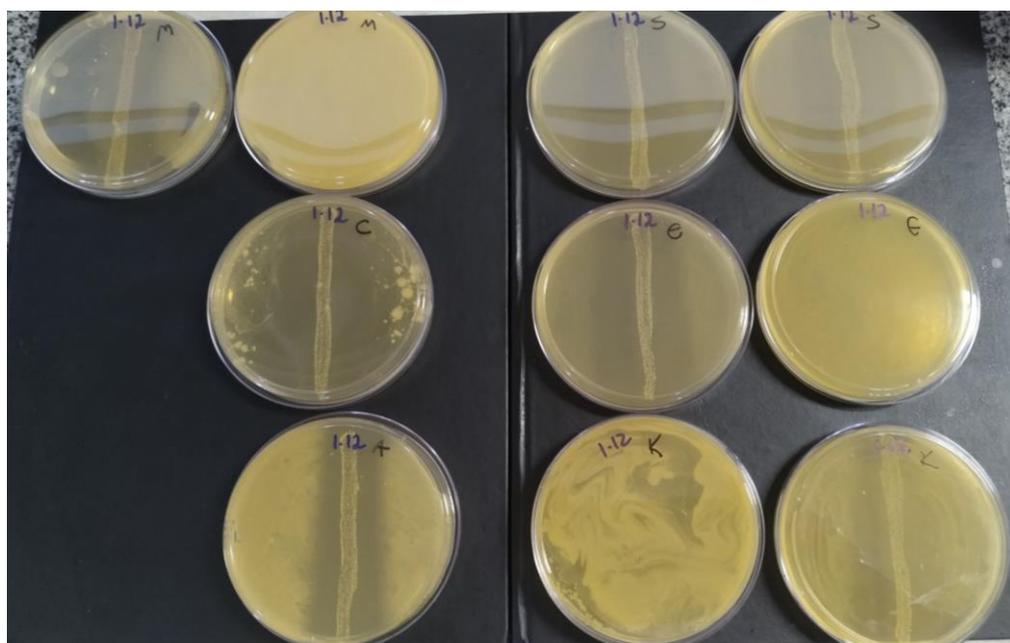


Figura 14. Teste de antagonismo em placas de APT contra *S. mutans*, *S. entericca*, *K. pneumoniae*, *B. cereus*, *S. aureus* e *E.coli*.