

DOI: [10.46943/IX.CONEDU.2023.GT20.008](https://doi.org/10.46943/IX.CONEDU.2023.GT20.008)

ANÁLISE DE CEPAS BACTERIANAS DE CULTIVOS DE KEFIR SELVAGEM COM CARACTERÍSTICAS POTENCIALMENTE PROBIÓTICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM ALIMENTO FUNCIONAL

FABIANA DA CONCEIÇÃO PEREIRA TIAGO

Professora de Biologia do Depto de Ciências Biológicas - CEFET-MG. E-mail: fabsmicro@gmail.com.

GIULIA CLARA DE AMORIM

Aluna de iniciação científica do Depto de Ciências Biológicas - CEFET-MG. E-mail: giuliacaraamorim26@gmail.com;

FABIANA DE MOURA

Técnica de laboratório do Departamento de Química, CEFET-MG, Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais; fabiana.moura@cefetmg.br;

RESUMO

O presente trabalho foi realizado no Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais e teve como objetivo analisar o potencial probiótico de cepas bacterianas isoladas de kefir de leite. O kefir é uma bebida fermentada geralmente em leite e seus grãos são associações simbióticas de microrganismos, dentre eles bactérias ácido acéticas e ácido lácticas. Já foram observados diversos benefícios à microbiota intestinal devido ao consumo de kefir. Inicialmente, 11 cepas bacterianas provenientes de uma amostra de kefir foram isoladas e caracterizadas quanto à morfologia. Os isolados foram submetidos a testes de termotolerância, simulação do ambiente gástrico, resistência aos sais biliares e teste de inibição *in vitro*. Os resultados mostraram que todas as culturas bacterianas possuem bom crescimento na temperatura corporal dos mamíferos de 37°C. Entretanto, mesmo sendo resistente aos sais biliares, a maior parte das bactérias testadas não apresentou grande número de sobreviventes à simulação do ambiente gástrico. Por fim, nenhum dos isolados produziu substâncias inibidoras contra os patógenos testados. Portanto, as bactérias isoladas de kefir cultivado em leite e testadas no

presente experimento não possuem alto potencial probiótico para o desenvolvimento de um alimento funcional. É importante ressaltar que este trabalho não utilizou testes de identificação específicos para determinar a identidade das bactérias isoladas de kefir.

Palavras-chave: Kefir de Leite; Probióticos; Alimento Funcional

INTRODUÇÃO

O aumento no nível de consciência sobre os benefícios de uma alimentação saudável por parte dos consumidores iniciou um movimento crescente de busca por alimentos mais saudáveis e seguros que auxiliam no funcionamento do organismo, reduzindo o risco de doenças e proporcionando melhor qualidade de vida (SANTOS *et al.*, 2020). O conceito de alimento funcional surgiu no Japão, na década de 1990 (STRINGHETA *et al.*, 2007; GIUNTINI, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2009), e é definido pelo *International Institute of North America (ILSI)* como sendo alimentos que, devido aos seus componentes bioativos, provocam benefícios à saúde das pessoas em adição a proporcionar nutrição básica (GIUNTINI, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2009).

No Brasil, não há legislação que defina o conceito de alimento funcional (SILVEIRA *et al.*, 2009), mas alguns alimentos reconhecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na lista das alegações de propriedade funcional ou de saúde, atualizada em 2016 (ANVISA, 2016). Além disso, em 2013, segundo dados da *Euromonitor Internacional* (2013; SANTOS *et al.*, 2012), o Brasil foi responsável por cerca de US\$ 14,6 bilhões no mercado de alimentos funcionais, liderando a tendência de crescimento da América Latina no setor desses produtos (SANTOS *et al.*, 2012).

Portanto, nota-se um potencial crescimento no consumo de alimentos funcionais no Brasil e em todo o mundo (PAZZO, 2012 *apud* SANTOS *et al.*, 2019). Esses alimentos podem ser classificados de acordo com os componentes bioativos neles presentes (KOMATSU, BURITI e SAAD, 2008 *apud* COSTA *et al.*, 2013) que são capazes de exercer efeitos benéficos sobre a composição da microbiota intestinal (KOMATSU, BURITI e SAAD, 2008 *apud* SANTOS *et al.*, 2019). Dentre esses componentes, se encontram os microrganismos probióticos.

Os probióticos, cujo significado é “a favor da vida” de etimologia grega (GUARNER *et al.* 2005; REIS, 2016), são introduzidos por Lilley e Stillwell em 1965 (ALMEIDA, 2007) e definidos por Gibson and Roberfroid, 1995, como sendo microrganismos produzidos em larga escala, capazes de permanecer estáveis e viáveis na microbiota intestinal e de promover benefícios ao hospedeiro. Segundo Champagne, Gardner e Roy (2005), tais culturas têm se destacado, principalmente, na indústria de laticínios em países como o Japão, onde bactérias ácido-lácticos, incluindo *B. longum*, estão entre as 12 categorias de ingredientes promotores da saúde, além

de serem reconhecidas por regular a microbiota intestinal e promover melhores condições gastrointestinais. Tendo em vista a evolução do conhecimento sobre o papel dos componentes fisiologicamente ativos dos alimentos (BADARÓ *et al.*, 2008) e a importância dos probióticos na promoção da saúde (SANTOS *et al.*, 2011), os alimentos com probióticos se tornaram alvos de muitos estudos e experimentos que possibilitaram um grande avanço no desenvolvimento desse tipo de alimento funcional.

Verifica-se que os benefícios trazidos pelos microrganismos probióticos estão relacionados diretamente ao tipo de cepa. As bactérias lácticas, conceituadas por Hayek e Ibrahim (2013 *apud* ALMEIDA, 2017, p. 12) como “microrganismos Gram-positivos, em forma de cocos ou bacilos não esporulados, catalase-negativos, aeróbicos facultativos ou anaeróbios, que produzem ácido lático como principal produto da fermentação de carboidratos”, são as principais representantes dos probióticos. Desse grupo, destacam-se as bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, seguidas, em menor escala, das bactérias *Enterococcus faecium* e *Streptococcus thermophilus* (KLAENHAMMER, 1999). Dentro dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, as espécies reconhecidas como probióticas pela ANVISA são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade rhamnosus, *Lactobacillus casei* variedade defensis, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*) e *Bifidobacterium longum* (SANTOS, 2011 *apud* SANTOS, 2012).

O benefício do consumo de probióticos, para muitos autores, é a prevenção de doenças, evitando assim a “terapia medicamentosa”. Seguindo a mesma premissa, Kerry *et al.* (2018) afirmam que os probióticos apresentaram respostas positivas em tratamentos de diversas doenças como diarreia associada ao rotavírus, síndrome do intestino irritável, alergias a comidas e na prevenção de diabetes, obesidade, câncer e doenças que envolvem patógenos.

Nesse sentido, uma das características mais benéficas dos probióticos é a ação anti patogênica, a qual atua inibindo a perturbação ou alteração na composição da microbiota intestinal, diferentemente dos antibióticos. Segundo Tejero-Saarinen *et al.* (2013, p.60-5 *apud* KERRY *et al.*, 2018, p. 930), os probióticos inibem o crescimento de patógenos através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) como ácidos acético, butanoico e lático. Esses ácidos agem de diferentes formas na morte celular da célula alvo, sendo elas: despolarização do potencial da membrana,

desnaturalização das enzimas celulares e redução do pH. Além de produzir compostos que afetam diretamente microrganismos patogênicos, os probióticos também estimulam o sistema imunológico de defesa do hospedeiro (KERRY *et al.*, 2018). Portanto, pode-se afirmar que, além dos benefícios trazidos à microbiota intestinal, os probióticos também possuem potencial para serem usados na área de biomedicina no desenvolvimento de medicamentos que não atuem com uma forte pressão seletiva, como é o caso dos antibióticos.

O kefir é uma bebida viscosa, levemente carbonatada, popularmente feita com leite, que contém uma pequena quantidade de álcool (menos de 2% por volume) (AÇIK *et al.*, 2020), como álcool etílico, isoamílico e acetona, CO₂ e uma variedade de AGCC, aldeídos (GUVEN e GULMEZ, 2003; MOREIRA *et al.* 2008). Os grãos de kefir são associações simbióticas de culturas de leveduras e espécies de fungos miceliais (WITTHUHN, *et al.*, 2005; CASSANEGO, 2017).

Devido à diversidade microbiológica presente nos grãos de kefir, há um grande potencial probiótico relacionado à sua utilização (MOREIRA *et al.*, 2008). Diversos estudos realizados apontam os benefícios do consumo de kefir, entre eles a redução do estresse (MOREIRA *et al.*, 2008), ação antimicrobiana (RODRIGUES *et al.*, 2005; DIAS *et al.* 2016), ação antitumoral (DIAS *et al.*, 2016), ação anti-inflamatória (MOREIRA *et al.*, 2008), manutenção da microbiota intestinal (MARQUINA *et al.*, 2002; DIAS *et al.*, 2016), entre outros.

Este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial probiótico das culturas de bactérias isoladas do kefir selvagem de cultivo em leite por meio de experimentos *in vitro* para simular as condições do trato gastrointestinal humano (pH ácido, enzimas digestivas, resistência aos sais biliares e capacidade de crescer na temperatura corporal).

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o potencial probiótico das culturas de bactérias isoladas do kefir selvagem de cultivo em leite para o desenvolvimento de um alimento funcional.

METODOLOGIA

Os grãos de kefir foram adquiridos por doação e tiveram origem de uma cultura já utilizada como produto probiótico pelo doador, em Belo Horizonte - MG. Além disso, foi adquirido leite UHT Integral no mercado local (Belo Horizonte, MG). Os grãos de kefir selvagem foram ativados e cultivados durante alguns meses até que

fosse possível realizar os ensaios de fermentação. Dessa forma, quando iniciados os testes, não foi necessário reativá-los por se tratar de uma amostra in natura.

CULTIVO EM LEITE

Os grãos de kefir selvagem foram coados e lavados com água destilada. Inoculou-se 25g dos grãos em 500 mL de leite UHT integral (5% m/v) em um recipiente de vidro (erlenmeyer), o qual foi incubado a temperatura ambiente por 24h.

Uma amostra de 25g da bebida fermentada em leite foi adicionada a 225mL de água peptonada 0,1% para diluição, garantindo que a porção removida posteriormente fosse referente a todo o material.

PLAQUEAMENTO

Alíquotas de 100 μ L da diluição foram inoculadas em placas de Petri contendo ágar nutriente e ágar MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), meio seletivo para *Lactobacillus* spp., e espalhadas uniformemente com uma alça de Drigalski (plaqueamento em superfície). As placas foram incubadas invertidas em aerobiose a 26°C no período de 24-48h.

ANÁLISE MORFOLÓGICA

Após o período de incubação, foi feita a análise das colônias crescidas em ágar nutriente e ágar MRS buscando caracterizar os diferentes morfotipos presentes. Os parâmetros analisados foram: forma (circular ou irregular), bordo (liso ou recortado), aspecto (homogênea ou heterogênea), tamanho e cor. Realizou-se também o método de coloração de Gram, permitindo a observação em microscópio óptico das características morfoestruturais dos microrganismos encontrados.

TRIAGEM DE TERMOTOLERÂNCIA

As culturas foram reativadas em seus respectivos caldos (MRS ou nutriente) e foram incubadas a temperatura de 37°C (temperatura corporal interna dos mamíferos), durante o período de 48-72h. Considerou-se positivos os tubos cujos meios

de cultura apresentaram turvação. Excluiu-se as amostras que não apresentaram crescimento nesse intervalo de tempo por serem inadequadas para uso probiótico.

SIMULAÇÃO DO AMBIENTE GÁSTRICO E RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

A simulação das condições gastrointestinais das culturas cultivadas em caldos MRS e nutriente foi realizada pelo método *in vitro* de CHARTERIS *et al.* (1998 *apud* MARTINS, 2004). Alíquotas de 1 mL foram submetidas a centrifugação de 3000 rpm durante 5 minutos e lavadas três vezes em solução salina tamponada com fosfato (0,5% m/v para bactérias e 0.85% para leveduras), pH 7,0 (CHARTERIS *et al.*, 1998; MARTINS, 2004). Ao meio gástrico, adicionou-se pepsina (3 g/L), NaCl (5 g/L) e solução de HCl 1M para o ajuste do pH para 2,0 e incubação das células coletadas a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, realizou-se o plaqueamento de profundidade em ágar MRS ou nutriente e as placas foram incubadas a 37°C durante 48-72h para contagem dos sobreviventes em meio gástrico (MARTINS, 2004).

RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

Foi também realizado o teste de resistência aos sais biliares, reativando as cepas em caldos MRS e nutriente incubados a 37°C por 48h. Alíquotas de 1 mL (concentração superior a 9 log UFC) das amostras foram coletadas, lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato e inoculadas em tubos contendo 9 mL de caldos MRS ou nutriente suplementados com oxigall. Esses foram incubados a 37°C durante 1 hora e, posteriormente, diluídos adequadamente ao meio de cultura e incubados em anaerobiose a 37°C por 48h. Finalmente, fez-se a verificação da tolerância à bile pela contagem em placas com ágar MRS e nutriente (TUSSOLINI, 2009).

TESTES DE INIBIÇÃO *IN VITRO*: DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS CONTRA ENTEROPATÓGENOS

As bactérias consideradas termotolerantes e resistentes às simulações gastrointestinais (pH ácido e resistência aos sais biliares) foram testadas em relação à capacidade de produção de substâncias antagonistas. O teste *in vitro* para verificar

a produção de substâncias inibitórias difusíveis foi realizado através do método de difusão em dupla camada (NARDI *et al.*, 1999; SILVA *et al.*, 2001). Uma micro-gota de 5 µL de cada cultura bacteriana crescida em caldos MRS e nutriente por 24-48h a 37°C foi colocada no centro de uma placa contendo ágar MRS ou nutriente. Após a incubação durante 48 horas em aerobiose, a 37°C, as placas foram colocadas em posição invertida e em cada tampa foi colocado 1 mL de clorofórmio para eliminar as células dos microrganismos que cresceram e possibilitar apenas a presença das possíveis substâncias inibidoras. Depois de 30 minutos, as placas foram abertas para evaporação do clorofórmio residual e uma sobrecamada de 3,5 mL de ágar BHI semi-sólido (0,7% de ágar) acrescido de 10 µL de uma cultura de bactéria reveladora foi colocada sobre o ágar. Todos os microrganismos reveladores foram previamente ativados duas vezes, sendo crescidos por 24-48h a 37°C em caldo BHI. Após incubação das placas a 37°C por 24-48 horas, foi feita a leitura de possíveis halos de inibição. O critério de determinação dos resultados foi a presença ou ausência do halo de inibição, independente do seu tamanho. Os experimentos foram realizados em duplicatas e o diâmetro dos halos foi medido com paquímetro digital.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista que a microbiota presente no kefir pode sofrer alterações devido à diversos fatores, foram selecionados 5 morfotipos a partir do meio nutriente. As características morfoculturais predominantes nas culturas isoladas foram: forma irregular, bordo liso, aspecto homogêneo, tamanho pequeno e cor branca ou transparente (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise morfológica de isolados obtidos a partir de uma amostra plaqueada de kefir de leite em meio nutriente

Isolado	Forma	Bordo	Aspecto	Tamanho	Cor
A1	irregular	liso	homogêneo	pequeno	esbranquiçada e opaca
A2	circular	liso	homogêneo	médio	branca
A3	circular	liso	homogêneo	grande	branca
A4	irregular	liso	homogêneo	pequeno	transparente
A5	irregular	recortado	homogêneo	pequeno	transparente

Sendo A código para as culturas crescidas em meio de cultura nutriente

Posteriormente, decidiu-se repetir o processo de plaqueamento em meio nutriente e em meio MRS, meio seletivo para *Lactobacillus* spp, no intuito de identificar bactérias diferentes das isoladas no primeiro momento. Portanto, foram selecionados mais 8 morfotipos, sendo 3 das placas de ágar nutriente e 5 das placas de ágar MRS. Esses isolados foram analisados pelo microscópio óptico após o teste de coloração de Gram, juntamente com os isolados obtidos anteriormente (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise das características morfológicas dos isolados obtidos a partir de uma amostra plaqueada de kefir de leite em meio nutriente e meio MRS após a coloração de Gram

Isolado	Características morfológicas
A1	Bastonetes Gram-negativos
A2	Bastonetes Gram-negativos
A3	Bastonetes Gram-negativos
A4	Bastonetes Gram-negativos
A5	Bastonetes Gram-negativos
B1	Indefinido
B2	Cocobacilus Gram-positivos
B3	Cocobacilus Gram-negativos
M1	Células grandes Gram-positivas
M2	Gram-positivas
M3	Indefinido
M4	Células antigas com pouca coloração
M5	(M4.1 e M4.2) Indefinido

Sendo A e B códigos para as culturas crescidas em meio de cultura nutriente e M para as culturas crescidas em meio seletivo MRS.

Apesar da expectativa inicial de encontrar majoritariamente bactérias lácticas por se tratar de grãos de kefir de leite, observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 2 que 6 isolados foram caracterizados como Gram-negativos, impossibilitando a hipótese de serem bactérias lácticas.

Estudos realizados por Miguel (2009) constataram a presença de grupos de bactérias do gênero *Acetobacter syzygii* em grãos de kefir coletados em Santa Catarina. Portanto, infere-se que os isolados A1, A2, A3, A4, A5 e B3 podem ser

bactérias ácido-acéticas do gênero *Acetobacter*, caracterizadas por serem bastonetes Gram-negativas.

Já os isolados B2, M1 e M2 podem ser bactérias lácticas, enquanto B1, M3, M4 e M5 não foram classificados devido às dificuldades de visualização das colorações e características morfológicas no microscópio óptico.

Desses classificados como indefinidos, todos foram descartados com exceção do isolado M4 que foi mantido em razão da presença de dois grupos bacterianos distintos na amostra, os quais foram purificados e classificados como M4.1 e M4.2.

Deste modo, enfatiza-se a necessidade de testes de identificação específicos para os microrganismos isolados das amostras de kefir tais como técnicas moleculares como PCR-DGGE (Reação em Cadeia de Polimerase - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante) (GARBERS *et al.*, 2004) para conhecer com mais precisão a identidade das bactérias analisadas.

TERMOTOLERÂNCIA

Para serem classificadas como probióticas, as bactérias devem ter a capacidade de crescer em temperatura corporal de mamíferos terrestres, sendo esta 37°C. Dessa forma, todas as bactérias isoladas foram crescidas em seus respectivos meios de cultura e incubadas a 37°C. Como mostra a Tabela 3, o resultado do teste de termotolerância mostrou que todas as 11 culturas isoladas tiveram um bom crescimento, ou seja, permaneceriam viáveis dentro dos hospedeiros mamíferos.

Tabela 3 - Teste de termotolerância. Culturas bacterianas crescidas a 37°C

Cultura bacteriana	37°C
A1	+
A2	+
A3	+
A4	+
A5	+
B2	+
B3	+
M1	+

Cultura bacteriana	37°C
M2	+
M4.1	+
M4.2	+

Sendo A e B códigos para as culturas crescidas em meio de cultura nutriente e M para as culturas crescidas em meio seletivo MRS.

SIMULAÇÃO DO AMBIENTE GÁSTRICO E RESISTÊNCIA AOS SAIS BILIARES

As bactérias consideradas probióticas também precisam ter resistência ao pH ácido do sistema gástrico do organismo e à atividade dos sais biliares e permanecer em números elevados para que possam exercer seu efeito benéfico. Na Tabela 4 apresenta-se o número de bactérias sobreviventes à simulação do ambiente gástrico nas duas placas de Petri, uma vez que o teste foi realizado em duplicata. Percebe-se que todos os isolados apresentaram baixo número de sobreviventes, exceto o isolado A5.

Tabela 4 – Contagem dos sobreviventes ao teste de simulação do ambiente gástrico

Cultura bacteriana	Tempo (Dias)	Contagem placa 1 (UFC)	Contagem placa 2 (UFC)
A1	7	3	2
A2	7	5	1
A3	7	5	9
A4	7	10	3
A5	7	115	19
B2	7	2	3
B3	7	0	0
M1	7	58	18
M2	7	15	14
M4.1	7	21	12
M4.2	7	4	11

Sendo A e B códigos para as culturas crescidas em meio de cultura nutriente e M para as culturas crescidas em meio seletivo MRS.

Na Tabela 5 estão contidos os resultados da contagem de sobreviventes em relação ao teste de resistência aos sais biliares nas duas placas de Petri. Diferentemente da simulação gastrointestinal, a maioria das culturas bacterianas isoladas apresentaram um elevado número de sobreviventes, exceto os isolados M2 e M4.1. Os isolados M1, M2, M4.1 e M4.2 foram deixados na incubadora por mais tempo, pois nos primeiros 2 dias não foi possível ver crescimento bacteriano.

Tabela 5 – Contagem dos sobreviventes ao teste de resistência aos sais biliares

Cultura bacteriana	Tempo (Dias)	Contagem placa 1 (UFC)	Contagem placa 2 (UFC)
A1	2	+257	988
A2	2	45	313
A3	2	+186	257
A4	2	284	+266
A5	2	84	+988
B2	2	448	+529
B3	2	+988	+988
M1	7	13	95
M2	7	1	0
M4.1	7	240	6
M4.2	7	1	6

Sendo A e B códigos para as culturas crescidas em meio de cultura nutriente e M para as culturas crescidas em meio seletivo MRS.

Sendo assim, pode-se inferir que, apesar das bactérias isoladas dos grãos de kefir possuírem alta resistência aos sais biliares, elas não conseguiriam sobreviver em grande número nas condições adversas do ambiente gastrointestinal dos hospedeiros mamíferos.

5.4 TESTES DE INIBIÇÃO *IN VITRO*: DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTAGONISTAS CONTRA ENTEROPATÓGENOS

O objetivo do teste de inibição *in vitro* foi constatar a presença de substâncias inibidoras produzidas pelas bactérias isoladas contra patógenos reveladores.

Todos os 11 isolados foram testados para 5 patógenos, sendo eles: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Enterococcus* e *Candida*.

Infelizmente, não foi observada a formação de halos de inibição por nenhum dos isolados contra nenhum dos patógenos utilizados como reveladores. É importante ressaltar que os resultados definidos como inconclusivos na Tabela 6, indicam que não foi possível constatar se a bactéria em questão produzia substâncias inibidoras devido à problemas de solidificação do meio semi-sólido BHI durante o teste.

Tabela 6 – Resultados (diâmetros de halos de inibição em milímetros) do antagonismo *in vitro* das culturas bacterianas selecionadas contra enteropatógenos.

Cultura bacteriana	Patógeno revelador				
	Salmonela	E. Coli	Listeria	Candida	Enterococcus
A1	0	0	--	--	0
A2	0	0	--	--	--
A3	--	0	--	0	0
A4	0	0	--	0	0
A5	0	0	--	0	0
B2	0	0	--	0	0
B3	0	0	--	--	--
M1	--	--	--	0	0
M2	--	--	0	0	0
M4.1	--	--	--	--	--
M4.2	--	--	--	--	0

--: inconclusivo; 0: ausência de halo

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Segundo Bengoa et. al. (2018), nos grãos de kefir de leite existe um predomínio de bactérias lácticas (108-109 UFC/g), acompanhadas por leveduras (107-108 UFC/g) e bactérias ácido-acéticas (105-106 UFC/g). Portanto, espera-se encontrar principalmente bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* e *Lactococcus*. A microbiota presente no kefir pode sofrer alterações de acordo com vários fatores como métodos de cultivo de grãos, condições de manipulação higiênica, técnicas de preservação e origem dos grãos. Sendo assim, baseando-se no estudo feito por Miguel

(2009) em que foi feita a identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir oriundos de diferentes localidades, a expectativa para o presente trabalho foi encontrar espécies *Lactobacillus*.

Tendo em vista que os microrganismos citados acima já possuem um histórico de uso como probióticos, já que apresentaram um desempenho positivo nos testes de termotolerância, simulação do ambiente gástrico e resistência aos sais biliares e inibição *in vitro*. Embora o kefir seja uma bebida fácil de ser produzida de forma artesanal, a criação de produtos à base de kefir se apresenta como um campo atrativo para as indústrias e para área de desenvolvimento de produtos alimentícios, sendo uma alternativa para o aumento do consumo e promoção da saúde, já que nem todos possuem condições e tempo para o cultivo de kefir em casa. Portanto, pretende-se que o presente trabalho se torne uma referência para pesquisas futuras que visem o desenvolvimento de um alimento funcional a partir de tais microrganismos isolados do kefir.

REFERÊNCIAS

AÇIK, Murat *et al.* Alternative source of probiotics for lactose intolerance and vegan individuals: sugary kefir. *Food Sci. Technol*, Campinas, v. 40, n. 3, p. 523-531, set., 2020.

ALMEIDA, K. E. Avaliação do perfil de acidificação e viabilidade de bactérias probióticas em misturas leite-soro para elaboração de bebidas lácteas utilizando soro de queijo Minas frescal. 2007. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ALMEIDA, J. M. Viabilidade de bactérias lácticas probióticas em leite fermentados comerciais. TCC (Engenheiro de Alimentos) - Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade

Federal da Paraíba. Paraíba, p. 26. 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/13757/1/JMA04122017.pdf>. Acesso em: 22 mar. 2021

ANVISA. Anvisa atualiza lista de alegações de propriedades funcionais e de saúde. Brasília, 15 de agosto de 2016. Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2016/anvisa-atualiza-lista-de-alegacoes-de-propriedades-funcionais-e-de-saude>>

BADARÓ, A. C. L. *et al.* Alimentos probióticos: Aplicações como promotores da saúde humana parte1. *Nutri Gerais: Revista digital de nutrição*, v. 2, n. 3, 2008.

BRASIL. Resolução nº241, 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, Brasília*, 27 abr. 2018. Seção 1, p. 97. 2018d.

CASSANEGO, D. B. Bioprospecção de leveduras isoladas de kefir para aplicação em sorvetes probióticos. 2017. Tese (Doutorado em Ciência Tecnologia de Alimentos) - Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2017.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 45, n. 1, p. 61-84, 2005.

CHARTERIS, W. P. *et al.* Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.*, v. 84, p. 759-768, 1998.

COSTA, M. P. *et al.* Leite fermentado: potencial alimento funcional. *Enciclopédia Biosfera, Goiânia*, v. 9, p. 1387-1408, 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/266395821_Leite_fermentado_potencial_alimento_funcional_Fermented_milk_potential_functional_food>. Acesso em: 22 mar. 2021

DIAS, P. A. *et al.* Propriedades antimicrobianas do kefir. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, v. 83, e 0762013, 2016. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_art-text&pid=S1808-16572016000100403&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 19 mar. 2021.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de microrganismos isolados de grãos de kefir. *Ciênc. anim. bras.*, Goiânia, v. 19, e-40548,

2018. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912018000100601&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2021.

FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. Food Science and Technology Bulletin, v. 2, p. 1-17, 2005.

GARBER, Im., Britz, T. & Witthuhn, R. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in Kefir grains. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20, 687-693 (2004). <https://doi.org/10.1007/s11274-004-2624-3>.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of nutrition, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIUNTINI, B. *et al.* ILSI BRASIL INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE DO BRASIL. 2017.

GUARNER, F.; MALAGELADA, JR. Gut flora in health and disease. Lancet, v. 8, p. 512-519, 2003.

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

JUSTO, T. H.; TUSSOLINI, L. Verificação da resistência à acidez e a tolerância à bile por cepas de bactérias lácticas isoladas de kefir. In: Semana de Integração de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2009, Guarapuava. Anais [...]. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2009.

KERRY, R. G. *et al.* Benefaction of probiotics for human health: A review. Journal of Food and Drug Analysis, v. 26, p. 927-939, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949818300309>. Acesso em: 22 mar. 2021.

KLAENHAMMER, T.R.; KULLEN, M.J. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 50, p. 45-57, 1999.

KOMATSU, T. R. *et al.* Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, p. 330-346, 2008. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322008000300003. Acesso em: 24 mar. 2021.

LILLEY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*, v. 147, p. 747-748, 1965.

MAGALHÃES, K. T. *et al.* Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Braz. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 693-702, June 2011. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151783822011000200034&lng=en&nrm=iso>. access on 19 Mar. 2021.

MARQUINA, D.; SANTOS, A.; CORPAS, I.; MUNOZ, J.; ZAZO, J; PIENADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p.136-140, 2002.

MARTINS, F. S. Capacidade de colonização do trato gastrointestinal de camundongos NHI isentos de germes e convencionais e de proteção contra bactérias enteropatogênicas como critérios de seleção de leveduras de origem ambiental como probióticos. 2004. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2004.

MIGUEL, M. G. C. P. Identificação de microrganismos isolados de grãos de kefir de leite e de água de diferentes localidades. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação (Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola). Universidade de Lavras, Minas Gerais.

MOREIRA, M. E. C. *et al.* Atividade anti-inflamatória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1738-1742, 2008. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000700027&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 19 mar. 2021.

NARDI, R.D.; SANTOS, A.R.M.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; BENCHETRIT, L.C.; NICOLI, J.R. Antagonism against anaerobic and facultative bacteria through a diffusible inhibitory compound produced by a *Lactobacillus* sp. isolated from the rat fecal microbiota. *Anaerobe*, v.5, p.409-411, 1999.

OLIVEIRA, T. P. Viabilidade de microrganismos presentes no kefir adicionados de mele e resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. 2018. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Rio Pomba, 2018. Disponível em: https://mpcta.riopomba.ifsudestemg.edu.br/pdf/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Thatiana_versa_o_final.pdf. Acesso em: 20 abr. 2021.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 25, p. 404-408, 2005.

REIS, M. P. Suplementação de um probiótico para frangos de corte submetidos ao estresse térmico. 2016.

SANTOS, F. L. *et al.* Revista Extensão. Revista Extensão. Vol. 3, n. 202. Endereço/ Address, p. 202, 2012.

SANTOS, T. T. *et al.* A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. *Revista científica do ITPAC*, v. 4, n. 1, p. 40 - 49, 2011.

SANTOS, F. L. *et al.* Kefir: uma nova fonte alimentar funcional. *Diálogos & Ciência*, v. 11, p. 01-16, 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/290121978_Kefir_uma_nova_fonte_alimentar_funcional. Acesso em: 22 mar. 2021.

SANTOS, Priscila Souza *et al.* Potencial bioterapêutico dos probióticos. *Revista Cereus*, 12(1), 2-15, 2020.

SILVA, S.H.; VIEIRA, E.C.; DIAS, R.S.; NICOLI, J.R. Antagonism against *Vibrio cholerae* by diffusible substances produced by bacterial components of the human faecal microbiota. *J. Med. Microbiol.*, v.50, p.161-164, 2001.

SILVEIRA, T. F. V.; VIANNA, C. M. M.; MOSEGUI, G. B. G. Brazilian legislation for functional foods and the interface with the legislation for other food and medicine classes: contradictions and omissions. *Physis*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1189-1202, 2009. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-73312009000400015&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em 19 mar. 2021.

STRINGHETA, P. C. *et al.* Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 181-194, 2007.

TEJERO-SARIÑENA, S. *et al.* Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella* Typhimurium and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains?. *Anaerobe*, v. 24, p. 60-65, 2013.

WESCHENFELDER, S. *et al.* Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte, v. 63, n. 2, p. 473-480, Apr. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352011000200027&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 Mar. 2021.

WITTHUHM, R. C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *Journal Dairy Journal*, v. 15, p. 383-389, 2005.