

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE KEFIR E AVALIAÇÃO DA
PROPRIEDADE INIBITÓRIA SOBRE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS**

Gabriela Grandi Chamon

Unai-MG 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE KEFIR E AVALIAÇÃO DA
PROPRIEDADE INIBITÓRIA SOBRE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS**

Gabriela Grandi Chamon

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Janaína Fernandes Gonçalves

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Agrárias, como parte dos
requisitos exigidos para a conclusão do curso.

Unaí-MG

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE GRÃOS DE KEFIR E AVALIAÇÃO DA
PROPRIEDADE INIBITÓRIA SOBRE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS**

Gabriela Grandi Chamon

Orientadora:

Profª. Drª. Janaína Fernandes Gonçalves

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Ciências Agrárias, como parte dos
requisitos exigidos para a conclusão do curso.

APROVADO em 27 / 07 / 2018

Micheline Carvalho Silva – UFVJM

Rafael Eduardo Vansolini de Oliveira – UFVJM

Janaína Fernandes Gonçalves
Janaína Fernandes Gonçalves – Orientadora UFVJM

SUMÁRIO

1.0.INTRODUÇÃO.....	5
2.0.OBJETIVOS.....	7
3.0.MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1.Preparo do inóculo e fermentação do Kefir.....	7
3.2.Determinação de coliformes pela técnica dos tubos múltiplos – (NMP).....	8
3.3. Enumeração e análise microbiológica de mesófilos totais.....	9
3.4.Avaliação da qualidade microbiológica das amostras.....	9
3.5. Teste do antagonismo <i>in vitro</i>	10
4.0.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
5.0.CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
6.0.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1.0. INTRODUÇÃO

O interesse em alimentos funcionais, tem crescido cada vez mais e esses alimentos estão sendo procurado por pessoas preocupadas com sua saúde e bem estar. O consumo de alimentos fermentados com capacidade probiótica, considerados funcionais, tem mostrado melhorias na qualidade de vida e maior longevidade para quem os consome, pois além de sua função nutricional e de fornecer energia, possuem capacidade de agregar melhorias ao funcionamento do organismo.

Diante dessa realidade, o kefir tem sido utilizado como probiótico para o equilíbrio da microbiota intestinal em que estão presentes os lactobacilos e bifidobactérias, pertencentes ao grupo de bactérias benéficas. Além disso, o kefir possui vitaminas, minerais, gorduras, carboidratos, aminoácidos em sua composição conferindo ao produto uma característica singular e acredita-se que o alimento possua outras propriedades terapêuticas, como: efeito anticarcinogênico e estimulação do sistema imune e como cicatrizante quando utilizado na fabricação de pomadas (FUKURAWA; MATSUOKA; YAMANAKA, 1990; KUBO; ODANI, NAKAMURA, 1992; RODRIGUES et al., 2005; TAMAI et al., 1996; THOREUX; SCHMUCKER, 2001; ZACCONI, 1995). Considera-se que alimentos probióticos também melhoram a digestão da lactose e diminuem os sintomas de intolerância.

O kefir é um produto lácteo, uma bebida levemente ácida, com pH entre 4,2 e 5,5 ou menor, dependendo do tempo que sofreu fermentação, por bactérias ácido lácticas conhecidas como grãos de kefir: *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* que produzem ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir também são constituídos por leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e leveduras não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*), *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium sp.* e *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*. Possui consistência semelhante ao iogurte, de sabor agridoce mais ácido e de alta digestibilidade (MARCHIORI, 2007; LEITE et al., 2013).

Kefir quer dizer “bem-estar”, o termo vem do turco e tem diversas traduções como, kefir, búlgaros, cogumelos de iogurte, plantas do iogurte, kefer, knapon, kippi e tibicos, originários das montanhas do Cáucaso.

Os grãos de kefir são massas gelatinosas, possuem uma aparência semelhante à couve-flor e massa de tapioca. Nos grãos, existe uma associação simbiótica de leveduras,

bactérias acidoláticas, bactérias ácidoacéticas, entre outros microorganismos. (OTLES; CAGINDI, 2003). Tem se destacado por apresentar esses benefícios funcionais probióticos para a manutenção da microbiota intestinal, assim como outros produtos fermentados da indústria, porém com baixíssimo custo.

As bactérias ácido-láticas dos grãos de kefir também podem produzir substâncias com propriedades antimicrobianas que podem inibir bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de ter efeito positivo sobre alguns fungos. Alguns estudos realizados mostram que os grãos de kefir produzem bacteriocinas, que são proteínas com atividade antibiótica provenientes das bactérias ácido lácticas do kefir (RODRIGUES; CARVALHO; SCHNEEDORF, 2005; GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 2000 apud MARCHI, 2015).

Os grãos de kefir são capazes de realizar fermentação em diversos alimentos, como leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, açúcar mascavo, sucos de frutas, extrato de soja, entre outros. A produção da bebida ocorre quando os grãos de kefir são adicionados no substrato de preferência, os mais comuns são o leite pasteurizado ou esterilizado e água contendo açúcar mascavo. Assim, este alimento nutritivo e com propriedades terapêuticas pode ser incluído na alimentação diária do ser humano. Os grãos são amarelos claros quando cultivados em leite e são pardos quando cultivados em água com açúcar mascavo. (OTLES e CAGINDI, 2003; WITTHUNHN et al., 2004; WESCHENFELDER, 2011).

A composição microbiana gerada pela fermentação em água é semelhante à cultivada em leite. Geralmente, o sabor e o aroma do kefir são resultados da interação simbiótica das bactérias e das leveduras que se encontram naturalmente nos grãos. As características do kefir estão associadas a inúmeros fatores, entre eles: a proporção grãos e leite utilizado, a proporção de microorganismos existentes, a temperatura e tempo de incubação, higiene durante a manipulação dos grãos, lavagem dos grãos e refrigeração.

O kefir difere de outros leites fermentados porque é resultado da atividade simbiótica do metabolismo de vários tipos de micro-organismos. Os *Lactobacillus* compõem a maior parte da população microbiana do kefir, porém varia conforme a região de origem, o tempo em que foi conservado, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as práticas usadas em sua manipulação (MAGALHÃES et al., 2011; WITTHUHN et al., 2004).

Atualmente o Kefir pode ser comprado, não no Brasil, mas também pode ser adquirido através de doação de uma “muda” pois possui capacidade de multiplicação e aumento de volume dos grãos. Os grãos multiplicam-se conforme vão sendo cultivados e crescem mais rapidamente quando os grãos não são lavados, quando não são pressionados nas peneiras e quando ocorre agitação do frasco durante o processo de fermentação (FARNWORTH, 2003; SANTOS, 2013).

2.0. OBJETIVOS

- Analisar as características microbiológicas do kefir recém preparado e comparar com as de um iogurte natural e de um kefir armazenado;
- Pesquisar a presença ou ausência de Coliformes totais, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* no kefir;
- Avaliar se há reação antimicrobiana do kefir em culturas bacterianas em que foi inoculado.

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Preparo do inóculo e fermentação do Kefir

Para o preparo do inóculo, duas amostras de grãos de kefir provenientes de cultivo doméstico em leite pasteurizado foram utilizados. Um recém preparado e outro acondicionado em geladeira por 5 meses. Utilizou-se como controle de qualidade um iogurte natural industrializado comprado em supermercado (Canto de Minas). Os grãos de kefir foram oriundos de domicílios da cidade de Boa Ventura de São Roque, PR, Brasil. Os 1 mL das três amostras foram transferidos asépticamente para erlenmeyers, contendo 50 mL de caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) e cultivados à temperatura de 25°C, sem agitação, por um período de 24 horas. Após o período de incubação, as amostras foram homogeneizadas e diluídas em uma série de diluições decimais seriadas, usando-se como diluente água peptonada estéril a 0,5% (FDA, 2010).

3.2. Determinação de coliformes pela técnica dos tubos múltiplos – Número Mais Provável (NMP)

As amostras multiplicadas em caldo nutritivo BHI (Brain Heart Infusion) foram inoculadas, em triplicata, 0,1 µL, 1 mL e 10 mL de cada diluição da amostra, em tubos contendo 9 mL caldo lactosado (1X e 2X) com tubo de Durham. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. Foram considerados positivos aqueles tubos onde houve produção de gás nos tubos de Durham. A partir do número de tubos positivos, foi determinado o NMP / mL coliformes empregando-se, para tal, a tabela de Hoskins (FDA, 2010). A técnica emprega o sistema de 3 séries de 3 tubos, com diluições decimais sucessivas. Na segunda série, inocula-se um volume 10 x menos, ou seja, 1 mL. Na terceira série, inocula-se um volume 10x menor que o da série anterior, ou seja, 1 mL. Logo, a técnica dos tubos múltiplos é um método probabilístico. A partir dela é possível determinar o Número Mais Provável de bactérias do grupo coliforme em 100 mL de água (NMP/100 mL). O NMP visa estimar a densidade de microrganismos presentes na amostra de água ou alimentos, baseado na frequência de resultados positivos. Costumam ser aplicados para a pesquisa de coliformes em água e alimentos. Assim, podemos obter informações sobre a população presuntiva de coliformes (teste presuntivo), sobre a população real de coliformes totais (teste confirmatório) e sobre a população de coliformes termo tolerantes de origem fecal.

A positividade do teste é indicada pela captação de gás pelos tubos de Durham, que é produto do metabolismo bacteriano. Mesmo que seja observável a presença de gás em 24 horas de incubação, o ideal é realizar a leitura no período de 48 horas. O tamanho da bolha varia de acordo com a produção de gás proveniente da fermentação da bactéria:

- Coliformes totais - indicadores de contaminação pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Os gêneros são: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*. Estas últimas são normalmente de origem ambiental. Fermentam lactose e produzem gás.
- Coliformes termotolerantes ou fecais - indicadores de contaminação fecal. Toleram altas temperaturas (até 44,5°C). Fermentam lactose e produzem gás.

3.3. Enumeração e análise microbiológica de mesófilos totais

Para determinação dos principais grupos microbianos presentes nos grãos de Kefir, foram realizados plaqueamentos em meios específicos. Em que Amostra 1 (iogurte), Amostra 2 (Kefir recém preparado a partir de grãos ativos) e Amostra 3 (Kefir armazenado em geladeira por 5 meses).

Foi utilizada uma alíquota de 100 µL de cada amostra, para a contagem total de bactérias e leveduras, que em seguida foi espalhada com Alça de Drigalsky, utilizando-se a técnica de plaqueamento por superfície. A semeadura foi realizada em duplicata. Para a enumeração dos micro-organismos, realizaram-se diluições seriadas de base 10, para o plaqueamento nos referidos meios de cultivo, com as seguintes diluições: 10^{-1} , 10^{-2} , para os meios: Candida BCG Agar Base (meio para levedura), Ágar Sabouraud (meio para levedura), Standard Methods Agar, que são meios nutritivos destinados a contagem total de micro-organismos em materiais diversos. As diluições e os plaqueamentos foram feitos próximos a chama da lamparina e as placas incubadas em estufa, a 37°C, durante 24 horas, para crescimento bacteriano e das leveduras. Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram classificadas de acordo com as características e as estruturas morfológicas, buscando caracterizar os diferentes morfotipos crescidos nos meios de cultivo.

Adotou-se como referencial para a análise e interpretação dos resultados, os padrões microbiológicos do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Leite cru refrigerado (Brasil, 2002).

3.4. Avaliação da qualidade microbiológica das amostras

A análise serve como indicativo de deficiência na qualidade higiênica da matéria-prima devido à aplicação de processo tecnológico inadequado, manipulação higiênica incorreta ou manutenção em condições impróprias.

Nesta avaliação microbiológica, as amostras foram submetidas a análise de bactérias contaminantes em meios seletivos e diferenciais, visando a pesquisa de *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli*. Para o isolamento de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) foi utilizado o meio ágar sal Manitol, o qual é específico para o isolamento e enumeração deste microrganismo, pois este meio contém nutrientes que favorecem o crescimento de *S. aureus*. Para o isolamento de *Escherichia coli* (*E. coli*)

utilizou-se o meio ágar MacConkey, que contém sais biliares e cristal de violeta que separam Gram-negativas (enterobactérias) e diferencia fermentadoras de não-fermentadoras de lactose e o meio ágar Eosina Azul de Metileno, que diferencia fermentadores de lactose (*E. coli*) de não fermentadores (*Salmonella*, *Shigella*).

As amostras foram espalhadas sobre o ágar com o auxílio de um swab estéril, e as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Foram consideradas positivas, as placas onde houve crescimento microbiano visível a olho nu, sendo que as placas onde houve mudança na coloração do meio foram consideradas sugestivas de *S. aureus* ou *E. coli*.

3.5. Teste do antagonismo *in vitro*

Para a avaliação da atividade antimicrobiana (resistência ou sensibilidade de uma bactéria a um composto biocida) realizou-se duas avaliações diferentes, para determinar o espectro antimicrobiano. Na primeira papeis filtros estéreis, foram impregnados com a cultura das amostras avaliadas que foram multiplicadas em meio líquido. Em outra avaliação, no centro da placa uma gota das diferentes amostras foi adicionada, com o auxílio da pipeta Pasteur, previamente inoculada com *S. aureus* e *E. coli*. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 - 48 horas (não inverteu-se as placas).

O teste seguiu a linha de raciocínio do teste de disco - difusão em ágar, que foi descrito em 1966 por Kirby e Bauer. Neste teste, discos de papel impregnados com o antibiótico são colocados na superfície do ágar uniformemente, que foi antecipadamente semeado com o micro-organismo. A droga se difunde no ágar. Caso ocorra inibição no crescimento do agente sensível, formará um halo em torno do disco de antibiótico, que deve ser medido pelo seu diâmetro em mm, e comparado com tabelas padronizadas.

4.0. Resultados e Discussão

Não foi possível determinar o número mais provável de coliformes, pelo teste presuntivo nas amostras 1 (iogurte) e 2 (Kefir recém preparado a partir de grãos ativos). Na amostra 1, não foi observado produção de gás em nenhum dos tubos (Figura 1). Os resultados indicam que a amostra 1 está pronta para o consumo.

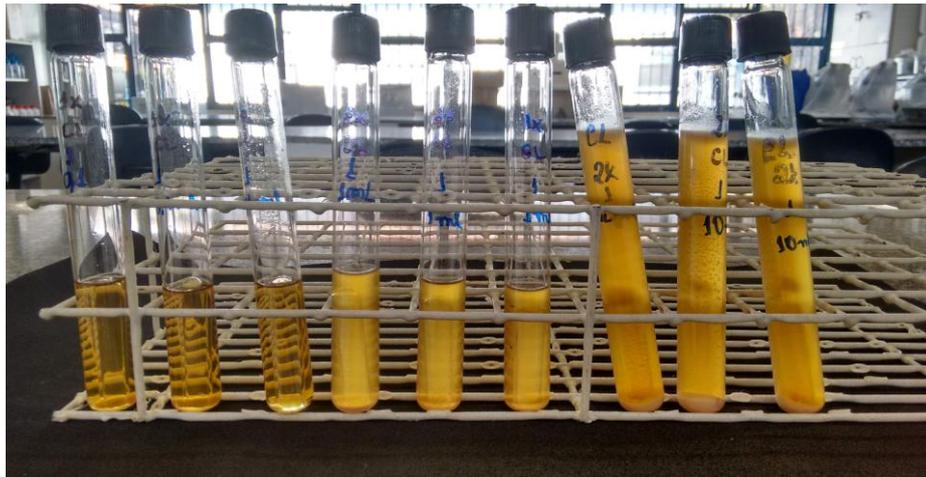


Figura 1: Teste presuntivo da Amostra 1 (iogurte) em tubos de caldo lactosado (LST).

Já na amostra 2, todos os tubos foram positivos, ou seja, foi detectada a evidência de coliformes pela presença de gás nos tubos de Durham (Figura 2). No entanto, este resultado indica possíveis erros durante as manipulações. Logo, recomenda-se a realização de novas diluições, pois este valor (3 3 3) não é encontrado na tabela. Os coliformes são sempre indesejáveis nos alimentos, principalmente pelo fato que o habitat preferencial dessas bactérias é o solo, água e intestino de animais. Estas bactérias diminuem a qualidade e a vida dos alimentos lácteos e derivados.



Figura 2: Teste presuntivo da Amostra 2 (Kefir recém preparado a partir de grãos ativos) em tubos de caldo lactosado (LST).

Em relação a Amostra 3 (Kefir armazenado em geladeira por 5 meses), o número de tubos apresentando resultado positivo foi (3 3 1) (Figura 3). Sendo assim, o número mais provável por 100 mL é de 460, o que confirma que a amostra 3 está dentro do limite de confiança para o consumo. Neste teste, através do emprego de inóculos múltiplos, pode-se determinar o número mais provável do grupo microbiano na amostra.

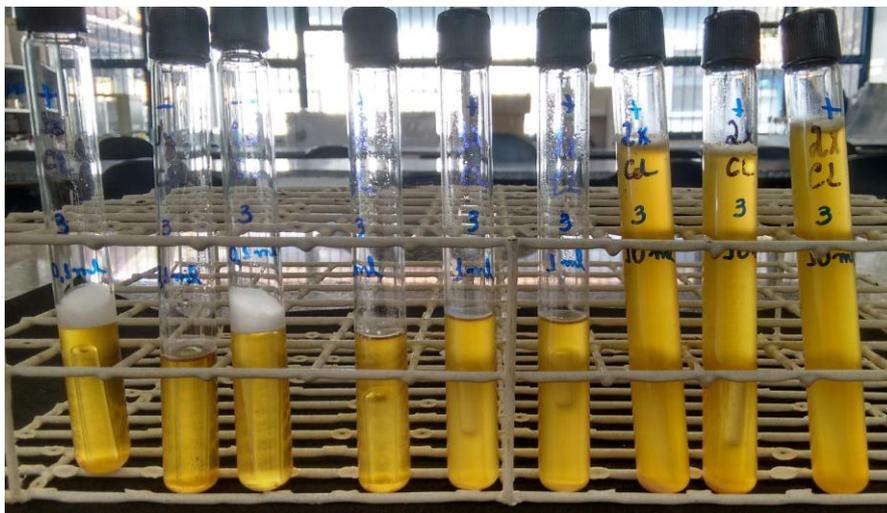


Figura 3: Teste presuntivo da Amostra 3 (Kefir armazenado em geladeira por 5 meses) em tubos de caldo lactosado (LST).

Como o padrão microbiológico exigido é ausência de *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes em 100 mL de amostra, a presença de *Escherichia coli* foi avaliada pela semeadura a partir dos tubos positivos em EC e meio seletivo e diferencial Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) e Agar Macconkey (AM). A observação de resultados positivos ou negativos obtidos em cada teste é essencial para evidenciar a presença ou ausência de contaminantes numa amostra.

Com relação ao crescimento de leveduras e bactérias presentes nas amostras, os resultados encontrados foram positivos em todos os meios utilizados quanto ao seu crescimento (Figuras 5, 6 e 7). No entanto, não foi possível quantificar o número de colônias viáveis, uma vez que realizou-se apenas duas diluições seriadas, o número de leveduras e bactérias, foi muito acima ao permitido para contagem de colônias viáveis em placas. Segundo Moraes e Ofugi (2010), o número de colônias considerado significativo para bactérias e /ou leveduras em geral seria entre 30 e 300 UFC. Por essa razão os cálculos foram realizados de acordo com este método considerando abaixo ou acima

deste valor, não significativo para contagem. Todas as amostras tiveram crescimento significativo tanto de bactérias quanto de leveduras (Figura 5).

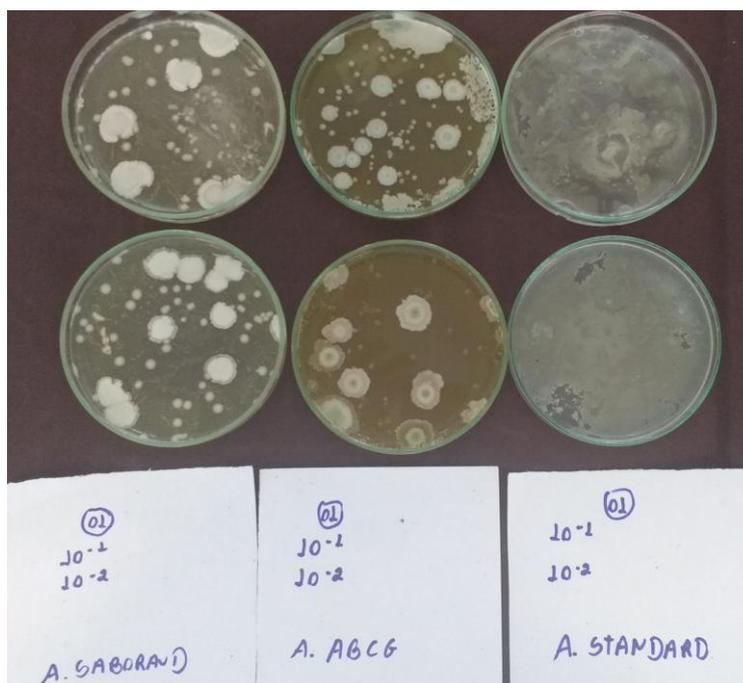


Figura 5: Crescimento de leveduras e bactérias em meios Agar Sabouraud Dextrose Agar; Candida BCG Agar Base e Agar Padrão – Standard Methods Agar / Amostra 1.

Os resultados encontrados em relação as amostras de Kefir, estão de acordo com os publicados por Santos et al. (2003), que afirmou que o grão de kefir é formado por uma grande variedade de bactérias, as quais não foram completamente identificadas e a influência geográfica do grão deve ser considerada para avaliação da diversidade dos micro-organismos. Com relação às leveduras, identificou-se espécies fermentadoras (*Torulaspota delbrueckii* e *Zygosaccharomyces fermentati*) e não fermentadora (*Saccharomyces cerevisiae*), o que também foi encontrado por outros autores (ÂNGULO; LOPEZ; LEMA, 1993; KOROLEVA, 1988; KWAK; PARK; KIM, 1996; MARSHALL, 1987), sendo as variações encontradas provavelmente advindas da origem da amostra, mas permanecendo dentro dos padrões do produto, como sugerido por GARROTE; ABRAHAM; ANTONI (2001).

De acordo com Farnworth e Mainville (2003), a lista de micro-organismos nos grãos de kefir em diferentes partes do mundo não é muito extensa, porque espécies contaminantes provavelmente não sobreviveriam devido à produção de compostos antagonistas pela microbiota simbiótica do kefir.

As leveduras específicas do kefir exercem um papel fundamental na formação do sabor e aroma (GLAESER; HANGST; ZIEGLER, 1986), possuindo também a propriedade de estimular bactérias do ácido lático em aumentar a produção de exopolissacarídeos (CHEIRSILP; SHIMIZU; SHIOYA, 2003). As leveduras encontradas estão de acordo com as citadas na literatura, sendo que *Torulaspóra delbrueckii* e *Saccharomyces cerevisiae* foram as mais citadas (ÂNGULO; LOPEZ; LEMA, 1993; FRANZETTI et al., 1998; SIMOVA et al., 2002).

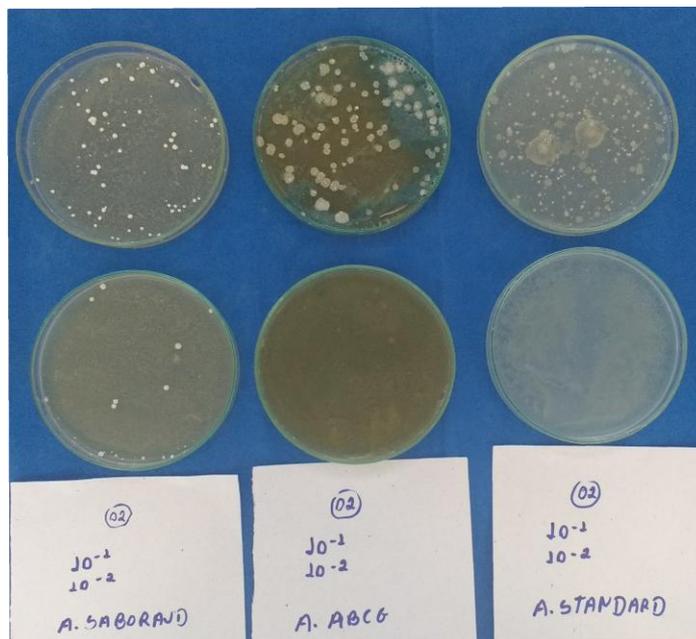


Figura 6: Crescimento de leveduras e bactérias em meios Agar Sabouraud Dextrose Agar; Candida BCG Agar Base e Agar Padrão – Standard Methods Agar / Amostra 2.

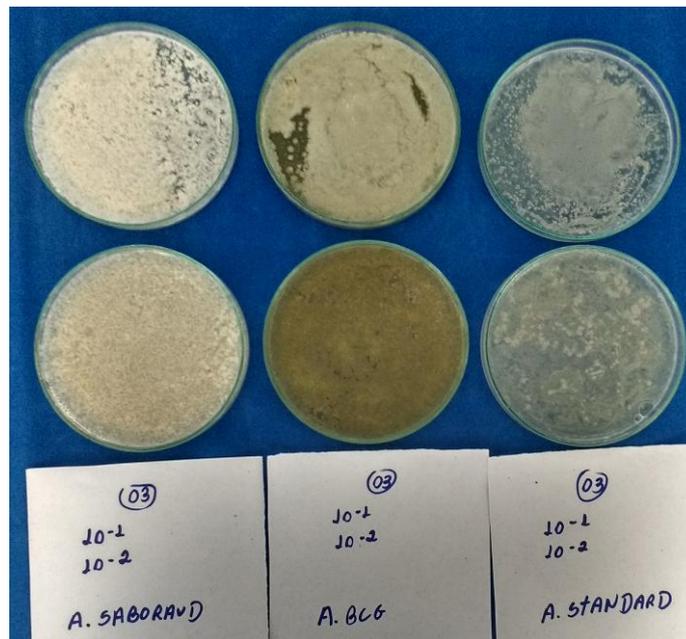


Figura 7: Crescimento significativo de leveduras e bactérias em meios Agar Sabouraud Dextrose Agar; Candida BCG Agar Base e Agar Padrão – Standard Methods Agar/ Amostra 3.

Após a identificação morfológica das colônias nos diferentes meios nutritivos para leveduras e bactérias, partiu-se para a análise da qualidade das amostras. Para tal, utilizou-se diferentes meios seletivos, que favorecem o crescimento de uma determinada bactéria de interesse, impedindo o crescimento de outras bactérias; e meios diferenciais, que possuem substâncias que evidenciam uma característica que permite separar um grupo ou uma espécie de micro-organismo, facilitando a identificação de um grupo de bactérias de interesse, enquanto existem outras que crescem no mesmo meio, ou seja, identifica o micro-organismo, pela capacidade ou não de utilizar determinados nutrientes (especialmente açúcares) no meio.

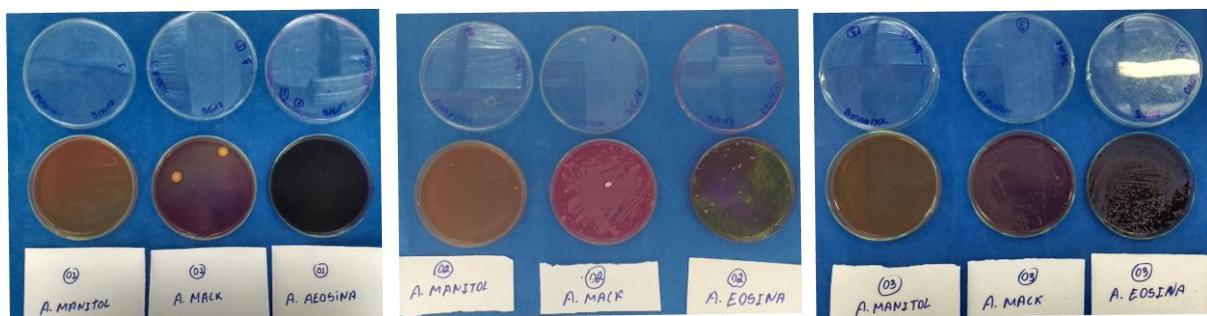


Figura 8: Crescimento de bactérias em meios Agar Manitol (A3), Agar MacConkey) e Agar Eosina Azul de Metileno

O ágar sal manitol (AM) é utilizado para o isolamento de *Staphylococcus aureus* de amostras biológicas. A degradação do açúcar manitol com a produção de ácido, muda a cor do meio de alaranjado a amarelo. Logo, nesta avaliação não foi detectada a presença de *S. aureus* em nenhuma das amostras avaliadas (Figura 8). Os estafilococos podem crescer na presença de elevadas concentrações de sal e o *S. aureus* pode fermentar o manitol produzindo colônias de cor amarela.

O ágar Eosina azul de metileno (EMB) é um meio de cultura diferencial que inibe o crescimento de bactérias Gram positivas e indica se a bactéria é fermentadora ou não de lactose. Bactérias fermentadoras de lactose apresentam-se em colônias com o centro preto. Colônias de *Escherichia coli* são facilmente identificáveis por apresentarem coloração verde metálico no meio EMB. Portanto, nesta análise identificou a presença de *E. coli* na amostra 2 (Figura 8).

O ágar MacConkey é destinado para o crescimento de bactérias Gram negativas e indica a fermentação de lactose. Colônias de bactérias que fermentam lactose tornam o meio rosa choque e as bactérias que não são fermentadoras de lactose tornam o meio amarelo claro. De acordo com esta informação, foi possível detectar bactérias fermentadoras na amostra 2 (Figura 8).

No entanto, como estes resultados não foi possível determinar a qualidade microbiológica das amostras avaliadas. Uma vez que, muitas bactérias lácteas benéficas podem ter tido inibição do seu crescimento. Este fato se deve, pela utilização de caldo nutritivo BHI, que não é um meio de enriquecimento propício para esta população de bactérias presentes nas amostras lácteas. Portanto, houve a necessidade de repetir os ensaios de qualidade microbiológica, com a utilização direta das amostras.

Após o isolamento das diferentes amostras em ágar verde brilhante e ágar manitol (Figura 9), os resultados indicaram que na amostra 2, não indicou a presença de *S. aureus* pela utilização do ágar manitol. Já na amostra 3, foi possível detectar a presença de *S. aureus* e de enterobactérias pela utilização dos dois meios, uma vez que ambos os meios se diferenciaram para a coloração amarela, indicando a presença destas bactérias contaminantes (Figura 9).

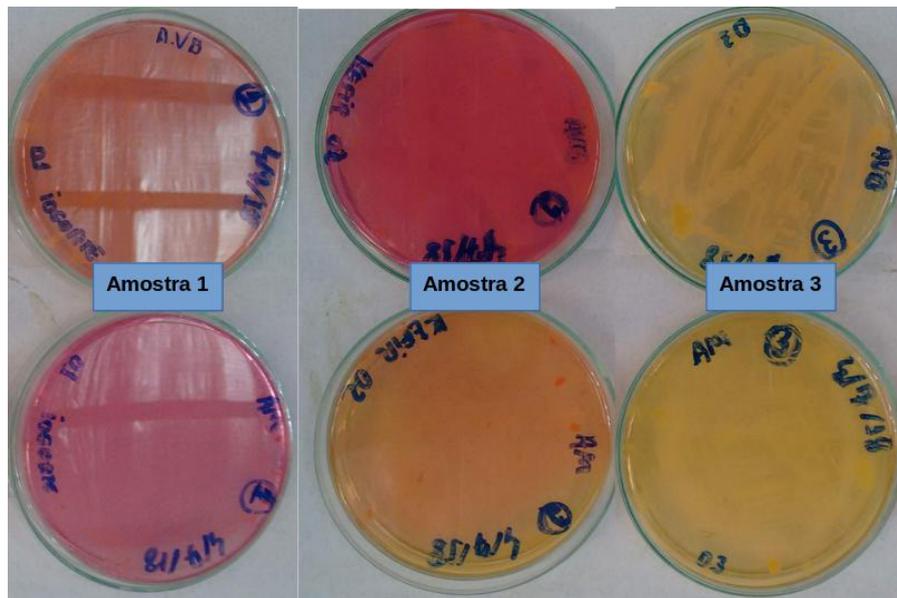


Figura 9: Crescimento de bactérias em meios: Agar Verde brilhante e Agar Manitol.

Em uma última análise testou-se o efeito antagônico das diferentes amostras contra diferentes bactérias. O critério de determinação dos resultados foi a presença ou ausência de halo de inibição, independentemente de seu tamanho. O teste para verificação da capacidade das amostras em inibir o crescimento de micro-organismos patogênicos foi realizado devido ao fato de ensaios preliminares, com impregnação das amostras em papel filtro, não resultar em dados satisfatórios. Foram testadas as seguintes linhagens de referência como reveladora: *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* para as três amostras. Os resultados evidenciaram a presença de um halo de inibição quando se testou o kefir (amostra 2) contra *E. coli* (Figura 10). Nas demais amostras 1 e 3 observou-se a ausência de halo de inibição, o que indica que a bactéria *E. coli* foi resistente nestes ensaios.

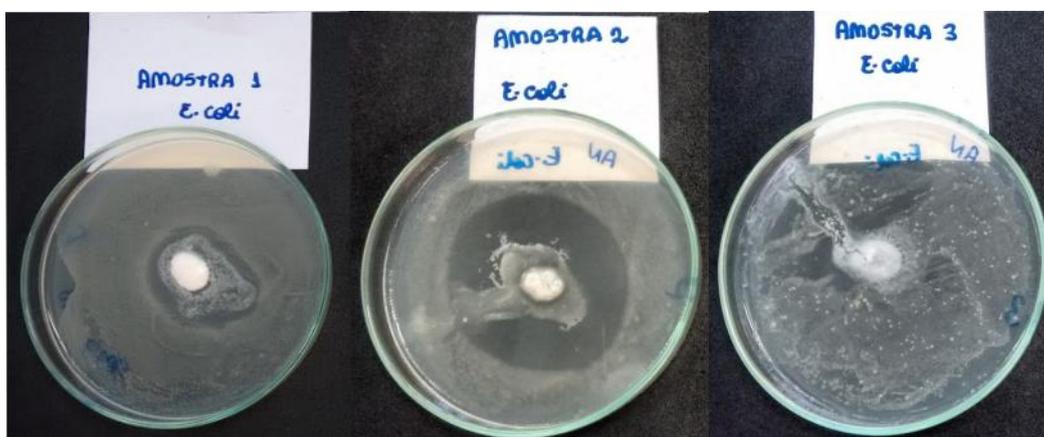


Figura 10: Teste de antagonismo das diferentes amostras contra *E. coli*.

A utilização de alimentos contendo micro-organismos probióticos, como o kefir, tem sido pesquisada como alternativas ao uso de antibióticos. Os testes de antagonismo *in vitro* (Figura 10), demonstraram a produção de substâncias antagonistas através da amostra 2 (Kefir recém preparado) contra *E. coli*. Nenhuma das amostras inibiu o crescimento de *S. aureus*. Em vários trabalhos tem sido demonstrado o efeito antagonista do kefir. Utilizando como probiótico a cultura comercial liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* La-5, Pereira e Gómez (2007) conseguiram inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, num teste semelhante ao utilizado no presente trabalho. De acordo com este estudo a atividade inibidora é provavelmente decorrente de baixo pH e principalmente, da ação do ácido láctico, obtidos a partir do crescimento das bactérias lácticas. Porém os resultados *in vitro* não permitem concluir a efetividade do antagonismo *in vivo*, e dessa maneira vê-se a necessidade da avaliação da interação das substâncias inibitórias com os componentes dos alimentos e a potencialização ou não, de seus efeitos por outros antimicrobianos de alimentos, sendo necessários então estudos futuros.

5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foi possível a quantificação de leveduras e das bactérias presentes através das diluições seriadas. Isto, possivelmente, ocorreu devido ao tempo de cultivo das amostras. As contagens dos grupos microbianos observadas nas três amostras apresentaram diferenças que evidenciaram que produtos de origens diferentes apresentam microbiotas variadas conforme descrito em outros trabalhos semelhantes.

A amostra 2 (kefir recém preparado) apresentou inibição do crescimento, frente ao patógeno *Escherichia coli*. Essa capacidade de inibição apresentada é de importância uma vez que contribui para sua classificação como alimento funcional. Além disso, a técnica utilizada no estudo viabilizou a avaliação da bebida *in vitro*. Esse estudo permitiu constatar que as diferentes amostras apresentaram variações na microbiota e na capacidade de antagonizar patógenos.

6.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÂNGULO, L.; LOPEZ, E.; LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the galacian region (North West Spain). *Journal of Dairy Research*, Cambridge, v. 60, p. 263-267, 1993.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002.

CHEIRSILP, B.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirianofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 100. p. 43-53, 2003.

FARNWORTH E. R.; MAINVILLE, I. Kefir: a fermented milk product: handbook of fermented. *Journal of Funcional Foods*, St Jhon's, v. 4, p.77- 111, 2003.

FDA-U.S - Food and Drug Administration. *Bacterial Analytical Manual*.

FRANZETTI, L. et al. Microbiological and chemical investigations on "Sugar Kefir" drink. *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*, Milano, v. 48, p. 67-80, 1998.

FURUKAWA, N.; MATSUOKA, A.; YAMANAKA, Y. Effects of orally administered yoghurt and kefir on tumor growth in mice. *Journal of the Japanese Society of Nutrition and Food Science*, v. 43, p. 450-453, 1990.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Tecnologie*, Berlin, v. 30, p. 77-84, 1997.

GLAESER, H.; HANGST, E.; ZIEGLER, K. Biochemische charakterisierung der in molkereikefir und kefirulturen vorkommende hefen. *Deutsche Molkerei- Zeitung*, Kempten, v. 16, p. 483-490, 1986.

KOROLEVA, N. S. Technology of Kefir and kumys. *IDF Bulletin*, London, v. 227, p. 96-100, 1988.

KUBO, M.; ODANI, T.; NAKAMURA, S. Pharmacological study on kefir: a fermented milk product in Caucasus. I. on antitumor activity. *Yakagaku zsshi*, Tokyo, v. 112, p. 489-495, 1992.

KWAK, H. S.; PARK, S. K.; KIM, D. S. Biostabilization of kefir with a nonlactose-fermenting yeast. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 79, p. 937-942, 1996.

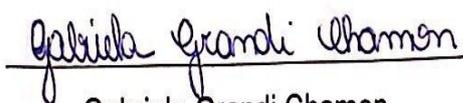
KWAK, N. S.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on currently regulatory terminology. *Food Control*, Vurrey, v. 12, p. 109-117, 2001.

MAGALHÃES, K. T. et al. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.42, n.2, p.693-702, June 2011.

- MARCHI, L. PALEZI, S. C; PIETTA, G. M. Caracterização e Avaliação Sensorial do Kefir Tradicional e Derivados. Unoesc & Ciência – ACET, Joaçaba, Edição Especial, p. 15-22, 2015.
- MARCHIORI, R.C. Caracterização do kefir e propriedades probióticas – uma revisão. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 62, n. 358, p.21-31, 2007.
- MARSHALL, V. M.; COLE, W. M.; BROOKER, B. E. Observation on the structure of kefir grains and the distribution of the microflora. Journal of Applied Bacteriology, London, v. 57, p. 491-497, 1984.
- MARSHALL, V. M. Fermented milks and their future trends: microbiological aspects. Journal of Dairy Research, Cambridge, v. 52, p. 559-574, 1987.
- OTLE, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. Pakistan Journal of Nutrition, v. 2, n. 2, p. 54-59, 2003.
- PEREIRA, V. G E GOMEZ, R. J. H. C. Atividade antimicrobiana de *Lactobacillus acidophilus*, contra microrganismos patogênicos veiculados por alimento. Ciências Agrárias, Londrina, v. 28, n. 2, p. 229-240, 2007.
- RODRIGUES, K. L. et al., Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. International Journal of Antimicrobial Agents, Amsterdam, v. 25, p. 404-408, 2005.
- SANTOS, F. L. Kefir: Produção Artesanal e Desenvolvimento de Produtos. Cruz das Almas: Editora UFRB, 2013, 42p.
- SIMOVA, E. et al. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, Houndmills, v. 28, p. 1-6, 2002.
- TAMAI, Y. et al. Effects of milk fermented by culturing with various lactic acid bacteria and a yeast on serum cholesterol level in rats. Journal of Fermentation and Bioengineering, Osaka, v.81, p. 181-182, 1996.
- THOREUX, K.; SCHMUCKER, D. L. Kefir milk enhances intestinal immunity in young but not old rats. Journal of Nutrition, London, v. 131, p. 807-812, 2001.
- WITTHUNHN, R. C. et al. Isolation and characterization of the microbial population of different South African Kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, v. 57, p. 33-37, 2004.
- WESCHENFELDER, S. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, n.2, p.473-480, 2011.
- ZACCONI, C. Competitive exclusion of *Salmonella kedougou* in kefir fed chicks. Microbiology Alimentation and Nutrition, Paris, v. 12, p. 387-390, 1995.

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial do presente trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.



Gabriela Grandi Chamon

gabyh_grandi@hotmail.com

Instituto de Ciências Agrárias – UFVJM

Avenida Vereador João Narciso, 1380 – Unai Minas Gerais