

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE KEFIR COLETADO EM DIFERENTES DOMICÍLIOS FRENTE À CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* NEWP 0022

Josyanne de Melo Alves*, Higor Rafael de Oliveira Lucindo*, Christiane Oliveira Jordão**, Cátia Rezende***

*Egressos do curso de Biomedicina pelo Centro Universitário de Votuporanga-Unifev.

**Doutora em Ciências Farmacêuticas, docente do Centro Universitário de Votuporanga – Unifev.

***Mestre em Biotecnologia, docente do Centro Universitário de Votuporanga – Unifev.

*Autor para correspondência e-mail: sw_888jp@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE

Atividade probiótica
Atividade antibacteriana
Kefir

KEYWORDS

Probiotic activity
Antibacterial activity
Kefir

RESUMO

Os probióticos são microrganismos vivos caracterizados como alimento funcional que desempenham papel fundamental na promoção a saúde. O kefir é muito utilizado na atualidade, é considerada uma bebida láctea fermentada elaborada a partir dos grãos de kefir. Estudos destacam atividade deste probiótico no tratamento de doenças intestinais; propriedade antimicrobiana também é relatada através dos efeitos dos *Lactobacillus* do kefir frente a *E. coli*. O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização físico-química e avaliar a atividade antimicrobiana de kefir frente a cepas de *Escherichia coli* NEWP 0022. Foram coletadas duas amostras de kefir de diferentes domicílios, e analisados durante seis dias verificando sua ação. Utilizando a metodologia de Dornic (teste de acidez titulável) e o teor de glicídios redutores em lactose; e avaliação antimicrobiana pelo método de difusão em poços. O kefir “A” e “B” apresentaram aumento gradual de ácido láctico e diminuição de lactose pós análises. Quando avaliado sua atividade antibacteriana notou-se que o kefir não apresentou ação inibitória a cepas de *E. coli* NEWP 0022.

ABSTRACT

PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF KEFIR COLLECTED IN DIFFERENT HOUSES AGAINST CEPAS OF *ESCHERICHIA COLI* NEWP 0022

Probiotics are living microorganisms characterized as functional food that play a key role in promoting health. Kefir is widely used today, it is considered a fermented dairy drink made from kefir grains. Studies highlight the activity of this probiotic in the treatment of intestinal diseases; antimicrobial property is also reported through the effects of kefir *Lactobacillus* versus *E. coli*. The objective of the present work was to perform the physico-chemical characterization and to evaluate the antimicrobial activity of kefir against strains of *Escherichia coli* NEWP 0022. Two samples of kefir were collected from different households and analyzed for six days to verify their action. Using the Dornic methodology (titratable acidity test) and the lactose reducing sugar content; and antimicrobial evaluation by the well diffusion method. The kefir “A” and “B” presented a gradual increase of lactic acid and lactose reduction after analysis. When evaluated its antibacterial activity it was observed that kefir did not present an inhibitory action to *E. coli* strains NEWP 0022.

Recebido em: 10/01/2019

Aprovação final em: 20/03/2019

DOI:10.25061/2527-2675/ReBraM/2019.v22i2.641

INTRODUÇÃO

Os probióticos são classificados como micro-organismos vivos, que quando ingeridos em determinada quantidade exercem um efeito benéfico para o organismo. Estes podem ser agregados à dieta a fim de promover o desenvolvimento de uma microbiota bacteriana intestinal sadia. Podem ser também descritos como: bioterapêuticos, bioprotetores e bioprofiláticos (REIG, 2002).

O primeiro estudo científico sobre probióticos foi proposto no Instituto Pasteur, com o trabalho de Metchnikoff, postulou que estes exerciam benefícios ao hospedeiro, pois antagonizavam as bactérias perniciosas no intestino (FULLER, 1991).

Probiótico é caracterizado como um alimento funcional, portanto tem papel fundamental na promoção da saúde e não para cura de doenças, sendo inoculados em alimentos de uso cotidiano. Tem efeito na modulação da microbiota intestinal na melhora na barreira da mucosa intestinal e modulação do sistema imunológico, fatos que estimulam cada vez mais a procura por estes alimentos (WENDLING; WESCHENFELDER, 2013; SOUZA et al., 2010).

São alimentos utilizados como adjuvantes do tratamento de doenças, comprovados em estudos científicos eficácia no tratamento de doenças intestinais, como as diarreias induzidas por rotavírus, diarreias por uso de antibióticos, doença intestinal inflamatória e colite; ainda inibem o crescimento de bactérias patogênicas por sua capacidade de produzir substâncias como o ácido lático e o acético, o peróxido de hidrogênio e o diacetil (BALLUS et al., 2010; PROTIC et al., 2005; RAIZEL et al., 2011).

Os seus efeitos anticarcinogênicos podem estar relacionados à inibição de enzimas pró-carcinogênicas ou por sua capacidade em estimular o sistema imunológico; outro efeito relatado é sobre a redução da atividade ulcerativa quando se faz uso de probióticos (GOLDIN; GORBACH, 2008; SAAD, 2006).

Os principais gêneros representantes dos probióticos pela promoção da saúde são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (RAIZEL et al., 2011). As Bifidobactérias são caracterizadas como micro-organismos gram-positivos, não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase negativos e anaeróbicos; esses micro-organismos quando de origem humana são capazes de utilizar a glicose, galactose, lactose e a frutose como fontes de carbono. Já os *Lactobacillus* são micro-organismos geralmente gram-positivos, incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, com forma bacilar ou cocobacilar, aerotolerantes ou anaeróbios. Além das bactérias existem leveduras probióticas; as vantagens em se usar leveduras estão relacionadas à sua ação termotolerante, não patogênica e pelo fato de serem liofilizadas (STEFE et al., 2008).

Um probiótico muito usado na atualidade é o kefir, considerado uma bebida láctea fermentada, elaborada através de seus grãos. Seu aspecto viscoso, efervescente e espumoso é evidente, apresentam um sabor acidificado e ligeiramente alcoólico por consequência dos processos fermentativos envolvidos e seus produtos finais (WESCHENFELDER, 2009 *apud* WITTHUHN et al., 2004).

Tem origem das montanhas do Cáucaso, do Tibet e da Mongólia, onde há muitos anos atrás realizava-se a estocagem de leite de cabra ou de ovelha em odres de barro, neste leite era acrescentado fragmentos de estômago de carneiro ou veado, e com a agitação do conteúdo em tempos determinados era observado a sua coagulação, esse processo era repetido sem a limpeza dos odres, formava-se uma crosta de micro-organismos vivos que conseguiam se adaptar aquelas condições. Sabe-se que sua composição é variável e influenciável pelas diferenças entre regiões geográficas, tempo de utilização, substrato utilizado e a técnica de manipulação (WESCHENFELDER, 2009 *apud* SILVA, 1978; LIU et al., 1983; KOROLEVA et al., 1984; SOUZA et al., 1984; WITTHUHN et al., 2004; WSZOLEK et al., 2001).

Os micro-organismos presentes apresentam relação simbiótica, sendo estes, bactérias ácido lácticas, ácido acéticas e leveduras envolvidas por uma matriz de polissacarídeos chamada de kefiran. Dentre a complexidade de micro-organismos que podem ser encontrados nos grãos de kefir o gênero *Lactobacillus* representa uma grande proporção (WOUTERS et al., 2002; PINTADO et al., 1996; HERTZLER et al.,

2003; OTLES; CAGINDINI, 2003). Os micro-organismos que podem ser encontrados nos grãos de kefir estão listados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da microbiota encontrada nos grãos de kefir.

Bactérias	Leveduras
<i>Lactobacilli</i>	<i>Klyveromyces species</i>
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Klyveromyces marxianus</i>
<i>Lactobacillus kefirano faciens</i>	<i>Klyveromyces lactis</i>
<i>Lactobacillus kefir granum</i>	<i>Saccharomyces species</i>
<i>Lactobacillus parakefir</i>	<i>Saccharomyces cerevesiae</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Saccharomyces unisporus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Saccharomyces exiguus</i>
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	<i>Saccharomyces turicensis</i>
<i>Lactobacillus gasserii</i>	<i>Saccharomyces del brueckii</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Torulas poraspécie</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Torulas poradel brus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Torulas poradel brueckii</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Candida species</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Candida pseudo tropicalis</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Candida tenuis</i>
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	<i>Candida inconspicua</i>
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Candida maris</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Lactobacillus viridescens</i>	<i>Candida tannotelerans</i>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Candida valida 6</i>
<i>Lactococci</i>	<i>Candida kefir</i>
<i>Lactococcus lactissub sp. Lactis</i>	<i>Candida holmii</i>
<i>Lactococcus lactissub sp. Cremoris</i>	<i>Other yeast</i>
<i>Streptococci</i>	<i>Pichia fermentans</i>
<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Zygo saccharomyces rouxii</i>
<i>Enterococci</i>	<i>Debaryomyces hansenni</i>
<i>Enterococcus durans</i>	<i>Bretannomyces anomalus</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Issachenkia occidentalis</i>
<i>Leuconostocs</i>	
<i>Leuconostocmes enteroides</i>	
<i>Leuconostocmes enteroidessub sp. cremoris</i>	
<i>Aceticacid bacteria</i>	
<i>Acetobacte raceti</i>	
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	
<i>Other bacteria</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Micrococcus sp.</i>	

Fonte: WESCHENFELDER, 2009.

Além da composição microbiana do kefir, componentes nutricionais também se fazem presentes, considerado um produto rico em vitaminas B1, B12, cálcio, aminoácidos essenciais e vitamina K (OTLES; CAGINDINI, 2003). Poucos são os estudos que relatam suas características físico-químicas, entretanto, estas estão relacionadas às técnicas de manipulação dos grãos de kefir e o tipo de leite utilizado, envolvendo também aspectos como o tempo, temperatura de incubação e maturação, as leveduras constituintes são também importantes para o desenvolvimento das características físico-químicas (WESCHENFELDER, 2009; FARNWORTH, 2005).

Na análise físico-química do kefir é possível observar uma umidade a 87%, pH variando entre 4,2 e 4,5, lactose entre 2,6 a 3,75% e álcoois entre 0,23 e 1,0%, apresentando também acidez em graus “Dornic” com valores próximos a 80 e ácido láctico em 0,7%; a análise físico-química também fornece valores de outros compostos, sendo estes as proteínas totais, sacarose, gordura, matérias albuminóides, acidez volátil, caseína, albumina, gás carbônico, minerais, diacetil e acetaldeído (WESCHENFELDER, 2009 *apud* SOUZA et al., 1984).

A caracterização físico-química do kefir permite avaliar as diferenças dos produtos finais obtidos e seus teores, estes podem ser similares quando utilizado diferentes produtos como substrato, isso também foi relatado por BORGES & COSTA (2015) em seu estudo em que avaliou acidez dos graus Dornic (D°); proteínas totais; sacarose; gordura; pH; lactose em kefir produzido a partir de leite desnatado UHT o qual apresentou 0.30% de gordura; 3.54% proteína; 5,47% lactose; 37.80 ° densidade; 70° de Acidez Dornic e leite integral pasteurizado apresentando 0.22% de gordura; 3.25% de proteínas; 5.11% de lactose; 34.90° densidade; 15° de Acidez Dornic. Apesar da empregabilidade da mesma metodologia para ambas as situações obtiveram diferenças de resultados.

O ácido láctico é um produto final da fermentação da lactose presente no kefir, atua sobre ele como conservante natural e inibe o crescimento de bactérias patogênicas e/ou deteriorantes. A avaliação do seu teor apresentando aumento é indicativa de constante fermentação e como consequência tem-se à queda dos níveis de lactose através da fermentação realizada por bactérias produtoras de ácido láctico através da atividade da β -galactosidase, podendo assim ser consumido por pessoas intolerantes a lactose (SAVAIANO et al., 1984; MARTINI et al., 199; HERTZLER e CLANCY, 2003; TERRA, 2007; CARNEIRO et al., 2012).

A utilização do kefir tem um valor fundamental na prevenção de doenças, e na restauração da microbiota normal do organismo. Este probiótico tem atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, sendo capazes de produzir bacteriocinas. Tal probiótico tem maior efeito bactericida em bactérias gram-positivas e maior efeito bacteriostático em gram-negativas (CARNEIRO, 2010 *apud* CZAMANSKI et al., 2004).

Esta propriedade antimicrobiana também é relatada através dos efeitos dos *Lactobacillus* do kefir frente a cepas de *E. coli*; *Listeria monocytogenes*; *Salmonella typhimurium*; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Candida spp*, entre outros (SANTOS et al., 2003; WESCHENFELDER, et al., 2008).

Escherichia coli é uma enterobactéria que colabora com a absorção de vitamina K e outras vitaminas no cólon do intestino grosso. É gram negativa, em forma de bastões, anaeróbia facultativa, oportunista, algumas cepas são móveis devido aos flagelos peritricosos e outras imóveis, podendo ou não possuir cápsula polissacarídica; são compostas por uma membrana celular fina de peptídeoglicanos. O lipopolissacarídeo estável ao calor (LPS) é o principal antígeno de sua parede, apresentando quatro antígenos: H, O, K e F. (ARYAL, 2016).

Dentre os diversos microrganismos classificados como de maior importância na saúde pública destaca-se a *Escherichia coli*, cujo habitat principal é o trato intestinal de animais de sangue quente (FRAZIER; WESTHOFF, 1993).

A espécie *E. coli* compreende 6 categorias patogênicas que causam infecção intestinal em humanos, estas são diferenciadas pela presença de fatores de virulência que as classificam em *E. coli* enteropatogênica

(EPEC), sendo a mais versátil entre as categorias diarreio gênicas, *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) ou *E. coli* produtora da toxina de Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* aderente difusa (DAEC) (SOUZA et al., 2016).

E. coli também pode ocasionar infecção no trato urinário (ITU) pela capacidade desse microrganismo de invadi-lo dependendo de aspectos da história da infecção, dos fatores subjacentes do hospedeiro, do uso de agentes antimicrobianos e instrumentação do trato urinário (SATO et al., 2005).

E. coli assim como todas as enterobactérias são resistentes a vários antibióticos, como clindamicina, ácido fusídico, estreptograminas, glicopeptídeos, linezolida, macrolídeos, penicilina G, podendo também apresentar resistência intrínseca a outros antibióticos (TRABULSI; ALTERTHUN, 2015). A ampicilina (AMP) é uma opção de antibiótico para o tratamento de infecções causadas por espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas sendo esta última indicada para *E. coli*; este antibiótico é derivado das penicilinas com espectro de ação que provoca a morte de microrganismos sensíveis (MELO et al., 2012).

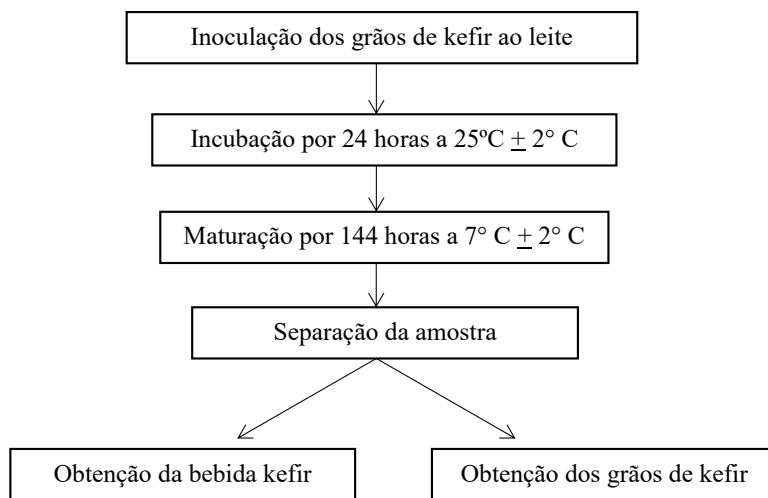
Dentro desse contexto o objetivo foi realizar a caracterização físico-química e avaliar a atividade antimicrobiana de kefir frente a cepas de *Escherichia coli* NEWP 0022.

METODOLOGIA

Para execução do trabalho foram utilizados dois kefir's provenientes de diferentes domicílios de Votuporanga, realizou-se então a separação dos grãos de kefir da bebida fermentada. Sendo posteriormente feitas determinações físico-químicas, de acidez Dornic; e determinação da concentração da lactose, e atividade antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* NEWP 0022.

Para obtenção do kefir e dos seus grãos foi utilizado a metodologia de WESCHENFELDER et al. (2008), feita através da inoculação dos grãos de kefir ao leite, por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, para a maturação foram aguardadas mais 144 horas a $7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, feito em seguida a separação da amostra em kefir e grãos de kefir (Figura 1).

Figura 1 - Fluxograma do processo de manipulação do kefir.



ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

Na análise físico-química foi realizado o teste de acidez titulável, feito para detecção de ácido láctico e com essa acidez expressa em graus Dornic durante um período de seis dias consecutivos. Uma

substância alcalina (NaOH 11N), foi adicionada a uma bureta de 50 mL. Em seguida foi adicionado a um Erlenmeyer 10 mL de leite, 50 uL de fenolftaleína, misturou-se esta solução, podendo assim iniciar a técnica gotejamento até que a solução adquiriu a cor rósea. Cada 0,1 mL da solução de NaOH 11N gasto no teste corresponde a 1°D ou 0,1g de ácido láctico/L (ALMEIDA, 2011).

Para realização do método de Lane-Eynon foi necessário anteriormente realizar a padronização do reagente Fehling, o qual foi utilizados para os cálculos de % teor de lactose.

Após padronização do reagente Fehling foi realizada a determinação de % de teor de lactose no leite já incubado com kefir dia a dia por seis dias, foram pesados 10 mL do leite em balão volumétrico de 250 mL, adicionou 5 mL da solução de ferrocianeto de potássio a 15% e 5 mL da solução de acetato de zinco a 30%. Agitou e completou o volume com água destilada. Deixou em repouso até sedimentar filtrando e transferiu para uma bureta de 50 mL. Pipetou para Erlenmeyer, 5mL da solução de Fehling A, 5 mL da solução de Fehling B e 40 mL de água destilada. A mistura foi aquecida até chegar ao ponto de ebulição e titulou gotejando a solução da amostra contida na bureta, sem agitação, até o líquido sobrenadante ficar levemente azulado. Manteve a ebulição e adicionou 1 gota da solução azul de metileno a 1% no líquido e continuou a titulação gota a gota até a descoloração do indicador. Em seguida foi necessário realizar o seguinte cálculo do teor % de glicídios redutores em lactose:

$$100.250. \left(\frac{T}{2}\right).1,39/V. m$$

Onde: T= título da solução de Fehling; V= volume da amostra gasto na titulação em mL; m= massa da amostra em g; 1,39= fator de correção da glicose para lactose (SILVA, 2014).

ANÁLISE ANTIMICROBIANA

Primeiramente foi realizado controle de qualidade através da execução da técnica de esgotamento utilizando kefir em ágar MacConkey para avaliar presença ou ausência de crescimento de *Escherichia coli* nos kefir A e kefir B, ambos foram semeados em placas separadamente e posteriormente incubadas à 36°C e realizada análise após período de 24 e 48 horas.

Em seguida foi realizada a técnica proposta por GROVE e RANDALL (1995), a técnica consiste na utilização de camadas duplas do ágar na placa, estas denominadas como base representando a camada inferior na placa e camada seed representando a camada superior na placa.

Para realização da técnica foram confeccionadas duas placas para cada respectivo kefir. Sobre cada placa de petri estéril foi adicionado 20 ml do ágar Mueller Hinton (AMH) para formação da camada base, após o resfriamento e endurecimento do ágar partiu-se para preparação da camada seed. Para realização da camada seed foram utilizados 20 ml do ágar Mueller Hinton (AMH) e 2 ml de caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI) com o inóculo de colônias de cepas padrão de *Escherichia coli* seguindo a escala 0,5 de Mc Farland. Para preparação do caldo com o inóculo foi adicionado em um tubo estéril 2 ml do caldo BHI e 1 ml em outro tubo estéril, foram adicionadas colônias de *Escherichia coli* NEWP 0022 cultivadas em laboratório no tubo contendo 2 ml do caldo, este foi agitado e comparado com a escala 1 de Mc Farland, posteriormente foi retirado 1 ml deste tubo e transferido para o segundo tubo que continha 1 ml de caldo para obtenção da escala 0,5 (GROVE; RANDALL, 1995; ALVES, 2008).

O caldo com o inóculo foi depositado juntamente aos 20 ml de ágar Mueller Hinton (AMH) sobre a camada base na placa e aguardou-se o resfriamento e endurecimento da mesma. Após a solidificação da camada seed, foram confeccionados poços com dispositivos esterilizados, cilíndricos e metálicos de diâmetro conhecido. Foram confeccionados 6 poços no ágar, cada um deles compondo uma diluição diferente do kefir. Para realização das diluições foi utilizado solução salina a 0.9% ao modo que o

primeiro poço utilizou uma diluição de 1:1 correspondendo apenas a 40 ul de kefir, e os posteriores poços compreendendo diluições de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6; em cada poço foi adicionado 40 ul das respectivas diluições. Sobre o ágar também foi confeccionado um controle positivo através da inserção de Ampicilina (AMP 10) e um controle negativo (solução salina) e em seguida as placas foram incubadas á 36°C por 24 horas (GROVE; RANDALL, 1995; ALVES, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na aplicação da metodologia de Dornic para avaliar quantidade de ácido láctico presente em g/L e convertido para °D, observou-se similaridade entre os resultados obtidos durante os 6 dias consecutivos entre o kefir A e o Kefir B. Apesar de serem oriundos de diferentes domicílios. Ambos apresentaram 16 °D no primeiro dia de análise e com aumento progressivo, finalizando o sexto dia de análise apresentando 72° D para o kefir A e 75° D para o kefir (Tabela 2).

Na metodologia de Lane-Eynon com a análise de padronização do reagente Fehling demonstrou 0,07 m/m, sendo este o valor utilizado para metodologia proposta com. Os resultados pós-análise de % teor de lactose demonstraram diminuição do mesmo após análise de 6 dias consecutivos, ambos kefir obtiveram teor inicial de 5,04%, ambos apresentaram diminuição progressiva e com valores similares finalizando a análise do sexto dia com teor de 3,71% e 3,30% de lactose nos kefir A e kefir B respectivamente (Tabela 3).

Tabela 2 - Resultados obtidos pós-análise de ácido láctico presente no leite ao decorrer dos dias de incubação com kefir expressos em g/L e D.

	Kefir A	Kefir B
Dia 01	1,6 g/L – 16 °D	1,6 g/L – 16°D
Dia 02	2,2 g/L – 22 °D	2,1 g/L – 21°D
Dia 03	2,2 g/L – 22 °D	2,2 g/L – 22°D
Dia 04	2,7 g/L – 27 °D	2,3 g/L – 23°D
Dia 05	2,8 g/L – 28 °D	3,2 g/L – 32°D
Dia 06	7,2 g/L – 72 °D	7,5 g/L – 75°D

Tabela 3 - Demonstração de resultados obtidos pós-análise de % teor de lactose presente no leite ao passar dos dias de incubação com kefir's.

	Kefir A	Kefir B
Dia 01	5,04 %	5,04 %
Dia 02	4,18 %	4,33 %
Dia 03	4,18 %	4,10 %
Dia 04	3,90 %	4,03 %
Dia 05	3,80 %	3,65 %
Dia 06	3,71 %	3,30%

Fonte: dados da pesquisa.

WESCHENFELDER et al. (2008) ao realizar análise físico-química em 4 populações distintas de kefir avaliou acidez (°D) com 2 concentrações de grãos/leite (1:10/1:5) classificados como A e B respectivamente. A análise foi realizada após (24h – 25°C) e maturação (144h – 7°C) obtendo resultados entre 141,95

°D e 251,09 °D para as 4 populações com concentrações de 1:10 e resultados entre 184,02 e 266,98 °D para as 4 populações com concentrações 1:5. Também foi avaliado % teor de lactose presente nas populações seguindo a mesma aplicação de concentração, as 4 populações realizadas com concentração de 1:10 apresentaram valores entre 1,04% e 1,50% enquanto quando realizadas em concentrações de 1:5 apresentaram resultados de 0,93% e 1,30%.

Em estudo realizado por SOUZA et al. (1984) ao realizar a caracterização físico-química envolvendo a análise de acidez em graus Dornic (°D) e lactose obteve valores aproximados a 80°D e lactose entre 2,6 a 3,75% (WESCHENFELDER, 2009 *apud* SOUZA et al., 1984).

Foi realizada a demonstração gráfica do ácido láctico (g/L) e lactose (%) presente em ambos kefir onde é possível observar a elevação do ácido láctico a medida em que a concentração da lactose diminui seus níveis em decorrência da fermentação ocorrida no período de 6 dias (Gráficos 1 e 2).

Gráfico 1 - Demonstração gráfica comparativa da variação das concentrações de ácido láctico (g/L) e lactose (%) de kefir A com o decorrer dos dias.

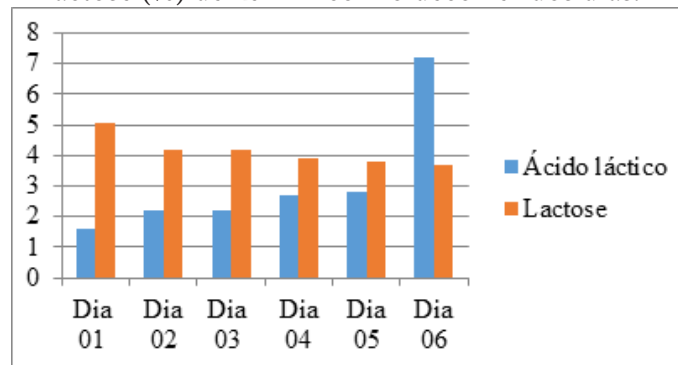
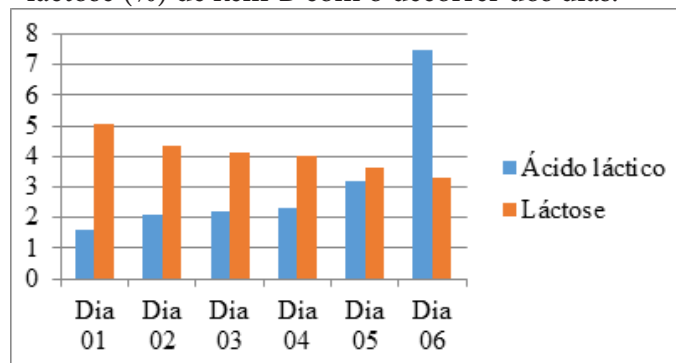


Gráfico 2 - Demonstração gráfica comparativa da variação das concentrações de ácido láctico (g/L) e lactose (%) de kefir B com o decorrer dos dias.



Fonte: dados da pesquisa.

Poucos estudos remetem a caracterização físico-química do kefir, entretanto ao que refere à elevação do ácido láctico após fermentação é deve-se da presença de aproximadamente 25% da lactose original no leite (FARNWORTH, 2005).

Segundo Rea et al., (1996) os diferentes microrganismos presentes nos grãos de kefir apresentam-se ativos em fases distintas da fermentação. Espécies de *Lactococcus* são descritos como primeiros a se

desenvolver resultando em aumento da acidez durante as primeiras horas de fermentação. A acidez mais alta propicia condições para o crescimento de *Lactobacillus*. Essa distinção de microrganismos predominantes em determinado período reflete os diferentes teores de acidez.

ANÁLISE ANTIMICROBIANA

O controle de qualidade realizado para avaliar a presença ou ausência de crescimento de *Escherichia coli* foi observado após as 24 e 48 horas de período de incubação tornando evidente a ausência de *Escherichia coli* em ambas placas semeadas com kefir.

Após 24 horas de incubação das placas preparadas com a técnica de difusão em poços foi observado o aparecimento de halo inibitório de 3 mm ao redor do poço contendo a diluição 1:1 da placa preparada com o kefir B enquanto os demais poços apresentaram ausência do aparecimento de halo de inibição (figura 5). Na placa preparada com o kefir A foi observado o aparecimento de halo inibitório de 1 mm ao redor do poço contendo a diluição de 1:1 e ausência de aparecimento de halo de inibição nos demais poços (figura 4). Em ambas as placas observou a ausência de modificação após tempo de 48 horas de incubação. O antibiótico ampicilina (AMP 10) utilizado como controle positivo houve aparecimento de halo de inibição de 8 mm em ambas as placas (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Difusão em poços com “kefir A” após 24 horas de incubação.

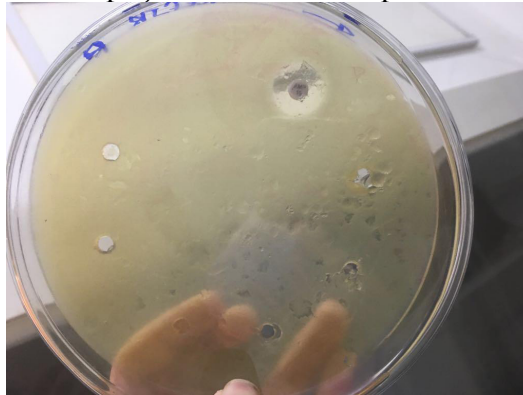
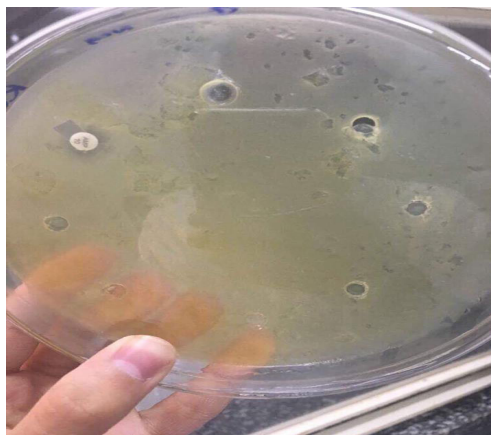


Figura 3 - Difusão em poços com “kefir B” após 24 horas de incubação.



Fonte: dados da pesquisa.

Em um estudo realizado por WESCHENFELDER et al. (2009) ao aplicar um teste de diluição envolvendo kefir tradicional para determinações da intensidade de ativação de inibição bacteriana/bacterostasia e da intensidade de atividade de inativação bacteriana/bacterostasia demonstraram que o kefir em concentração de 50% apresentaram total inibição e inativação frente ao inóculo *Escherichia coli* ATCC (11229) em concentrações $\leq 10^8$ UFC/ml.

CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível concluir que ambos os kefir demonstraram significativa diminuição de lactose e aumento de ácido láctico, esta alteração é devido à presença de bactérias ácido lácticas (BAL) no kefir, a qual converte lactose e outros açúcares em ácido láctico. Com avaliação da atividade antibacteriana pôde-se comprovar que cepas de *Escherichia coli* NEWP 0022 apresentam resistência à ambos kefir.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. A. G.; NOVAK, R. F.; GUIMARÃES, V. Leite Humano Ordenhado: Determinação da Acidez Titulável – Método Dornic. **Rede Brasileira de leite humano**, Rio de Janeiro, p.1-7. Nov. 2011. Disponível em: <https://rblh.fiocruz.br/sites/rblh.fiocruz.br/files/usuario/79/nt_29.11_determinacao_acidez_lho.pdf>. Acesso em: 30 de agosto de 2018.

ALVES, E. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000500052>. Acesso em: 02 de setembro de 2018.

ARYAL, S. Morphology of *E. coli*. **Microbe NOTES**. Jun. 2016. Disponível em: <<https://microbenotes.com/morphology-of-e-coli/>>. Acesso em: 22 de outubro de 2018.

BALLUS, C. A. et al. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 85-96. Jan/Jun. 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/228647010_ASPECTOS_CIENTIFICOS_E_TECNOLOGICOS_DO_EMPREGO_DE_CULTURAS_PROBIOTICAS_NA_ELABORACAO_DE_PRODUTOS_LACTEOS_FERMENTADOS>. Acesso em: 08 de nov. de 2018.

BOLZAN, R. C.; WESTPHALEN, F. Bromatologia. **Rede e-Tec Brasil**, Rio Grande do Sul, p. 46-47, 2013. Disponível em: <http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos/cafw/tecnico_agroindustria/bromatologia>. Acesso em: 22 de out. de 2018.

BORGES, P. P.; COSTA, E. R. Caracterização de kefir quanto à composição físico-químico e microbiológica. **IV Congresso Estadual de Iniciação Científica do IF Goiano**, 21 a 24 de setembro. 2015. Disponível em: <<https://ifgoiano.edu.br/ceic/anais/files/papers/20335.pdf>>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

CARNEIRO, C. S. et al. Leites fermentados: histórico, composição, características físico-químicas, tecnologia de processamento e defeitos. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 27, ed. 214, art. 1424, 2012. Disponível em: <<http://www.pubvet.com.br/uploads/c13748843820239654f9d6caafc4bd37.pdf>>. Acesso em: 11 de

nov. de 2018.

CARNEIRO, R. P. Desenvolvimento de uma cultura iniciadora para produção de kefir. **Arquivo da Faculdade de farmácia da UFMG**. Belo Horizonte, p. 1-144, 2010. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/MAFB-8EBKTH>>. Acesso em: 23 de mai. de 2018.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science e Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, p. 1-17. Abr. 2005. Disponível em: <<http://www2.ufrb.edu.br/kefirdoreconcavo/images/artigos/artigo06.pdf>>. Acesso em: 25 de mai. de 2018.

FULLER, R. Probiotics in human medicine. **Gut**, v. 32, n. 4, p. 439-442. Abr. 1991. Disponível em: <<https://gut.bmj.com/content/gutjnl/32/4/439.full.pdf>>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

FRAZIER, W. C.; WESTHOFF, D. C. **Microbiologia de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia. 1993. 681p. Disponível em <<http://148.206.53.84/tesiuami/Libros/L33.pdf>>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

GOLDIN, B. R.; GORBACH, S. L. Clinical Indications for probiotics: an overview. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 46, n.1, p. 96-100. Fev. 2008. Disponível em: <https://academic.oup.com/cid/article/46/Supplement_2/S96/278134>. Acesso em: 24 de mai. de 2008.

Grove, D. C.; Randall, W. A.; Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual. **Medical Encyclopedia, Inc**. New York, 1955. Disponível em: <<https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=coo.31924087318410;view=1up;seq=4>>. Acesso em: 20 de nov. de 2018.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of American Dietetic Association**, v. 103, n. 5, p. 582-587. Mai. 2003. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/10777259_Kefir_improves_lactose_digestion_and_tolerance_in_adults_with_lactose_maldigestion>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

MARTINI, M. C. et al. Strains and species of lactic acid bacteria in fermented milks (yogurts): effect on in vivo lactose digestion. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 54, n. 12, p. 1041-1046, 1991. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.841.5183&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 09 de nov. de 2018.

MELO, V. V.; DUARTE, I. P.; SOARES, A. Q. Guia de Antimicrobianos. 1. ed. Goiânia. **Guia (Coordenação de Farmácia) – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG)**, 2012. 58p. Disponível em: <https://farmacia.hc.ufg.br/up/734/o/Guia_de_Antimicrobianos_do_HC-UFG.pdf?1409055717>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

OTLES, S.; CAGINDI, O. kefir: a probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, p. 54-59, 2003. Disponível em: <<https://scialert.net/abstract/?doi=pjn.2003.54.59>>. Acesso em: 10 de nov. de 2018.

PINTADO, M. E. et al. Microbiological and rheological studies on portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996. Disponível em: <<https://repositorio>>.

ucp.pt/bitstream/10400.14/6102/1/Microbiological%20and%20rheological....pdf>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

PROTIC, M. et al. Mechanism of diarrhea in microscopic colitis. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 11, n. 35, p. 5535-5539. Set. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4320367/>>. Acesso em: 24 de mai. de 2018.

RAIZEL, R. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74. Jul/Dez. 2011. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/faenfi/article/view/8352/7257>>. Acesso em: 24 de mai. de 2018.

REA, M. C.; LENNARTSSON, T. Irish kefir-like grains: their structure, microbial composition and fermentation kinetics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 81, n. 1, p.83-94. Jul. 1996.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Instituto de Nutrición e Hiene de los Alimentos. **Revista Cubana de Aliment Nutr.** v. 16, n. 1, p. 63-68, 2002. Disponível em: <http://bvs.sld.cu/revistas/ali/vol16_1_02/ali10102.pdf>. Acesso em: 23 de mai. de 2018.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16. Jan/Mar. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002>. Acesso em: 25 de mai. de 2018.

SANTOS, A. et al. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus spp.* Isolated from kefir. **Systematic and Applied Microbiology**, p. 434-437. Abr. 2003. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/fda4/176fce20ceb7125d0953a979ae1981125659.pdf>>. Acesso em: 23 de mai. de 2018.

SATO, A.F. et al. Nitrito urinário e infecção do trato urinário por cocos Gram – positivos. **J. Bras. Patol. Med.** Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, p. 397-404. Dez. 2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbpml/v41n6/a05v41n6.pdf>>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

SAVAIANO, D. A. et al. Lactose malabsorption from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milk, and cultured milk in lactase-deficient individuals. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 40, n. 6, p. 1219-1223. Dez. 1984. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/16757332_Lactose_malabsorption_from_yogurt_pasteurized_yogurt_sweet_acidophilus_milk_and_cultured_milk_in_lactase-deficient_individuals>. Acesso em: 09 de nov. de 2018.

SILVA, M.V.V. et al. Determinação do teor de lactose em leite fluído pelo método Lane-Eynon. **Congresso Brasileiro de Química**, Natal, Rio Grande do Norte, 2014.

STEFE, C. A; ALVES, M. A. R; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos- artigo de revisão. **Saúde e Ambiente em revista**, Duque de Caxias, v. 3, n. 1, p. 16-33. Jan/Jun. 2008. Disponível em: <http://www.educadores.diaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/artigos_teses/Biologia/Artigos/alimentos.pdf>. Acesso em: 24 de mai. de 2018.

SOUZA, C. O. et al. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarreiogênica versátil. **Rev Pan-**

Amaz Saude, v. 7, n. 2, p.79-91, 2016. Disponível em: <<http://scielo.iec.gov.br/pdf/rpas/v7n2/2176-6223-rpas-7-02-00079.pdf>>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

SOUZA, F. S. et al. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Rev Paul Pediatr**, v. 28, n. 1, p. 86-97, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rpp/v28n1/v28n1a14>>. Acesso em: 23 de mai. de 2018.

SOUZA, G.; et al. Kefir e sua tecnologia – aspectos gerais. **Boletim ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 137-155, abr/jun 1984.

TERRA, F. M. **Teor de lactose em leites fermentados por grãos de kefir**. Brasília DF: UNB, 2007. 62p. Monografia (Especialização em Tecnologia de Alimentos) - Universidade de Brasília. Disponível em: <http://bdm.unb.br/bitstream/10483/185/1/2007_FlavioMarquesTerra.pdf>. Acesso em: 17 de set. de 2019.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015. 888p.

WENDLING, L. K.; WESCHENFELDER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados - uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.68, n. 395. p. 49-57. Nov/Dez. 2013. Disponível em: <<https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/50/56>>. Acesso em: 08 de nov. de 2018.

WESCHENFELDER, S. Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti- *Escherichia coli*. **Arquivo da Universidade federal do Rio Grande do Sul**. Porto alegre, p. 1-36. Fev. 2009. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/16409>>. Acesso em: 25 de mai. de 2018.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. **Arquivo do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, p. 37-51. Dez. 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/16409>>. Acesso em: 25 de mai. de 2018.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 63, n. 2, p. 473-480, 2011.

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; CILLIERS, A. et al. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiol.**, v.22, p.337-344, 2004.

WOUTERS, J. T. M. et al. Microbes from raw milk for fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 12, n. 91–109, 2002. Disponível em: <<https://eurekamag.com/research/003/845/003845901.php>>. Acesso em: 11 de nov. de 2018.

WSZOLEK, M.; et al. Properties of kefir made in Scotland and Poland using bovine, caprine and ovine milk with different starter cultures. **Lebensm. wiss. u. technol.**, v.34, p. 251-261, fev. 2001.