

SEBASTIÃO MOREIRA JUNIOR

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE KEFIR E EFEITO
ANTAGÔNICO DE SEUS ISOLADOS FRENTE A
PATÓGENOS E DETERIORADORES**

Dissertação apresentada ao Campus Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

**RIO POMBA
MINAS GERAIS-BRASIL
2018**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – IFET/RP

Bibliotecária: Ana Carolina Souza Dutra CRB 6 / 2977

M835a

Moreira Junior, Sebastião.

Avaliação microbiológica de kefir e efeito antagônico de seus isolados frente a patógenos e deterioradores. / Sebastião Moreira Junior. – Rio Pomba, 2018.

xi, 43f. : il.

Orientador: Prof^a. Aurélia Dornelas de Oliveira Martins.

Dissertação (Mestrado) - Mestrado Profissional *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia em Alimentos - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Kefir. 2. Leite Fermentado. 3. Microbiologia. I. Martins, Aurélia Dornelas de Oliveira. II. Título.

CDD: 637.3

SEBASTIÃO MOREIRA JUNIOR

**AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE KEFIR E
EFEITO ANTAGÔNICO DE SEUS ISOLADOS
FRENTE A PATÓGENOS E DETERIORADORES**

Dissertação apresentada ao *Campus* Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência e Tecnologia de Alimentos para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA:

Prof^a. Dr^a. Wellingta Cristina Almeida do
Nascimento Benevenuto
Coorientadora

Prof. Dr. Maurílio Lopes Martins
Coorientador

Prof. Dr. Roselir Ribeiro da Silva

Dr. Welliton Fagner da Cruz

Prof^a. Dr^a. Aurélia Dornelas de Oliveira Martins
Orientadora

Dedico este trabalho aos meus pais, Sebastião e Roseli, pelo amor incondicional e ao meu querido irmão Júlio Cesar (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar força todos os dias para enfrentar os obstáculos da vida e por colocar no meu caminho amigos especiais e pessoas abençoadas para me ajudar.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, Campus Rio Pomba, pela oportunidade e condição dada à realização das pesquisas.

À minha orientadora, Aurélia Dornelas de Oliveira Martins, por acreditar em mim em todo percurso acadêmico desde a minha primeira iniciação até a minha dissertação, pelos ensinamentos, conselhos, carinho e confiança.

Aos meus coorientadores, Maurílio Lopes Martins e Wellington Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto e aos componentes da banca Roselir Ribeiro da Silva e Wellington Fagner da Cruz, pela ajuda, ensinamentos e profissionalismo.

Aos meus queridos pais, Roseli Ferreira Moreira e Sebastião Moreira Neto, pelas orações, pelo amor, apoio e dedicação, tornando possível a concretização desse sonho. E ao meu irmão que não está mais presente aqui, por ter me ensinado a valorizar as coisas simples da vida. A todos os meus familiares, pelas orações e carinho a mim dispensados.

À minha namorada, Ana Cláudia Pereira, por todo apoio, amor, carinho e por dividir as dificuldades comigo. Obrigado por estar ao meu lado!

Aos meus grandes companheiros e amigos, Ítalo Rodrigues e Maria Paula Jensen, que me auxiliaram ao longo da pesquisa e agradeço ainda pelos conselhos, amizade, e por serem presentes de Deus em minha vida. A Lidiane Bittencourt, Thamiris Ventura, Scarlet Ohana Gandra e Jéssica Reis, por todo apoio a mim dispensado. Agradeço imensamente a todos vocês por todo auxílio, carinho, companheirismo e amizade. Desejo muito sucesso a todos!

Aos professores Cleuber Raimundo, Fabiola Oliveira, Elisângela Domingo e Gisele Inocêncio com os quais tive maior contato, por serem meus grandes incentivadores.

Agradeço a todos os docentes do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos pela ajuda, bondade, compreensão, ensinamentos e conselhos.

Aos doadores dos grãos de Kefir, pelo apoio à pesquisa.

À equipe de trabalho do laboratório, em especial Rosélio Martins e Thatiane Lopes, por toda a ajuda, orientações e palavras de apoio e risadas. O laboratório não seria o mesmo sem o trabalho de vocês!

Aos meus grandes amigos do mestrado, pela amizade, companheirismo, ensinamentos e conselhos (em especial ao Fábio, Jéssica, Rose, Patrícia e Priscila).

Ao grupo OS MAIS, aos amigos da complementação em alimentos e a todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando como Luan Pereira, Vanessa Barros, Jonathas Moreira, Nataly Almeida, Mariane Laureano, Bruna de Jesus, Nathan Soares, Gabriela Chagas, Mayra Angélica, Mariana Barbosa, Paloma Soares, Nathalia Rocha, Letícia Costa, Patrícia Carvalho, Paloma Moreira, Mateus Lopes, Jean Victor, Israel Felipe e a todos os alunos do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos. Obrigado meus amigos por todo carinho e companheirismo e por saber que sempre posso contar com vocês!

Aos meus amigos de república, pela paciência e convivência ao longo de toda trajetória.

Aos funcionários da Amazing Foods Indústria de Alimentos Ltda, pela flexibilidade e apoio para a concretização da minha pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização do meu trabalho, meu muito obrigado!

*“Work joyfully and peacefully,
knowing that right thoughts and
right efforts will inevitably bring
about right results.”*

James Allen

Resumo

MOREIRA JÚNIOR, Sebastião, Mestrado Profissional, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, outubro de 2018. **Avaliação microbiológica de kefir e efeito antagônico de seus isolados frente a patógenos e deterioradores.** Orientadora: Aurélia Dornelas de Oliveira Martins. Coorientadores: Maurílio Lopes Martins e Wellington Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto.

Kefir é um leite fermentado, ácido, levemente alcoólico, produzido de forma artesanal a partir de grãos que apresenta uma população microbiana simbiótica considerada estável, imersos em uma matriz constituída de polissacarídeos e proteínas. Alguns microrganismos presentes nos grãos de kefir formam uma barreira no intestino impedindo a multiplicação de patógenos, devido à produção de substâncias antimicrobianas. O presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica de kefir e verificar o efeito antagônico de seus isolados frente a microrganismos patogênicos e deterioradores. Foram coletadas cinco amostras de grãos de kefir de diferentes cidades da zona da mata mineira. As amostras foram avaliadas quanto à presença de coliformes totais, termotolerantes, *E.coli*, salmonela e estafilococos coagulase positiva, além da contagem de lactobacilos e cocos lácticos Gram-positivos. Foram realizadas análises físico-químicas de acidez, pH e cor. Foi avaliada a atividade antagônica dos isolados frente a microrganismos patogênicos e deterioradores pela técnica de *spot on the lawn*. Para coliformes totais, todas as amostras apresentaram contagens iguais ou superiores a 1100 NMP/g e em relação à contagem de coliformes termotolerantes, as amostras de Cataguases e Coimbra apresentaram 460 e 210 NMP/g, respectivamente, e as demais amostras contagens superiores a 1100 NMP/g, sendo todas superiores ao estabelecido pela legislação. Para *E.coli* e estafilococos coagulase positiva, as amostras apresentaram contagens <3 NMP/g e < 1,0 x 10¹UFC/g, respectivamente. Todas as amostras apresentaram ausência de salmonela. As contagens de fungos filamentosos e leveduras variaram de 4,21 a 5,39 ciclos log UFC/g e a contagem de lactobacilos e cocos lácticos Gram-positivos variaram de 7,87 a 9,09 log UFC/g, estando em conformidade com a legislação vigente para fungos filamentosos e levedura e bactérias lácticas. Avaliando o efeito antagônico dos 75 isolados do meio MRS, 57 apresentaram efeito antimicrobiano sobre pelo menos um patógeno ou deteriorador avaliado. Dos 75 isolados cocos lácticos Gram-positivos, somente 16 apresentaram efeito antagônico sobre pelo menos um patógeno ou deteriorador avaliado e das 75 leveduras, nenhuma apresentou efeito antagônico sobre os microrganismos. Comparando as características macroscópicas das amostras, os grãos apresentaram aparência similar a uma couve-flor e seus diâmetros variaram de 5,02 a 13,92 mm. Em relação às análises físico-químicas, as amostras apresentaram resultados dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, apresentando uma % de ácido láctico variando de 0,85 a 1,16 e pH de 3,80 a 4,76. A coloração das amostras apresentou diferença significativa a 5% de probabilidade apenas para saturação e tonalidade. Conclui-se que os isolados do kefir apresentaram efeito antagônico em diferentes microrganismos patogênicos, sendo que os lactobacilos demonstraram maior efeito antimicrobiano que os cocos lácticos Gram-positivos.

Palavras-chave: Antagonismo, Leites Fermentados e Legislação.

Abstract

MOREIRA JÚNIOR, Sebastião, Mestrado Profissional, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, outubro de 2018. **Microbiological evaluation of kefir and antagonistic effect of its isolated in front of pathogens and deteriorators** Orientadora: Aurélia Dornelas de Oliveira Martins. Coorientadores: Maurílio Lopes Martins e Wellingtona Cristina Almeida do Nascimento Benevenuto.

Kefir is a fermented, acidic, mildly alcoholic, artisanally produced grain that has a symbiotic microbial population considered stable, immersed in a matrix consisting of polysaccharides and proteins. Some microorganisms present in the kefir grains form a barrier in the intestine preventing the multiplication of pathogens due to the production of antimicrobial substances. The present study aimed to evaluate the microbiological quality of kefir and to verify the antagonistic effect of its isolates against pathogenic and deteriorating microorganisms. Five samples of kefir grains from different cities of the forest area were collected. Samples were evaluated for the presence of total coliforms, thermotolerans, E.coli, salmonella and coagulase positive staphylococci, as well as the counts of lactobacilli and Gram-positive lactic cocci. Physico-chemical analyzes of acidity, pH and color were performed. The antagonistic activity of the isolates against pathogenic and deteriorating microorganisms was evaluated by spot on the lawn technique. For total coliforms, all samples presented counts equal to or greater than 1100 NMP / g and in relation to the count of thermotolerant coliforms, samples from Cataguases and Coimbra presented 460 and 210 NMP / g respectively and the other samples counts higher than 1100 NMP / g , all being greater than that established by law. For E. coli and coagulase positive staphylococci, the samples had counts <3 NMP / g and <1.0 x 10¹ UFC / g, respectively. All samples showed no salmonella. The counts of filamentous fungi and yeasts varied from 4.21 to 5.39 log cycles CFU / g and lactobacillus counts and Gram-positive lactic cocci ranged from 7.87 to 9.09 log CFU / g, being in compliance with the legislation effective for filamentous fungi and yeast and lactic bacteria. Evaluating the antagonistic effect, of the 75 isolates of the MRS medium, 57 showed an antimicrobial effect on at least one pathogen or deteriorator evaluated. Of the 75 isolated Gram-positive lactic cocci, only 16 had an antagonistic effect on at least one pathogen or deteriorator evaluated and 75 yeasts, none of them had an antagonistic effect on the microorganisms. Comparing the macroscopic characteristics of the samples, the grains presented cauliflower-like appearance and their diameters ranged from 5.02 to 13.92 mm. In relation to the physical and chemical analyzes, the samples presented results within the standards established by the legislation, presenting a% lactic acid ranging from 0.85 to 1.16 and pH from 3.80 to 4.76. The color of the samples presented a continuous difference at the 5% probability level only for saturation and hue. It was concluded that kefir isolates have an antagonistic effect on different pathogenic microorganisms, and that lactobacilli presented a higher antimicrobial effect than Gram-positive lactic cocci.

Keywords: Antagonism, Fermented Milks and Legislation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Kefir: Definição, origem e cultivo.....	4
3.2. Propriedades benéficas do kefir.....	6
3.3. Efeito antimicrobiano do kefir.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1. Aquisição das amostras.....	9
4.2. Análises microbiológicas.....	9
4.2.1. Determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes e identificação de <i>Escherichia coli</i>	10
4.2.2. Determinação de <i>Salmonella</i> sp.	10
4.2.3. Determinação da contagem de estafilococos coagulase positiva	11
4.2.4. Determinação de Fungos Filamentosos e leveduras	11
4.2.5. Determinação da viabilidade de bactérias láticas	11
4.2.6. Isolamento de bactérias láticas e leveduras do grão de kefir	11
4.2.7. Obtenção da coleção de cultura de bactérias láticas e leveduras	12
4.3. Avaliação do efeito antagonista de isolados de kefir sobre microrganismos patogênicos e deterioradores	12
4.4. Avaliação das características macroscópicas dos grãos de kefir	13
4.5. Análises físico-químicas	13
4.6- Delineamento Experimental.....	14
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5.1. Caracterização microbiológica dos grãos de kefir	15
5.3. Avaliação do efeito antagonístico de isolados de kefir frente a microrganismos patogênicos e deterioradores	18
5.4. Avaliação das características macroscópicas dos grãos de kefir	21
5.5. Qualidade físico-química de kefir.....	22
6. CONCLUSÃO.....	26
7. REFERÊNCIAS.....	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos patogênicos e deterioradores para avaliação do efeito antagônico dos isolados dos grãos de kefir	12
Tabela 2 - Resultados para análises de NMP coliformes totais e termotolerantes....	15
Tabela 3 - Contagem para análise de bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras isoladas dos grãos de kefir.	16
Tabela 4 -Acidez e pH das amostras de kefir de diferentes cidades da zona da mata mineira.	23
Tabela 5 - Resultados da análise de cor de kefir de diferentes regiões da zona da mata mineira.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito antagônico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar M17 frente aos microrganismos patogênicos gram-positivo.....	19
Figura 2 - Efeito antagônico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar M17 frente aos microrganismos patogênicos gram-negativo.	19
Figura 3 - Efeito antagônico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar MRS frente aos microrganismos patogênicos gram-positivo.	20
Figura 4 - Efeito antagônico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar MRS frente aos microrganismos patogênicos gram-negativo.	20
Figura 5 - Características macroscópicas dos grãos de kefir.....	21

1. INTRODUÇÃO

A população brasileira está se preocupando cada vez mais com a alimentação, buscando alimentos práticos e que tenham características funcionais, como por exemplo, os leites fermentados.

Os leites fermentados são produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidos por coagulação e diminuição do pH do leite, ou leite reconstituído, adicionados ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, os quais devem estar viáveis, ativos e abundantes no produto durante o prazo de validade (BRASIL, 2007). De acordo com a legislação brasileira, os cultivos ou microrganismos empregados na fermentação definem a denominação do produto que pode ser iogurte, leite fermentado, leite acidófilo, kefir, kumys e coalhada (BRASIL, 2007).

No Brasil, o kefir é utilizado devido aos seus benefícios conferidos à saúde humana, é boa fonte de fósforo e seus grãos apresentam em sua estrutura aminoácidos essenciais, além possuírem vitaminas B1, B2, B5, C, A, K e carotenos, sendo que sua composição vitamínica é influenciada pelo tipo de leite e também pela microbiota presente nos grãos (ARSLAN, 2015). O perfil aminoacídico do kefir é alterado ao longo do processo de fermentação do substrato, com maiores níveis de treonina, lisina, serina e alanina quando comparado ao leite (ARSLAN, 2015).

A coloração de seus grãos varia de acordo com o meio de cultivo. Quando cultivados no leite, os grãos apresentam tonalidade amarela, coloração parda se cultivados no açúcar mascavo e ainda coloração púrpura quando cultivados no suco de uva (CASSANEGO et al., 2015).

Além disso, alguns microrganismos presentes nos grãos de kefir formam uma barreira no intestino impedindo a multiplicação de patógenos, devido à produção de bacteriocinas, que são substâncias com propriedades antimicrobianas, que podem inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas (CAETANO E MONTANHINI, 2014; DIAS et al., 2012c).

É praticamente impossível a formação espontânea dos grãos, mesmo isolando-se todos os componentes da sua microbiota natural. Novos grãos somente são obtidos com a repartição dos grãos pré-existentes formados pela multiplicação dos microrganismos que neles vivem, portanto, a qualidade do leite utilizado para sua manutenção é de extrema importância, pois um substrato que não apresenta

condições adequadas pode acarretar a matriz dos grãos uma microbiota contaminada podendo acarretar riscos a saúde do consumidor.

Diante do exposto, o presente estudo tem como objetivo geral avaliar a qualidade microbiológica de kefir e verificar o efeito antagonista de seus isolados frente a microrganismos patogênicos e deterioradores.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica e características físico-químicas de kefir e verificar o efeito antagônico de seus isolados frente a microrganismos patogênicos e deterioradores.

2.2. Objetivos específicos

- Verificar a qualidade microbiológica e características físico-químicas de amostras de kefir;
- Avaliar a viabilidade e isolar cocos lácticos Gram-positivos, lactobacilos e leveduras presentes no kefir;
- Avaliar a influência das fontes de origem das amostras nas características dos produtos.
- Verificar o antagonismo dos isolados frente a microrganismos patogênicos e deterioradores.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Kefir: Definição, origem e cultivo

A legislação brasileira define kefir como um leite fermentado resultante da fermentação de leite pasteurizado ou esterilizado realizado com cultivos ácido lácticos elaborados com grãos de kefir, *Lactobacillus kefir*, espécies dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter*, com produção de ácido láctico, etanol e dióxido de carbono. Os grãos de kefir 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* (BRASIL, 2007).

Kefir é um leite fermentado, ácido, levemente alcoólico, formado pela ação de uma associação de bactérias e leveduras, as quais são encapsuladas em uma matriz polissacarídica chamada “kefiran”, formando os grãos de kefir. Apresenta em sua composição água, lipídeos, proteínas, carboidratos e minerais, seus grãos possuem forma irregular, coloração amarelada e esbranquiçada, aparência semelhante à couve-flor, com diâmetro que varia de 0,3 a 3,5 cm (MACHADO et al., 2014 e YOVOUDI et al., 2013). É um mix complexo de bactérias e leveduras que se encontram em uma associação simbiótica, produzindo álcool ou ácido durante a fermentação (BAÚ et al., 2014).

Segundo Caetano e Montanhini (2014), o kefir é um produto caseiro, fermentado em temperatura ambiente, de difícil controle da temperatura, dificultando assim a padronização do produto. O produto obtido em temperaturas elevadas será mais ácido do que o obtido em temperaturas mais baixas. O pH baixo representa um fator intrínseco inibitório para muitos microrganismos patogênicos. No entanto, produtos com um alto valor de acidez tendem a não atrair o paladar dos consumidores. Sua composição microbiana varia conforme a região de origem, o tempo de utilização, o substrato utilizado para proliferação dos grãos e as técnicas usadas em sua manipulação (MAGALHAES et al., 2011).

Segundo Miguel et al. (2010), não se sabe ao certo a origem do kefir, podendo ter emergido de diferentes regiões, resultando em populações microbianas específicas e diferenciadas, que produzem bebidas com atributos microbiológicos e

sensoriais discrepantes. Porém, Santos et al. (2012) relatam que o kefir é um produto originário da Rússia, mais especificamente das montanhas do Cáucaso.

A presença de uma microbiota diversificada torna-se a principal característica do kefir, unida pela matriz de polissacarídeos, proteínas e gorduras. As leveduras proporcionam características singulares ao produto tanto pelo aroma como pela síntese de vitaminas do complexo B e ainda pela produção de etanol e CO₂, mesmo após refrigeração (COSTA e ROSA, 2016).

O kefir não é comercializado no Brasil, sua produção é artesanal, em regiões específicas do país, para consumo próprio das famílias. Uma grande preocupação com o kefir é a sua origem de obtenção e a forma de manejo, não havendo um padrão de qualidade para esse produto (JANUÁRIO et al., 2016).

Dois tipos de kefir são mais popularmente utilizados, o que são cultivados em água com sacarose como substrato e os que são cultivados no leite. Os grãos que utilizam o leite como substrato são compostos por um complexo heteropolissacarídeo, denominado kefirano, enquanto aqueles cultivados em água com açúcar mascavo são compostos por um complexo diferente, denominado dextrano (HSIEH et al., 2012). Como resultado do cultivo do kefir, tem-se um aumento da biomassa em uma faixa de 5% a 7% por dia. O aumento dos grãos é proveniente do crescimento dos microrganismos por meio da biossíntese dos componentes, sendo sua estrutura considerada um biofilme por apresentar diversificados microrganismos (MACHADO et al., 2014).

Em um estudo realizado por Zanirati (2012), foram identificadas as características das bactérias presentes no kefirano, por reação de cadeia da polimerase (PCR-ARDRA) de grãos de kefir de diferentes regiões do país. Tendo-se como resultados os seguintes microrganismos: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus diolivorans*, *Lactobacillus perolens*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus satsumensis* e *Lactobacillus parafarraginis*. Além disso, o DNA total extraído dos grãos de kefir foram submetidos à reação de PCR do gene 16S rRNA e foram identificadas as seguintes espécies: *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus satsumensis*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus mali*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus nagelii*, *Lactobacillus casei*, *Oenococcus kitaharae*, *Oenococcus oeni*, *Enterobacter ludwigii* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo também identificados dois microrganismos não cultiváveis.

3.2. Propriedades benéficas do Kefir

O kefir é rico em ácido láctico, ácido acético, ácido glicólico, álcool etílico, vitamina B12 e polissacarídeos, que contribuem para suas características sensoriais (PIETRA e PALEZI, 2015). É um leite fermentado que pode promover diversos benefícios à saúde, como reparação da mucosa intestinal, redução dos sintomas de intolerância à lactose, estimulação do sistema imunológico, redução do colesterol e de propriedades tumorais e na dieta apresenta efeitos antibacterianos (MENESTRINA, GRISALES e CASTELL, 2016).

Em razão de suas propriedades funcionais, o kefir é um alimento que deve ser indicado para todos os indivíduos. Fiorda (2016) relatou que o consumo da bebida kefir é limitado para os consumidores intolerantes à lactose, sendo substratos de origem não láctea, um modo alternativo para a ingestão desse produto.

São escassos os trabalhos que estudaram propriedades funcionais do kefir em seres humanos. Sabe-se que o mesmo pode equilibrar a microbiota intestinal nos indivíduos que os ingerem, já que essa é uma bebida funcional probiótica. Tendo em vista os benefícios que o kefir pode proporcionar à saúde e que este é cultivado e utilizado em ambiente doméstico, torna-se uma grande opção a busca e desenvolvimento de novas tecnologias que possam viabilizar a comercialização desse produto no mercado (SANTOS e BASSO, 2016).

Likotrazi et al. (2015) demonstraram que o kefir tem potencial como probiótico, uma vez que as bactérias lácticas presentes sejam resistentes à bÍlis, além de possuir atividade antagonística frente a microrganismos patogênicos. Segundo os autores, seus microrganismos são menos resistentes aos ácidos do que o ideal para um produto probiótico, sendo que essa resistência pode ser aumentada por meio da utilização de tecnologia de encapsulamento ou formulação cuidadosa do veículo alimentar. Os microrganismos presentes no kefir crescem bem aliados a uma gama de prebióticos, o que facilita o desenvolvimento de combinações de simbióticos.

Além disso, processo fermentativo gera uma série de compostos que conferem sabor e aroma característicos ao kefir, além de substâncias bioativas, responsáveis por propriedades nutraceuticas. A utilização de microrganismos com propriedades antimicrobianas como conservantes naturais é uma alternativa que tem como vantagem a inibição do desenvolvimento de bactérias deteriorantes e patogênicas sem o uso de substâncias químicas (DIAS et al., 2016a).

Dados de uma simulação *in vivo* demonstraram que as leveduras presentes no kefir de leite integral são mais resistentes às condições prevalentes no trato gastrointestinal do que as bactérias do ácido láctico. Quanto à atividade anticarcinogênica do kefir, identificou-se que o tratamento com o kefir foi capaz de reduzir em 36,7 % a incidência dos focos de cripta aberrante no cólon dos animais tratados em comparação ao controle. Ainda, o kefir elevou a atividade da enzima antioxidante catalase no cólon e a concentração dos ácidos graxos de cadeia curta nas fezes do ceco, além de abaixar a razão lactulose/manitol, ao final da fase de pós-indução. Com isso, o estudo mostrou que a atividade anticarcinogênica do kefir de leite integral se deve à redução da permeabilidade intestinal, ao aumento da atividade antioxidante, e ao aumento da produção dos ácidos graxos de cadeia curta (REIS, 2015).

Diniz et al (2003) avaliaram a atividade antiinflamatória *in vivo* do kefir sobre modelo de indução de tecido granulomatoso e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados obtidos mostraram que o produto inibiu a formação do tecido granulomatoso, bem como o número de contorções abdominais causadas por ácido acético, quando comparado ao grupo controle. Dessa forma, pode-se sugerir uma possível ação antiinflamatória.

Romanin et al. (2010) avaliaram a atividade antinflamatória de 21 leveduras, isoladas do kefir e constataram que todos isolados apresentaram um valor de 100 % de eficiência para a inibição da inflamação no epitélio intestinal, dando ênfase em se estudar mais sobre as leveduras que fazem parte da microbiota do kefir.

Em uma avaliação do uso de kefir em dieta hospitalar Martins et al. (2012), concluíram que este produto tem um grande potencial para ser introduzido na dieta dos pacientes internados, uma vez que o incremento do kefir na dieta proporcionou inúmeros benefícios aos pacientes como estimulação do sistema imune, controle glicêmico, hipercolesterolêmico entre outros.

3.3. Efeito antimicrobiano do Kefir

O kefir, por meio dos microrganismos de sua estrutura e das substâncias bioativas produzidas com sua fermentação, torna-se uma alternativa viável na busca de substitutos para os antimicrobianos convencionais (DIAS et al., 2012c).

O kefir pode ser utilizado no tratamento pós-operatório de pacientes com doenças gastrintestinais. Estudos observaram que crianças com infecção intestinal grave ao ingerirem kefir apresentaram rápida inibição de *Salmonella* sp e *Shigella* sp., no intervalo de sete a onze dias da doença e a microbiota voltou ao normal. O grupo de crianças que não recebeu a bebida demorou um período maior para voltar a seu estado de normalidade (MURASHOVA et al., 1997).

Dias et al. (2012c) avaliaram a sobrevivência de bactérias patogênicas veiculadas pelo leite durante a fermentação do kefir produzido artesanalmente e verificaram que após 24 horas de fermentação não houve crescimento de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*.

Estudos realizados por Weschenfelder et al. (2009) demonstraram que tanto o kefir como o soro do produto, na concentração testada (50%), apresentaram efeito antimicrobiano e inativação de um inóculo de 10^8 UFC/mL de *Escherichia coli*.

Auad (2014) isolou cepas de kefir e verificou os isolados quanto à capacidade inibitória frente às cepas de *Listeria monocytogenes*, utilizando-se teste de placas de micro titulação. Foi verificada a inibição do crescimento de *Listeria monocytogenes* por até 30 horas de incubação e o autor concluiu que as cepas isoladas de kefir são produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes*.

Dias et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana de 60 microrganismos isolados de grãos de kefir por meio do teste do antagonismo e do teste de inibição com sobrenadantes contra *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*. O pH dos sobrenadantes foi verificado antes de testar a atividade antimicrobiana e o teste foi repetido após o tratamento com hidróxido de sódio (substância neutralizante) a fim de excluir a ação dos ácidos orgânicos. Alguns isolados apresentou atividade antimicrobiana, demonstrando que a acidificação não é o único fator envolvido na inibição dos patógenos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Desenvolvimento de Novos Produtos, Microbiologia de Alimentos e Análise de Alimentos do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais (IF Sudeste MG) *Campus* Rio Pomba. O experimento foi conduzido com três repetições sendo as análises realizadas em duplicata.

4.1. Aquisição das amostras

As cinco amostras de grãos de kefir de diferentes cidades de Minas Gerais (Rio Pomba, Cataguases, Coimbra, Piraúba e Rosário da Limeira) foram obtidas por doação. Na coleta, as amostras foram armazenadas em recipientes esterilizados e mantidas sob refrigeração (4°C - 8°C) no laboratório de Desenvolvimento Novos Produtos do Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos do IF Sudeste MG *Campus* Rio Pomba por 24 horas.

Posteriormente, 5% dos grãos de kefir foram adicionados em leite UHT integral e o produto armazenado a temperatura ambiente por 18 a 24 horas. Esse processo de ativação foi realizado por três vezes consecutivas. Após a fermentação, os grãos foram separados do leite utilizando-se uma peneira previamente higienizada com água clorada a 200 ppm e lavados com água filtrada, sendo o leite obtido descartado. Na terceira ativação, tanto o leite fermentado quanto os grãos foram avaliados quanto às características microbiológicas, físicas e químicas, além da atividade antagônica dos isolados dos grãos frente a microrganismos patogênicos e deteriorantes.

4.2. Análises microbiológicas

Aproximadamente 25 gramas do leite fermentado de cada amostra foi pesado e acrescido de 225 ml de solução salina peptonada a 0,1%, logo após homogeneizado em Stomacher (Marconi MA 440/CF) para a realização das análises (SILVA et al., 2010).

4.2.1. Determinação do Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes e identificação de *Escherichia coli*

Foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} e destes inoculados 1 mL em uma série de três tubos contendo 10 mL de Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST). Os tubos foram incubados em estufas a 35 °C por 24 horas, e aqueles os tubos com produção de gás, foram considerados positivos. Destes, alíquotas foram transferidas com alça de platina para os tubos contendo Caldo Verde Brilhante Bile 2% (VB) (Himedia) e Caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia). Os tubos com os caldos VB e EC foram incubados por 48 ± 2 horas a $35 \pm 0,5$ °C e a $45 \pm 0,2$ °C em banho-maria, respectivamente, sendo os tubos com crescimento por meio de turvação do meio e produção de gás foram considerados positivos. Após esse procedimento, os resultados foram determinados por meio da tabela de número mais provável (NMP). Uma alça de caldo EC com resultado positivo foi estriada em placa contendo ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), seguido de incubação a 35 °C por 24 horas. Após o crescimento, cinco colônias típicas ou atípicas das placas com ágar EMB foram selecionadas e isoladas em ágar Padrão para Contagem (PCA) e, a partir das mesmas foi realizado o teste IMViC (Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato), sendo confirmadas como *E. coli* dependendo do resultado obtido (KORNACKI; JOHNSON, 2001).

4.2.2. Determinação de *Salmonella* sp.

Uma porção de 25 gramas das amostras foi homogeneizada e transferida para um frasco estéril, onde foi adicionado 225 ml de caldo lactosado, sendo a mistura homogeneizada em Stomacher (Marconi MA 440/CF). Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso durante 1 hora em temperatura ambiente para a verificação do pH (ideal $6,8 \pm 0,2$) e, conseqüente, ajuste do mesmo com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 N. A incubação foi feita a 35 ± 2 °C por 24 horas. Logo após esse período, foram transferidas alíquotas de 0,1 ml para tubos contendo 10 ml de caldo Rappaport Vassilidis e 1 ml para tubos contendo 10 ml de caldo Tetracionato. Os tubos foram incubados a 42 ± 2 °C por 24 horas e 35 ± 2 °C por 24 horas, respectivamente. Os tubos de enriquecimento seletivo foram agitados em vortex e uma alçada de cada foi estriada em placas de ágar Hektoen (HE), ágar Bismuto Sulfito (BS) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), as quais foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas para a posterior observação de colônias (ANDREWS et al., 2001).

4.2.3. Determinação da contagem de estafilococos coagulase positiva

Amostras de kefir foram diluídas e alíquotas da amostra diluída foram adicionadas à superfície do ágar Baird Parker (BP) (Himedia). Os inóculos das diluições 10^{-1} tiveram o volume distribuído em três placas, 0,3 mL, 0,3 mL e 0,4 mL, respectivamente, e das demais diluições, 0,1 mL foram inoculados sobre o meio de cultura e espalhados até que houvesse total absorção do líquido. Em seguida, as placas passaram por incubação a 37 °C por 48 horas.

As colônias típicas de *Staphylococcus* sp. em ágar BP são negras rodeadas por um halo opaco e um halo translúcido, provenientes da precipitação da lecitina e da proteólise. Para confirmação por meio dos testes bioquímicos de coagulase, foram selecionadas cinco colônias típicas e/ou atípicas (LANCETT; BANNETT, 2001).

4.2.4. Determinação de fungos filamentosos e leveduras

Para avaliar o crescimento de fungos filamentosos e leveduras foi realizado diluições (10^{-1} a 10^{-5}) das amostras e plaqueamento em meio Agar Dextrose Batata (BDA) acidificado com ácido tartárico a 10%, conforme metodologia proposta pela Instrução Normativa N.º 62 (BRASIL, 2017).

4.2.5. Determinação da viabilidade de bactérias lácticas

Para a determinação da viabilidade de bactérias lácticas, inicialmente foi realizado diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}), e em seguida plaqueamento em ágar DeMan-Rogosa-Sharpe (MRS – Himedia, Mumbai, Índia), para quantificação dos lactobacilos e ágar M17 (Difco, Sparks, MD) para quantificação de cocos Gram+, seguida de incubação em jarras de anaerobiose a 37°C por 48 a 72 horas. A viabilidade foi determinada segundo metodologia proposta por Richter; Vedamuthu, (2001).

4.2.6. Isolamento de bactérias lácticas e leveduras do grão de kefir

O isolamento dos lactobacilos e dos cocos lácticos Gram+ foi realizado a partir das placas obtidas no item 4.2.5. As colônias representativas de todas as morfologias foram retiradas aleatoriamente e purificadas nos mesmos meios por subcultura. O isolamento foi realizado conforme Leite et al. (2015)..

As leveduras foram obtidas a partir do item 4.2.4. As colônias representativas foram tiradas aleatoriamente e repicadas em Ágar BHI com 30% de glicerol.

Foram realizadas análises de Gram catalase das colônias isoladas. Para o meio M17, cocos Gram-positivos e catalase negativa foram considerados e para o meio MRS foram considerados bastonetes Gram-positivos e catalase negativa e para as leveduras foram consideradas as colônias catalase positiva.

4.2.7. Obtenção da coleção de cultura de bactérias lácticas e leveduras

Os lactobacilos e os cocos Gram-positivos foram repicados em caldo MRS seguido por incubação por 48 a 72 h a 37 °C e as leveduras ativadas em ágar BDA e incubadas a 22-25 °C por cinco dias. Os isolados foram congelados em caldo MRS (bactérias lácticas) e caldo BHI (leveduras) com 30 % de glicerol. Assim, obtendo-se 225 isolados, sendo 15 isolados de lactobacilos, 15 cocos Gram-positivos e 15 leveduras, para cada amostra analisada. Os isolados foram mantidos a -80 °C em ultrafreezer (Sanyo, MDF-U33V).

4.3. Avaliação do efeito antagonista de isolados de kefir sobre microrganismos patogênicos e deterioradores

Após a obtenção dos 225 isolados, foi realizada a avaliação do efeito antagonista destes frente a microrganismos patogênicos e deterioradores (Tabela 1).

Tabela 1- Microrganismos patogênicos e deterioradores para avaliação do efeito antagonístico dos isolados dos grãos de kefir

Microrganismos patogênicos e deterioradores		
Legenda	Gram- positivo	
E.F	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 6569
L.M	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 7644
S.AUR	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC25904
S.E	<i>Staphylococcus epidermides</i>	ATCC12228
Legenda	Gram-Negativo	
E.C	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
E.A	<i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048
K.P	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
P.A	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25003
S.A	<i>Salmonella enterica sbsp. Arizonae</i>	ATCC13314
S.ENT	<i>Salmonella enterica subsp entérica</i>	ATCC13076

A atividade antagonística foi verificada pelo teste *spot on the lawn* (teste da gota), (NOGUEIRA, 2013). As bactérias lácticas foram cultivadas em caldo MRS (de Man Rogosa e Sharpe, DIFCO) e incubadas por 18 a 24 horas a 37 °C e as leveduras em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas por 72 horas a 25 °C. A concentração celular foi padronizada utilizando-se a solução padrão 1 da escala de Mc Farland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL). Após a padronização, uma alíquota de 2 µL da bactéria láctica foi inoculada em um ponto da placa com ágar MRS e incubada a 37 °C durante 48-72 horas em jarra de anaerobiose e uma alíquota de 2 µL da levedura inoculada em um ponto da placa com ágar BDA (batata dextrose ágar) e incubada a 25 °C durante 5 dias.

Os microrganismos patogênicos e deterioradores foram cultivados em caldo BHI durante 18-24 horas a 37 °C e a concentração celular padronizada por meio da solução padrão 0,5 da escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Uma sobrecamada com 8 mL de ágar BHI (0,8%) inoculado individualmente com cada cultura patogênica/deterioradora foi vertida sobre as placas de ágar MRS contendo bactérias lácticas e nas placas de ágar BDA contendo leveduras. Os testes foram realizados em duplicata.

Os halos de inibição ao redor da gota de bactérias lácticas e de leveduras foram medidos com paquímetro digital. Após verificar o antagonismo, os isolados que apresentaram inibição aos patógenos, foram novamente submetidos à coloração de Gram e catalase.

4.4. Avaliação das características macroscópicas dos grãos de kefir

Com a finalidade de avaliar as características macroscópicas dos grãos de kefir, os mesmos foram medidos com paquímetro digital e com auxílio de uma câmera digital, as amostras foram fotografadas sendo suas características (cor, formato, espessura) observadas de forma visual.

4.5. Análises físico-químicas

O leite fermentado com os grãos de kefir foram coletados e submetidos à determinação de acidez, pH e cor.

Os valores de acidez titulável (% de ácido láctico) foram determinados conforme metodologia proposta pela Instrução Normativa nº68 (BRASIL, 2006). As alterações do pH das amostras foram monitoradas utilizando-se pHmetro digital (pHTek).

Para a determinação da cor, foi realizada a análise instrumental por meio da leitura das coordenadas L^* , a^* , b^* , c^* e h^* . A análise de cor instrumental foi realizada em colorímetro Konica Minolta, modelo CR-10, utilizando o sistema CIELAB (CIE, 1996).

4.6. Delineamento Experimental

Para avaliação das características dos grãos de kefir, foi utilizado Delineamento inteiramente casualizado (DIC). Para definir o efeito antagônico dos grãos de kefir sobre os microrganismos patogênicos, foi adotado o método estatístico de análise de componentes principais (ACP) (LATTIN, CARROLL e GREEN, 2011).

Os cálculos de ACP foram realizados no programa PC-ORD (MCEUNE; MEFFORD, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização microbiológica dos grãos de kefir

Todas as amostras apresentaram valores para coliformes totais e termotolerantes fora dos padrões estabelecidos (Tabela 2), uma vez que a legislação brasileira preconiza contagem máxima de 100 NMP/g e 10 NMP/g para esses microrganismos, respectivamente (BRASIL, 2007). Para se obter kefir de boa qualidade, deve-se ter uma maior atenção às procedências dos grãos e o substrato que vai ser utilizado em sua ativação, uma vez que esse produto não é comercializado e não apresenta padronização.

Tabela 2- Resultados para análises de NMP coliformes totais e termotolerantes

Cidades	Coliformes Totais (NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (NMP/g)	<i>E. coli</i> (NMP/g)
Rio Pomba	>1100	>1100	<3,0
Cataguases	>1100	460	<3,0
Coimbra	1100	210	<3,0
Piraúba	>1100	>1100	<3,0
Rosário da Limeira	>1100	>1100	<3,0

Em relação à identificação de *E. coli*, foi constatada < 3,0 NMP/g dessa bactéria nas cinco amostras analisadas, indicando ser outros os microrganismos do grupo coliformes contaminantes do kefir, enfatizando assim a importância das boas práticas de manipulação e uma maior atenção e conhecimento em relação a origem dos grãos.

Em todas as amostras avaliadas, foi verificado < 1,0 x 10¹ UFC/g de estafilococos coagulase positiva e ausência de salmonela, indicando que para esses grupos, o produto não causa risco à saúde dos consumidores.

Baú et al. (2014) encontraram resultados diferentes para coliformes termotolerantes ao avaliarem uma bebida a base de fibra de soja fermentada com kefir. Os autores verificaram em seus estudos que o produto apresentou contagens de coliformes de acordo com o estabelecido pela legislação brasileira. Além disso, esses autores relataram que a bebida apresentou ausência de *Salmonella sp.*, resultado este semelhante ao presente estudo.

As contagens de fungos filamentosos e leveduras variaram de 4,21 a 5,39 ciclos log UFC/g (Tabela 3). Comparando os resultados obtidos das amostras entre as cidades avaliadas foi verificado que não houve diferença significativa ($p > 0,05$), ou seja, a forma de cultivo das amostras não influenciou nas contagens desses microrganismos.

Tabela 3 - Contagem para análise de bactérias lácticas, fungos filamentosos e leveduras isoladas dos grãos de kefir

Cidades	Cocos Gram-positivos	Lactobacilos	Fungos filamentosos e leveduras
Rio Pomba	8,16	8,58	5,1
Cataguases	8,96	9,09	4,44
Coimbra	7,98	7,87	5,1
Piraúba	8,55	8,62	5,39
Rosário da Limeira	8,27	8,96	4,21

Em relação à contagem de fungos filamentosos e leveduras, a instrução normativa N.º 46, de 23 de outubro de 2007 estabelece uma contagem mínima de 10^4 UFC/g, sendo as amostras avaliadas conforme a legislação vigente (Tabela 3). No entanto estudos com kefir mostram contagens superiores a 5 log UFC/mL de fungos filamentosos e leveduras. Chen et al. (2009) avaliaram as propriedades microbiológicas do kefir fabricado por microrganismos encapsulados isolados de grãos de kefir, e encontraram para fungos filamentosos e leveduras contagem de 10^7 UFC/g.

Magalhães et al. (2011) avaliaram a bebida kefir da região Sul do estado de Minas Gerais e encontraram contagens de 5 a 10 log UFC/mL para bactérias lácticas e para fungos filamentosos e leveduras os autores encontraram de 6 a 10 log UFC/mL, resultados superiores aos do presente estudo.

Avaliando a contagem de fungos filamentosos e leveduras de um kefir de água, Gultiz et al. (2011) encontraram variação na contagem de células de $5,8 \times 10^6$ a $2,7 \times 10^7$ UFC/mL.

Saltir, Zeynep e Guzel-Seydim (2015) avaliaram a influência da fermentação do kefir sobre as substâncias bioativas de diferentes leites de cabra e encontraram contagens na faixa de 5,29 á 5,60 log UFC/mL para leveduras.

Verificou-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação às contagens de lactobacilos e cocos Gram-positivos das amostras avaliadas, portanto o modo de cultivo de uma região para a outra não interferiu na viabilidade de bactérias lácticas presentes no kefir. As contagens das diferentes amostras variaram de 7,87 a 8,96 log UFC/g (Tabela 3), estando conforme a legislação vigente que estabelece valores superiores a 10^7 UFC/mL de bactérias lácticas (BRASIL, 2007).

Kök-Taş et al. (2013) avaliaram o uso de diferentes parâmetros de fermentação utilizando grãos de kefir e outro tratamento utilizando cultura starter de kefir e encontraram contagens maiores aos reportados nesta pesquisa. Os autores encontraram para lactobacilos contagens que variaram de 9,21 a 9,28 log UFC/g e para lactococos contagens de 9,23 a 9,29 log UFC/g.

Corona et al. (2016) avaliaram bebidas tipo kefir produzidas a partir de sucos de vegetais e as contagens de lactobacilos variaram de 7,0 a 8,3 Log UFC/mL, enquanto a contagem de cocos entre 6,8 a 7,6 log UFC/mL.

Leite et al. (2013) caracterizaram grãos de kefir brasileiro durante seu processo fermentativo e armazenamento e constataram que após a fermentação, as bactérias do ácido láctico apresentaram uma contagem de 10 log UFC/mL, enquanto as bactérias do ácido acético e levedura estavam presentes em níveis de 6 e 7,8 log UFC/mL, respectivamente.

Saltir, Zeynep, Guzel-Seydim (2015) encontraram contagem maiores para lactobacilos do que lactococos, sendo que o número de células variou de 9,40 á 10,01 log UFC/g para o primeiro e de 8,40 a 9,85 log UFC/g para o segundo, contagens estas mais elevadas que as do presente estudo.

Comparando as contagens de bactérias lácticas presentes nos grãos estudados, verifica-se que a contagem de lactobacilos é superior à de cocos lácticos Gram-positivos, exceto para a amostra obtida da cidade de Coimbra, os lactobacilos apresentaram maior predominância devido ao fato deste microrganismo se desenvolver em ambientes com pH menor.

Moreira Júnior et al. (2018b) avaliaram a contagem de bactérias lácticas de kefir adicionado de farinha de banana e encontraram para os cocos lácticos Gram-positivos contagens que variaram de 9,03 a 9,45 log UFC/g e para lactobacilos, a contagem variou de 8,31 a 9,19 log UFC/g.

Resultados diferentes foram encontrados por Garofalo et al. (2015), que avaliaram bactérias em grãos de kefir de leite de diferentes regiões italianas. Os

autores encontraram para bactérias cultivadas em M17 (cocos Gram-positivos) uma contagem variando de 10^3 para 10^6 UFC/ g, enquanto, em MRS (lactobacilos), o número de bactérias foi aproximadamente $5,0 \times 10^8$ UFC/ g.

Viana et al. (2017) avaliaram o processo de fermentação para produção de vinagre de kefir à base de maçã por um período de cinco dias. Os autores relataram que no início da fermentação os valores de lactobacilos encontrados foram aproximadamente 10^6 UFC/mL. Segundo Walsh et al. (2016), apesar dos grãos de kefir apresentarem uma rica variedade de bactérias, o grupo lactobacilos sobressai em relação aos demais (cocos e leveduras).

5.3. Avaliação do efeito antagônico de isolados de kefir frente a microrganismos patogênicos e deterioradores

Dos 75 isolados do meio MRS, 57 apresentaram efeito antagônico sobre pelo menos um patógeno ou deteriorador avaliado. Dos 75 isolados em M17 (cocos lácticos Gram-positivos), somente 16 apresentaram efeito antagônico sobre pelo menos um patógeno ou deteriorador avaliado e das 75 leveduras, nenhuma apresentou efeito antagônico sobre os microrganismos.

Ao avaliar a inibição das bactérias lácticas dos isolados de grãos de kefir obtidos de diferentes cidades em ágar MRS, frente a bactérias patogênicas e deterioradoras, constatou-se capacidade inibitória diferente para cada isolado de bactéria láctica. Os isolados no MRS apresentaram menor efeito antagônico frente ao *Salmonella enterica subsp enterica*, ou seja, este patógeno apresentou maior resistência que os demais frente às substâncias produzidas pelas bactérias lácticas avaliadas. Esse microrganismo apresentou maior resistência provavelmente pelo fato de ser uma bactéria entérica e resistir a valores de pH mais baixos.

Em relação aos cocos Gram-positivos isolados em ágar M17, pelo menos um apresentou efeito antimicrobiano frente a um patógeno Gram-positivo, já os patógenos Gram-negativos *Escherichia coli* (E.C) e *Pseudomonas aeruginosa* (P.A) são resistentes aos cocos lácticos Gram-positivos isolados dos grãos de kefir (Figura 2).

As amostras de Piraúba apresentaram maior número de isolados em ágar M17 (cocos Gram-positivo) com efeito antagônico frente aos patógenos Gram-positivos (Figura 1), sendo *Staphylococcus aureus* o microrganismo mais inibido.

Em relação aos isolados em ágar M17 frente aos patógenos Gram-negativos,

verificou-se que a amostra de Piraúba foi a que apresentou maior número de isolados que inibiram os patógenos (Figura 2).

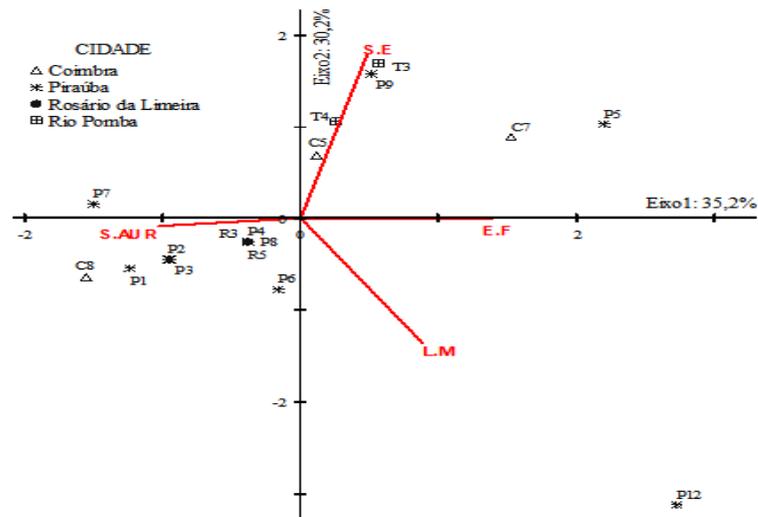


Figura 1 - Efeito antagonístico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar M17 frente aos microrganismos patogênicos Gram-positivos.

Legenda: T- Amostra obtida em Rio Pomba, A- Amostra obtida em Cataguases, C- Amostra obtida em Coimbra, P- Amostra obtida em Piraúba e R- Amostra obtida em Rosário da Limeira.

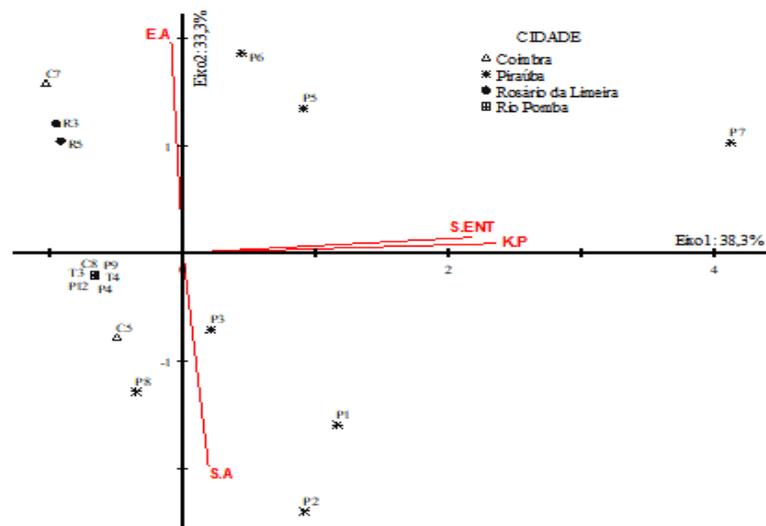


Figura 2 - Efeito antagonístico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar M17 frente aos microrganismos patogênicos Gram-negativos.

Legenda: T- Amostra obtida em Rio Pomba, A- Amostra obtida em Cataguases, C- Amostra obtida em Coimbra, P- Amostra obtida em Piraúba e R- Amostra obtida em Rosário da Limeira.

Em relação aos lactobacilos isolados em ágar MRS, verificou-se que as amostras coletadas nas cidades de Coimbra e Piraúba foram as que apresentaram maior número de isolados com efeito antagonístico frente aos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (Figuras 3 e 4). O isolado C30 foi o que apresentou maior halo de

inibição frente aos patógenos Gram-negativos e *Salmonella enterica subsp enterica* (S.ENT) foi o microrganismo com maior resistência (Figura 4).

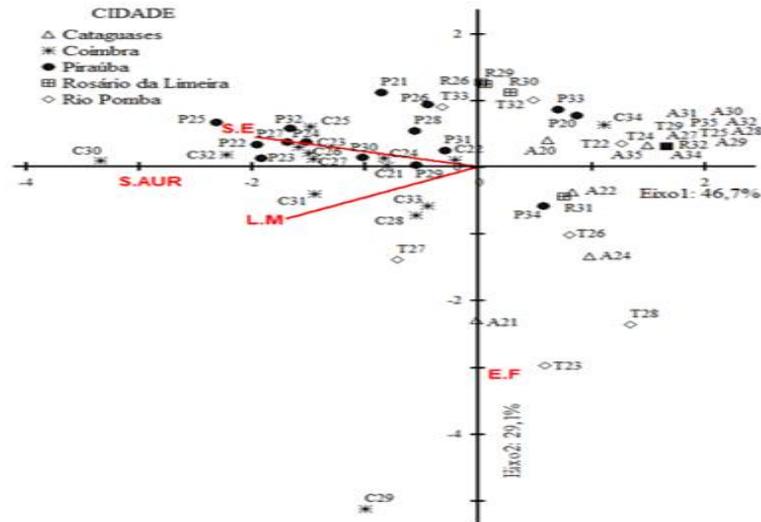


Figura 3 - Efeito antagônico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar MRS frente aos microrganismos patogênicos Gram-positivos.
 Legenda: T- Amostra obtida em Rio Pomba, A- Amostra obtida em Cataguazes, C- Amostra obtida em Coimbra, P- Amostra obtida em Piraúba e R- Amostra obtida em Rosário da Limeira.

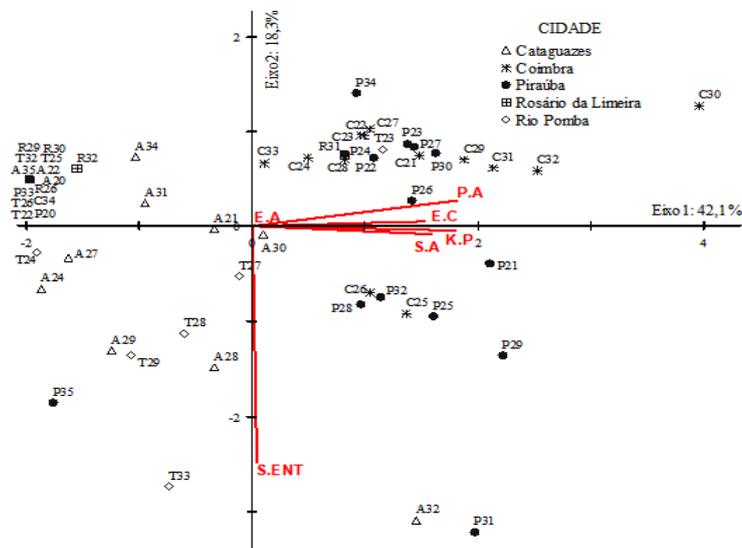


Figura 4 - Efeito antagônico das bactérias lácticas do kefir isoladas em ágar MRS frente aos microrganismos patogênicos Gram-negativos.
 Legenda: T- Amostra obtida em Rio Pomba, A- Amostra obtida em Cataguazes, C- Amostra obtida em Coimbra, P- Amostra obtida em Piraúba e R- Amostra obtida em Rosário da Limeira.

Verifica-se maior número de isolados obtidos em ágar MRS com efeito antagônico quando comparado aos isolados em ágar M17.

Em relação às leveduras dos grãos de kefir isoladas em ágar BDA, nenhum

isolado inibiu os microrganismos patogênicos e deterioradores avaliados, pois as leveduras não apresentam uma produção tão elevada de ácido, assim não sendo efetiva como antimicrobiano.

Anselmo et al. (2010) avaliaram o efeito antagônico do kefir frente à *Bacillus Cereus* e *Clostridium perfringens* e observaram que o produto é eficiente na inibição desses microrganismos. No trabalho, foi observado que essas bactérias patogênicas podem sobreviver ao baixo pH e às temperaturas de refrigeração por um tempo significativo, havendo a possibilidade de serem contaminantes em produtos lácteos pós tratamento térmico, destacando-se a importância das boas práticas durante a produção e armazenamento do kefir.

Dias et al. (2012b) inocularam patógenos no kefir e verificaram que as substâncias produzidas pelos microrganismos contidos nos grãos de kefir durante o processo fermentativo do leite gerou um ambiente desfavorável para o desenvolvimento de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*.

Em uma pesquisa realizada por Weschenfelder et al. (2018), verificou-se que o kefir apresentou atividade antagônica significativa contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 11229) após 24 horas de exposição.

5.4. Avaliação das características macroscópicas dos grãos de kefir

Os grãos de kefir apresentaram um diâmetro médio variando de 5,02 mm a 13,92 mm, sendo que cada amostra apresentou grãos com tamanho e coloração diferentes (Figura 5).

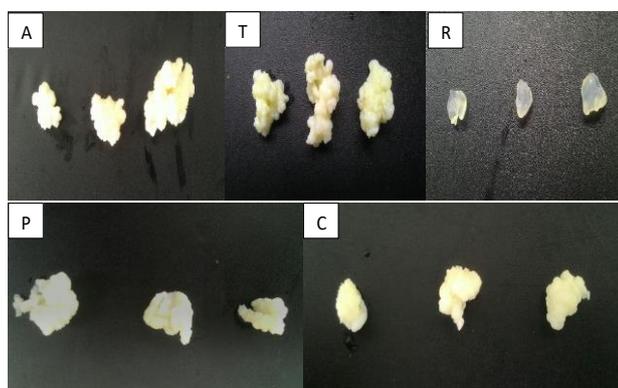


Figura 5 - Características macroscópicas dos grãos de kefir.

Legenda: T- Amostra obtida em Rio Pomba, A- Amostra obtida em Cataguases, C- Amostra obtida em Coimbra, P- Amostra obtida em Piraúba e R- Amostra obtida em Rosário da Limeira.

A amostra da cidade de Piraúba apresentou grãos de kefir com coloração branca e firme, com o diâmetro médio de 13,92 mm. Valores próximos à amostra de Cataguases que obteve grãos com valores médios de 13,52 mm. Os grãos de kefir da amostra de Rio Pomba apresentou menor diâmetro, em média 5,02 mm.

Os grãos de kefir obtidos em Rosário da Limeira apresentaram uma coloração mais translúcida e um diâmetro médio de 7,32 mm. Essa coloração diferenciada dos grãos pode ter ocorrido devido à utilização de outro substrato antes do leite, como água com açúcar mascavo ou algum suco. A amostra obtida em Coimbra apresentou uma coloração amarelada e um diâmetro de 10,52 mm.

A diferença da coloração e dos diâmetros encontrados nos grãos das diferentes cidades pode ser explicada por dois fatores: o primeiro é o substrato que estava sendo utilizado pelo manipulador, pois a coloração do mesmo varia de acordo com a matéria prima usada no processo fermentativo do kefir e o segundo é a composição microbiana desses grãos, pois não se deve estabelecer uma coloração e tamanho específico para os grãos, dificultando assim sua padronização.

Güzel-Seydim et al. (2000) destacam que os grãos do kefir apresentam uma coloração branca, composta por diversos microrganismos e que o diâmetro dos grãos se multiplica em torno de 5% durante o processo fermentativo.

Anselmo et al. (2010) descreveram os grãos como insolúveis em água de forma irregular e que o seu tamanho varia de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro, apresentando uma estrutura gelatinosa.

Em um trabalho realizado por Garofalo et al. (2015), foram verificadas as características morfológicas e macroscópicas de grãos de kefir de seis regiões da Itália. Os autores constataram que as amostras apresentaram diferenças marcantes principalmente em relação ao diâmetro, sendo que os grãos de kefir de tamanho maior apresentaram 4 cm.

Leite et al. (2012) relatam que os grãos de kefir são brancos-amarelados, parecidos com couve-flor, compostos de uma matriz de polissacarídeo e proteína contendo uma comunidade microbiana estável e específica de diferentes bactérias produtoras de ácido lático e acético e ainda leveduras fermentadoras de lactose.

5.5. Qualidade físico-química de Kefir

Na análise de acidez titulável em % de ácido lático foi observado que as amostras não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Os resultados das

amostras variaram de 0,85% a 1,16 % de ácido láctico (Tabela 4). As amostras de kefir estavam conforme os padrões estabelecidos pela legislação vigente (BRASIL, 2007), que estabelece máximo de 1,5 % de ácido láctico para a bebida.

Em relação aos valores de pH, não houve diferença significativa entre as amostras ($p > 0,05$) e os resultados variaram de 3,80 a 4,76 (Tabela 4), indicando que a forma de cultivo de cada cidade não influenciou na produção de ácido láctico.

Tabela 4-Acidez e pH das amostras de kefir de diferentes cidades da zona da mata mineira

Cidades	% de ácido láctico	pH
Rio Pomba	1,05	3,80
Cataguases	0,96	3,82
Coimbra	1,02	4,76
Piraúba	1,16	4,46
Rosário da Limeira	0,85	3,94

Bakhshandeh et al. (2011), ao avaliarem a evolução do flavor e aroma presentes em duas culturas de kefir, verificaram que as amostras analisadas não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para pH, variando de 4,3 a 4,6, resultados próximos aos do presente estudo. Baú et al. (2013), ao elaborarem kefir fermentado com soja e adicionado de fibras, verificaram valores de pH variando de 4,46 a 4,62.

Gul et al. (2015) caracterizaram o kefir fermentado em leite de vaca e búfala e ainda usaram grãos de kefir e cultura *starter*. Os autores encontraram valores de pH variando de 4,26 a 4,64, ao longo do armazenamento de 21 dias, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras.

Januário et al. (2016) caracterizaram grãos de kefir físico-quimicamente e padronizaram os parâmetros de processo das bebidas, a fim de obter um produto de boa qualidade. Os pesquisadores constataram que os grãos de kefir consistiam basicamente de água ($85,61 \pm 0,41\%$) e baixa acidez encontrando 0,90 % de ácido láctico e pH aproximado de 4,45.

Turkmen (2017) relata que a bebida kefir deve apresentar acidez de aproximadamente 0,7% de ácido láctico no final do período de incubação. Baú et al. (2012) encontraram valores menores para acidez, ao avaliarem amostras de kefir

fermentados com fibras e sem fibras. Os autores relataram que o kefir sem adição de fibras apresentou uma acidez de 0,37% de ácido láctico.

Noberto et al. (2018) avaliaram três tratamentos fermentados com grãos de kefir: um contendo 100% de leite integral, outro 50% leite integral e 50% extrato hidrossolúvel de soja e uma terceira formulação com 100% de extrato hidrossolúvel de soja. Os valores de acidez no produto final para as formulações foram, respectivamente, 0,765 %, 0,738 e 0,600 % de ácido láctico e para pH as amostras variaram de 5,5 a 5,7.

Quanto à cor, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as amostras em relação aos parâmetros a^* (cordenada vermelho/verde), b^* (cordenada amarelo/azul) e L^* (luminosidade), ou seja, as amostras temem a vermelho e amarelo. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros c e h (Tabela 5).

Tabela 5- Resultados da análise de cor de kefir de diferentes regiões da zona da mata mineira

Cidades	a^*	b^*	L	c^*	h^*
Rio Pomba	0,666 a	10,860 a	53,486 a	-5,243 c	98,87 c
Cataguases	0,483 a	1,933 a	56,986 a	6,323 ab	149,32b
Coimbra	0,633 a	3,123 a	60,663 a	3,836 b	48,296d
Piraúba	0,863 a	1,050 a	54,186 a	7,13a	199,18 a
Rosário da Limeira	0,866 a	3,150 a	49,000 a	6,456ab	129,36b

Letras iguais na mesma coluna indicam que não houve diferença significativa a 5% pelo teste de Tukey.

Para o parâmetro c^* (saturação), a amostra da cidade de Rio Pomba apresentou menor valor quando comparado às demais amostras. A amostra com maior saturação foi à obtida em Piraúba, que não diferiu estatisticamente das amostras obtidas em Cataguases e Rosário da Limeira.

Para o parâmetro h^* (tonalidade) houve diferença significativa entre as amostras das cidades Rio Pomba, Coimbra e Piraúba. Já as amostras obtidas em Cataguases e Rosário da Limeira não diferiram entre si. A amostra obtida em Coimbra possui tendência à cor vermelha e as demais ao amarelo.

Moreira Junior et al. (2018a) analisaram a coloração de amostras de kefir adicionado de diferentes concentrações de yacon e verificaram que não houve

diferença significativa ($p > 0,05$) dos parâmetros avaliados entre as amostras e nem com o tempo de armazenamento dos produtos.

6. CONCLUSÃO

As amostras de kefir apresentaram características físico-químicas e contagens microbiológicas dentro dos padrões estabelecidos pela legislação, exceto para coliformes totais e termotolerantes.

As amostras apresentaram diferença na coloração e nas características macroscópicas dos grãos, não influenciando nas contagens microbianas e nas características físico-químicas das amostras.

O kefir apresentou efeito antagônico frente a diferentes microrganismos patogênicos devido às substâncias produzidas pelas bactérias lácticas, sendo que lactobacilos apresentou maior efeito antimicrobiano que os cocos lácticos Gram-positivos.

Novos estudos devem ser realizados a fim de comprovar quais substâncias possuem efeito de inibição frente aos patógenos e deterioradores avaliados. Além disso, é importante verificar quais isolados podem ser utilizados em outros alimentos atuando como antimicrobiano.

7. REFERÊNCIAS

- ANDREWS, W. H.; FLOWER, R. S.; SILLIKER, J.; BAILEY, J. S. *Salmonella*. DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.). In: **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4. ed., Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 357-380, 2001.
- ANSELMO, R. J., VIORA, S. S., OJEDA, P. A., LAUSADA, L. I. Efecto antagónico del kefir sobre endosporas y células vegetativas de *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens*. **Información tecnológica**, v. 21, n. 4, p. 131-138, 2010.
- ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA – Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.
- AUAD, L. I. **Seleção de bactérias lácticas do kefir como produtoras de substâncias inibitórias de *Listeria monocytogenes***. 2014. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2014.
- BAKSHANDEH, T., POURAHMAD, R., SHARIFAN, A., MOGHIMI, A. Evaluation of flavor and aroma compounds present in kefir. **Jornal of Food Biosciences ant technology**, v.1, n.1, p.99, 2011.
- BAÚ, T. R., DA SILVA, L. C., GARCIA, S., E IDA, E. I. Technological functional properties of soy, oat and wheat fibers and soy products with added fibers and fermented with kefir culture. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 3093-3102, 2013.
- BAÚ, T. R.; GARCIA, S.; IDA, E. I. Evaluation of a functional soy product with addition of soy fiber and fermented with probiotic kefir culture. **Brazilian Archives of Biologyand Technology**, v.57, n.3, p.402-409, 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de leite e Produtos Lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 dez., 2006. Seção I.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 46, de 23 de outubro de 2007. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília. 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origrm animal/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.Secretaria de Defesa Agropecuária-Brasília:MAPA, 2017.

CAETANO, D. R.; MONTANHINI, M. T. M. Análise microbiológica de leite fermentado kefir produzido com leite contaminado por *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 33-38, 2014.

CASSANEGO, D. B., DOS SANTOS RICHARDS, N. S. P., MAZUTTI, M. A., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M. yeasts: diversity in kefir, probiotic potential and possible use in ice cream. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 175-186, 2015.

CHEN, T. H., WANG, S. Y., CHEN, K. N., LIU, J. R., CHEN, M. J. Microbiological and chemical properties of kefir manufactured by entrapped microorganisms isolated from kefir grains. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 7, p. 3002-3013, 2009.

CIE – Commission Internationale de l'Éclairage. Colorimetry. Vienna: CIE publication, 2ª ed. 1996.

CORONA, O., RANDAZZO, W., MICELI, A., GUARCELLO, M., FRANCESCA N., ERTEN, H. Y., SETTANN, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **Food Science and Technology**, v.66, p. 572-581, 2016.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. de O. B. **Alimentos Funcionais – Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. 480p.

DIAS, M.T.; BRICIO, S.M.L.; ALMEIDA, D.O.; OLIVEIRA, L.A.T.; FILIPPIS I.; MARIN, V.A. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.32, n.4, p.747-753, 2012a.

DIAS, P. A.; ROSA, J.V.; TEJADA, T.S.; TIMM, C.D. Propriedades antimicrobianas do kefir. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 01-05, 2016.

DIAS, P.A. **Atividade antimicrobiana de micro-organismos isolados de grãos de kefir**. 2011. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

DIAS, P.A.; SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; LEAL, M.C.G.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; TIMM, C.D. Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 177- 181, 2012b.

DINIZ, R. O.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEENEDORF, J. M. Atividade antiinflamatória de quefir, um probiótico da medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.13, p.19-21, 2003.

Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., de Souza Vandenberghe, L. P., e Soccol, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. **Food microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017.

GAROFALO, C., OSIMANI, A., MILANOVIĆ, V., AQUILANTI, L., DE FILIPPIS, F., STELLATO, G., E CLEMENTI, F. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food microbiology**, v. 49, p. 123-133, 2015.

GUL, O., MORTAS, M., ATALAR, I., DERVISOGLU, M., KAHYAOGU, T. Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1517-1525, 2015.

GULITZ, A., STADIE, J., WENNING, M., EHRMANN, M. A., e VOGEL, R. F. The microbial diversity of water kefir. **International journal of food microbiology**, v. 151, n. 3, p. 284-288, 2011.

GÜZEL-SEYDİM, Z. B., SEYDİM, A. C., GREENE, A. K., BODINE, A. B. Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. **Journal of Food composition and Analysis**, v. 13, n. 1, p. 35-43, 2000.

HSIEH, H. H.; WANG, S. Y.; CHEN, T. L.; HUANG, Y. L.; CHEN, M. J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 73-81, 2012.

JANUÁRIO, J.G.B.J. Kefir Beverage Development: Standardization of Process Parameters. **Brazilian journal of food Research**, v. 7, n. 2, p. 80-95, 2016.

KÖK-TAŞ, T., SEYDİM, A. C., ÖZER, B., E GUZEL-SEYDİM, Z. B. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kefir. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 2, p. 780-789, 2013.

KORNACKI, J.L.; JOHNSON, J.L. Enterobacteriaceae, coliforms, and Escherichia coli as quality and safety indicators In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association-APHA, 2001. Chapter 8, p. 69-82.

LANCETTE, G. A.; BENNETT, R. W. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F. P; ITO, K. (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p.387-404p, 2001.

LATTIN, J., CARROLL, J. D., e GREEN, P. E. Análise de dados multivariados. **São Paulo: Cengage Learning**, v. 475, 2011.

LEITE, A. M. O., LEITE, D. C. A., DEL AGUILA, E. M., ALVARES, T. S., PEIXOTO, R. S., MIGUEL, M. A. L., e PASCHOALIN, V. M. F. Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 7, p. 4149-4159, 2013.

LEITE, A. M. O., MAYO, B., RACHID, C. T. C. C., PEIXOTO, R. S., SILVA, J. T., PASCHOALIN, V. M. F., DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 215-221, 2012.

LEITE, A. M.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V. M. F.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic potential of selected

lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of dairy science**, v.98, n.6, p.3622-3632, 2015.

LIKOTRAFITI, E.; VALAVANI, P.; ARGIRIOU, A.; RHOADES, J. In vitro evaluation of potential antimicrobial synbiotics using *Lactobacillus kefir* isolated from kefir grains. **International Dairy Journal**, v.45, p.23-30, 2015.

MACHADO, B. A.; REIS, J. H.; PIRES, E. A.; SANTOS, F. L. Mapeamento tecnológico de patentes de kefir. **Cadernos de Prospecção**, v.5, n.2, p.86, 2014.

MAGALHÃES, K. T., PEREIRA, G. V. D. M., CAMPOS, C. R., DRAGONE, G., e SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 693-702, 2011.

MARTINS, J. D. F. L.; MARINHO, E.; FIRMINO, H. H.; DA CRUZ RAFAEL, V.; FERREIRA, C. L. D. L. F. Avaliação da adição do Kefir em dieta hospitalar. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v.67, n.386, p.13-19, 2012.

MCCUNE, B., e MEFFORD, M. J. **PC-ORD: multivariate analysis of ecological data; Version 4 for Windows;[User's Guide]**. MjM software design, 1999.

MENESTRINA, F.; GRISALES, J. O.; CASTELLS, C. B. Chiral analysis of derivatized amino acids from kefir by gas chromatography. **Microchemical Journal**, v.128, p.267-273, 2016.

MIGUEL, M. G. D. C. P.; CARDOSO, P. G.; DE ASSIS LAGO, L.; SCHWAN, R. F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. **Food Research International**, v.43, n.5, p.1523-1528, 2010.

MOREIRA JUNIOR, S., DE FREITAS, M. L. F., MARTINS, M. L., BENEVENUTO, W. C. A. N., GONÇALVES, I. F., MARTINS, A. D. O.. Avaliação do efeito de yacon em kefir sabor morango. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 73, n. 2, p. 51-61, 2018a.

MOREIRA JUNIOR, S., RODRIGUES, M. P. J., BENEVENUTO, W. C. A. N., MARTINS, A. D. O. Efeito da Farinha de Banana verde no crescimento de bactérias lácticas contidas nos grãos de kefir. **Higiene Alimentar**, v. 32, n. 28p.283 , 2018b.

MURASHOVA, A. O.; NOVAKSHONOV, A. A.; UCHAIKIN, U. F. The effectiveness of using bifidokefir for the treatment of severe intestinal infections and the connection of dysbiosis in children. **Dairyof Science Abstracts**, v. 59, p. 42, 1997.

NOGUEIRA, M. B. **Atividade antagonista de *Lactobacillus brevis* e *Bifidobacterium lactis* contra *Streptococcus mutans* e sua viabilidade na forma livre e microencapsulada em goma de mascar**. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Pelotas, 2013.

NORBERTO, A. P., MARMENTINI, R. P., CARVALHO, P. H., CAMPAGNOLLO, F. B., TAKEDA, H. H., ALBERTE, T. M., SANT'ANA, A. S. Impact of partial and total

replacement of milk by water-soluble soybean extract on fermentation and growth parameters of kefir microorganisms. **LWT**, v. 93, p. 491-498, 2018.

PIETTA, G. M.; PALEZI, SIMONE, C. Desenvolvimento de um iogurte sabor mirtilo à base de kefir e com reduzido teor de lactose. **Unoesc & Ciência**, v. 6, n. 5, p. 163-172, 2015.

REIS, S. A. D. **EFEITO do consumo de kefir de leite integral sobre o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas intestinais em ratos Wistar**. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2015.

RICHTER, R. L.; VEDAMUTHU, E. R. Milk and milk products. In: DOWNES, F. P.; ITO, K. (Eds.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4.ed. Washington, DC: American Public Health Association – APHA, p. 483-496, 2001.

ROMANIN, D.; SERRADELL, M.; MACIEL, D. G.; LAUSADA, N.; GARROTE, G. L.; RUMBO, M. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. **International journal of food microbiology**, v.140, n.2, p.102-108, 2010.

SANTOS, F.L.; SILVA, E.; SILVA, J.; BARBOSA, A.; SOUZA, A. C. Promoção do consumo de alimentos funcionais no recôncavo da Bahia: Estratégias de popularização do kefir. **Revista Extensão**, v.3, n.1, 2012.

SANTOS, M. R.; BASSO, C. Análise físico-química e sensorial de gelatina à base de kefir. **Disciplinarum Scientia Saúde**, v.14, n.1, p.93-100, 2016.

SATIR, G., ZAINEP, B., E GUZEL-SEYDIM, Z. B. INFLUENCE of Kefir fermentation on the bioactive substances of different breed goat milks. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 852-858, 2015.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. 4. ed. São Paulo: Varela, 2010. 624 p.

TURKMEN, N. Chapter 29 – Kefir as a Functional Dairy Product. **Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan**. 2017.373-383p

VIANA, R. O., MAGALHÃES-GUEDES, K. T., BRAGA JR, R. A., DIAS, D. R., e SCHWAN, R. F. Fermentation process for production of apple-based kefir vinegar: VUONG, C., E OTTO, M. Staphylococcus epidermidis infections. **Microbes and infection**, v. 4, n. 4, p. 481-489, 2002.

WALSH, A. M., CRISPIE, F., KILCAWLEY, K., O'SULLIVAN, O., O'SULLIVAN, M. G., CLAESSION, M. J., E COTTER, P. D. Microbial succession and flavor production in the fermented dairy beverage kefir. **Msystems**, v. 1, n. 5, p.16, 2016.

WESCHENFELDER, S., PAIM, M. P., GERHARDT, C., CARVALHO, H. H. C., e WIEST, J. M. Kefir: composition and evaluation of in situ antagonistic activity against

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli*. **Revista Ciência Agronômica**, v. 49, n. 3, p. 450-457, 2018.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em Kefir e soro de Kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Viçosa, MG, v. 64, n. 368, p. 48-55, 2009.

YOVANOUDI, M.; DIMITRELI, G.; RAPHAELIDES, S. N.; ANTONIOU, K. D. Flow behavior studies of kefir type systems. **Journal of Food Engineering**, v.118, n.1, p.41-48, 2013.

ZANIRATI, D. F., ABATEMARCO JR, M., DE CICCIO SANDES, S. H., NICOLI, J. R., NUNES, Á. C., e NEUMANN, E. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70-76, 2015.