UNIVERSIDADE DE SOROCABA

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA, EXTENSÃO E INOVAÇÃO

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS TECNOLÓGICOS E AMBIENTAIS

Carlos Alberto Martins

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR

Sorocaba/SP
2021

Carlos Alberto Martins

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais

Orientador: Profa. Dra. Renata de Lima

Sorocaba/SP
2021

Martins, Carlos Alberto
M342a Avaliação molecular de microrganismos isolados de grãos de kefir / Carlos Alberto Martins. – 2021.
44 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Renata de Lima
Dissertação (Mestrado em Processos Tecnológicos e Ambientais) – Universidade de Sorocaba, Sorocaba, SP, 2021.

1. Kefir. 2. Leite fermentado. 3. Probióticos. 4. Alimentos funcionais. I. Lima, Renata de, orient. II. Universidade de Sorocaba. III. Título.

Carlos Alberto Martins

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR

Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais da Universidade de Sorocaba, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Processos Tecnológicos e Ambientais

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA:

Prof.(a) Dra. Renata de Lima
Universidade de Sorocaba

Prof.(a) Dra. Daniele Ribeiro Araújo
Universidade Federal do ABC

Dr. Jhones Luis de Oliveira
UNESP/Jaboticabal

Dedico...
Aos meus pais e irmã.
Ao meu companheiro de vida.
Aos amigos da caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir chegar até aqui.

A Universidade de Sorocaba pela concessão da bolsa de estudos.

A Dra. Renata de Lima, minha orientadora e amiga, pela certeira condução durante esse período de aprendizado.

A Natalia Bilesky José, minha ex-aluna, colega de laboratório e atual amiga pelo acompanhamento diário e incansável durante as atividades a serem cumpridas. A você todo o meu respeito.

Aos colegas do Labiton pelo companheirismo no dia a dia.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Processos Tecnológicos e Ambientais pelas orientações e condução durante a caminhada.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

A alimentação saudável é uma área que apresentou grande crescimento nos últimos anos, principalmente em relação à alimentação funcional, onde é possível destacar o consumo de kefir, um leite fermentado de sabor ligeiramente ácido, efervescente e de baixo teor alcoólico. Este fermentado é resultante da atividade metabólica dos microrganismos presentes nos seus grãos, uma mistura complexa e específica de bactérias e leveduras envolvidas por uma matriz de polissacarídeo. Tradicionalmente, as amostras de kefir são obtidas por doação ou vendas em pequenas porções, dentro de potes de vidro e/ou plástico e até mesmo enviadas pelo correio, os quais podem passar por alterações de temperatura durante o tempo de transporte. Após recebimento, os grãos são lavados e colocados para crescer em leite ou água dependendo do tipo de kefir, sendo o líquido resultante da fermentação consumido puro, batido com frutas ou sendo empregado como ingrediente de alguma receita. Em alguns períodos, por motivos de viagem, falta de tempo para cuidar do kefir ou desinteresse momentâneo no consumo, é possível levar porções de kefir ao congelamento, e posteriormente reiniciar a cultura. Nenhum controle de qualidade do produto é observado em nenhuma das etapas, o que resulta em uma produção irregular. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar amostras de kefir de leite e de água, provenientes das cidades de Sorocaba/SP e Ponta Grossa/PR, submetidas a alterações de aumento e diminuição de temperatura e simulação das condições de estocagem para transporte. No estudo foram realizadas análises moleculares quali/quantitativas, através da execução de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) simples e qPCR (PCR Real Time) utilizando primers específicos para as bactérias *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. kefiranofaciens*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, assim como a avaliação da capacidade antimicrobiana do fermentado, através de teste de disco difusão. Foi observado por PCR simples, a presença das bactérias estudadas em todas as amostras de kefir. Em relação a quantificação das bactérias *L. kefir*, Firmicutes e Bacteroidetes pode-se ressaltar que ocorreram variações conforme a condição a que as amostras foram submetidas. Porém, demonstraram uma retomada de equilíbrio ao longo do tempo quando comparada às amostras controle. Observou-se que amostras de Kefir de leite foram as que apresentaram maior variação em relação ao controle, mostrando que estas bactérias sofreram mais em relação a alteração do ambiente em relação às amostras de kefir de água que se mostraram mais estáveis. Logo, alterações bruscas podem levar a um desequilíbrio da comunidade, alterando a simbiose do grupo e por consequência interferindo na qualidade do produto. Os resultados mostraram que nenhuma amostra apresentou atividade antimicrobiana.

Palavras-chave: Kefir. Leite fermentado. Probiótico.

ABSTRACT

Healthful eating is one area that has increased in recent years, especially with regard to functional nutrition. In this type of feeding, it is possible to highlight the consumption of kefir, a fermented milk of slightly acidic, effervescent and low alcohol flavor. This fermented is the result of the metabolic activity of microorganisms present in their grains, a complex and specific mixture of bacteria and yeast involved by a polysaccharide matrix. Traditionally, kefir samples are obtained by donation or sales in small parts, inside glass and/or plastic pots and even sent by mail, which may undergo temperature changes during shipping time. Upon receipt, the grains are washed and placed to grow in milk or water depending on the type, the liquid being the resulting from the fermentation consumed pure, beaten with fruits or being used as an ingredient of some recipe. At times, for travel reasons, lack of time to take care of kefir or momentary disinterest in consumption, kefir sections are taken to freezing to restart the crop later. This does not observe a quality control of the product in any of the steps, which results in an irregular production. Thus, this study aimed to analyze samples of milk kefir and water kefir, from the cities of Sorocaba/SP and Ponta Grossa/PR, submitted to changes in temperature increase and decline and simulation of storage conditions for transport. In the study, qualitative/quantitative molecular analyses were performed, through pcr (Polymerase Chain Reaction) and qPCR (PCR Real Time) using specific primers for the bacteria *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. kefiranofaciens*, *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, as well as the evaluation of the antimicrobial capacity of the fermented, applying the diffusion disc test. The presence of the bacteria in all kefir samples was available by simple PCR. Regarding the quantification of the bacteria L. kefir, Firmicutes and Bacteroidetes, it can be emphasized that there were variations according to the condition to which the samples were submitted. However, they demonstrated a resumption of balance over time when compared to the control samples. It was observed that kefir samples of milk were the ones that presented the highest variation in relation to the control, showing that these bacteria suffered more in relation to the alteration of the environment in relation to the water kefir samples that were more stable. Therefore, abrupt changes can lead to a community imbalance, altering the symbiosis of the group and consequently interfering in the quality of the product. The results showed that no sample showed antimicrobial activity.

Keywords: Kefir. Fermented milk. Probiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 - Amostras de Kefir. Em A) Kefir água e em B) Kefir leite. 17

Figura 2 - Amostras de kefir de leite e de água provenientes de diferentes regiões, sendo A: kefir leite obtido por doação (Sorocaba-SP); B: kefir água obtido por doação (Sorocaba-SP); C: kefir leite adquirido da empresa (Ponta Grossa – PR); D: kefir água adquirido da empresa (Ponta Grossa – PR). 22

Figura 3 - Método tradicional de produção de bebida fermentada com uso de grãos de kefir. 23

Figura 4 - Esquema mostrando a distribuição das amostras conforme a exposição a que foram submetidas no estudo. 24

Figura 5 - Esquema exemplificando os procedimentos realizados com cada amostra (esquema simulando as amostras contando apenas o material provenientes de Sorocaba-SP) 25

Figura 6 - Avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de disco de difusão. 28

Figura 7 – Gel agarose 1,5% das análises de PCR simples para bactérias *L kefir* (A) e *L. paraquefir* (B) 29

Figura 8 - Gel agarose 1,5% das análises de PCR simples para bactérias *L kefiriranofaciens* 30

Figura 9 - Gel agarose 1,5% das análises de PCR simples para representantes do filo Firmicutes (A) e Bacteroidetes (B) 31

Figura 10 - Análises de quantificação relativa referente as bactérias *L. kefir*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. As amostras analisadas são de kefir leite (KL), onde o gráfico A refere-se ao material procedente de Ponta Grossa, no Paraná (PR), enquanto o gráfico B refere-se às amostras de Sorocaba, São Paulo (SP). A letra (f) colocada antes de cada sigla indica a amostra final coletada, que passou 30 dias sendo cultivada. A marcação numeral (1) refere-se ao controle, (2) refere-se à exposição ao frio, (3) refere-se à exposição ao calor e (4) refere-se ao material embalado para transporte. Todas as diferenças observadas são consideradas significativas, devido a análise estatística do programa. 32

Figura 11 - Análises de quantificação relativa referente as bactérias *L. kefir*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. As amostras analisadas são de kefir água (KA), onde o gráfico A refere-se ao material procedente de Ponta Grossa, no Paraná (PR), enquanto o gráfico B é referente às amostras de Sorocaba, São Paulo (SP). A letra (f) colocada antes de cada sigla indica a amostra final coletada, que passou 30 dias sendo cultivada. A marcação numeral 1 refere-se ao controle, 2 refere-se à exposição ao frio, 3 refere-se à exposição ao calor e 4 refere-se ao material embalado para transporte. Todas as diferenças observadas são consideradas significativas, devido a análise estatística do programa. 34

QUADROS

Quadro 1 - Primers utilizados para a quantificação de genes específicos no PCR simples e no qPCR.....26

Quadro 2 - Formação de halo em teste de disco utilizando fermentado de kefir de leite, kefir de água e antibiótico/penicilina estreptomicina como controle.....36

SUMÁRIO

RESUMO 7

1 INTRODUÇÃO 12

2 OBJETIVOS 14

2.1 OBJETIVO GERAL 14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

3 REVISÃO DE LITERATURA 15

3.1 O KEFIR 15
3.2 COMPOSIÇÃO DO KEFIR 18
3.3 AS BACTÉRIAS FIRMICUTES E BACTEROIDETES 20

4 MATERIAL E MÉTODOS 22

4.1 AMOSTRAS 22
4.2 TRATAMENTO DAS AMOSTRAS 22
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA 25
4.4 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DOS GRÃOS DE KEFIR POR PCR SIMPLES 25
4.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR QUANTITATIVA RELATIVA POR QPCR 26
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO TESTE DE DISCO DE DIFUSÃO 27

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 29

5.1 ANÁLISE MOLECULAR QUALITATIVA DOS GRÃOS DE KEFIR POR PCR SIMPLES 29
5.2 ANÁLISE MOLECULAR QUANTITATIVA RELATIVA POR QPCR 31
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA PELO TESTE DE DISCO DE DIFUSÃO 35

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 38

REFERÊNCIAS 39

1 INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, principalmente nas grandes regiões urbanas, as pessoas apresentam características de estresse, ansiedade, sempre estão atrasadas devido as inúmeras atividades, e como consequência se alimentam mal. Este excesso de atividade, junto a má alimentação pode colaborar para o surgimento de várias doenças. Em contrapartida, uma parcela da população vem buscando uma forma de vida alternativa, tentando, cada vez mais, ter uma vida saudável, seja realizando mais atividade física, ou melhorando a alimentação. Toda essa busca, de novos parâmetros de bem-estar, abre um leque de possibilidades e mostra ser um tema promissor.

Desta maneira, as pessoas acabam incluindo em sua dieta alimentar, alimentos saudáveis que contribuam para um melhor padrão de saúde. Dentro desse novo padrão está a chamada alimentação funcional, sendo que, para que um alimento seja considerado funcional é necessário que o mesmo, além de trazer benefícios à saúde, possa prevenir, reduzir os efeitos e/ou colaborar no tratamento de algumas doenças, e assim por diante.

Nessa grande área de alimentação funcional encontramos os chamados probióticos, alimentos que contém microrganismos vivos que promovem benefícios à saúde, pois agem de forma positiva em relação as chamadas “bactérias boas”, diminuindo a concentração de microrganismos indesejáveis (bactérias patogênicas e putrefativas), mantendo a microbiota intestinal saudável. Esta manutenção do equilíbrio da microbiota intestinal traz benefícios ao organismo, uma vez que, o crescimento desregulado desta microbiota deixa o organismo suscetível a doenças devido a alterações da resposta imunológica. Este desequilíbrio pode ocorrer por diferentes motivos, sendo o mais comum a utilização de antibióticos.

O kefir é considerado um probiótico composto pela associação de vários microrganismos, sendo sua complexidade a principal diferença em relação aos demais produtos probióticos comerciais. O kefir é formado por diferentes bactérias e leveduras, as quais podem ter sua composição relativa alterada em função de diferentes fatores. A grande simbiose torna difícil o isolamento dos diferentes microrganismos, sendo necessárias técnicas moleculares para seu estudo.

Devido às suas propriedades sensoriais parecidas a um iogurte e de relatos e estudos associados aos efeitos benéficos à saúde humana, ocorreu um crescimento no consumo de kefir, não apenas no Brasil, mas em outros locais do mundo. Porém, poucos são os países que realizam a produção industrial e comercialização com um controle da qualidade em relação à composição do produto.

No Brasil o kefir, em geral, é popularmente doado em pequenas porções denominadas de “mudas”, de maneira bem rudimentar, dentro de potes de vidro e/ou plástico, sem que haja nenhum cuidado especial. As pessoas que recebem a “muda” simplesmente começam a criar o kefir, e para este cultivo se faz necessária a troca diária do leite ou água com açúcar. O produto (água ou leite) fermentado por sua vez é consumido puro ou em misturas com frutas, ou até mesmo utilizado em receitas mais elaboradas.

Devido a esta estratégia de repasse do kefir, muitas vezes o produto é exposto a alterações de temperatura durante o transporte. Certas doações podem ser feitas por meio de correio e o material doado é mantido quase seco é transportado em envelopes plásticos pelo correio. Em alguns casos congelam-se as “mudas” seja para uma posterior doação ou para uma retomada de cultivo em momento posterior. Neste contexto, podemos acreditar que o material possa sofrer alguma alteração.

Com esta diversidade de possíveis ocorrências na rotina de repasse, este trabalho teve como propósito identificar a presença de certos microrganismos e avaliar o comportamento destes microrganismos considerados importantes na composição do kefir, após exposição a condições de calor, frio intenso e simulação de acondicionamento para transporte, as quais podem ocorrer devido a rotina do repasse do mesmo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a composição e concentração da microbiota de grãos de kefir de leite e de água, bem como investigar possíveis efeitos de tempo e de alterações de temperatura, por meio de técnicas moleculares e ação de atividade antimicrobiana do fermentado de kefir.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os grãos de kefir quanto à presença das bactérias *L. kefir*, *L. parakefir*, *L. kefiranofaciens*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, utilizando primers específicos pela técnica de PCR simples.
- Monitorar as possíveis mudanças na composição e concentração da microbiota após serem submetidas a alterações de aumento e diminuição de temperatura e simulação das condições de acondicionamento para transporte, através da técnica de PCR quantitativa em tempo real.
- Avaliar a atividade antimicrobiana sobre as bactérias Escherichia coli, Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa e o fungo Candida albicans.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O kefir

A história dos alimentos fermentados está perdida na antiguidade. A primeira fermentação, provavelmente, pode ter ocorrido com a estocagem de excedentes de leite, resultando em um produto fermentado no dia seguinte (PRAJAPATI; NAIR, 2008). Atualmente os leites fermentados e iogurtes contendo probióticos são os principais produtos comercializados no mundo com alegação de promover saúde, atendendo a uma crescente demanda de mercado (GALLINDA *et al.*, 2012).

Dentre os diferentes produtos, está o kefir, um produto fermentado, ácido, levemente alcoólico, viscoso, sutilmente carbonatado, produzido artesanalmente a partir de estruturas globosas, que contêm uma população relativamente estável de microrganismos simbióticos, imersos em uma matriz composta de polissacarídeos, proteínas e lipídeos (LEITE *et al*., 2013; MAGALHÃES *et al*., 2011; YOVANOUDI *et al*., 2013;).

Tradicionalmente o kefir é produzido a partir da fermentação do leite de vaca por meio de grão como cultura *starter*, porém outros tipos de leites, tais como cabra, ovelha, égua, búfala e camela também podem ser utilizados, existindo também a possibilidade de fermentação utilizando água e açúcar mascavo (CASSANEGO, 2015).

O kefir é apresentado como uma bebida refrescante, provavelmente originada nas montanhas do Cáucaso, região próxima a Mongólia e Tibet. Segundo a lenda, a bebida foi dada como um presente de Deus aos homens através do Profeta Maomé, e como era transmitido de geração a geração passou a ser chamado de “milho do profeta” (FARNWORTH, 2008; OTLES; CAGINDI, 2003; WESCHENFELDER *et al*., 2011).

Segundo Moreira *et al*. (2008), a palavra kefir, também apresentada como quefir, pode ter sido originada do vocábulo eslavo “keif” que significa “bem-estar” ou “bem-viver”. O produto também é conhecido pelos nomes de kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi e kippi (FARNWORTH, 2005), além de nomes mais antigos como cogumelos tibetanos, plantas de iogurte e cogumelos do iogurte (FARNWORTH, 2008).

Ao serem consumidos regularmente e em quantidades adequadas, fornecem benefícios a saúde do hospedeiro, podendo reduzir o risco de doenças e promovendo o bem-estar (CAPRILES; SILVA; FISBERG, 2005), gerando nas últimas décadas um aumento da popularidade do kefir entre alguns países europeus, sendo difundido em seguida para outras regiões (SANTOS, 2015).

Atualmente ele é consumido regularmente na Argentina, Taiwan, Turquia, Portugal e França (FARNWORTH, 2005). Na Rússia, Canadá, Alemanha e Suécia, este produto já é produzido comercialmente e consumido em quantidades apreciáveis (WESCHENFELDER *et al*., 2011).

Entretanto, em países onde não ocorre a sua comercialização, o kefir é cultivado dentro das casas, para consumo próprio, e é nesta pequena escala de produção que o kefir é hoje conhecido no Brasil. (WESCHENFELDER *et al*., 2013).

Embora não seja tão popular mundialmente como outros produtos lácteos fermentados, o kefir tem apresentado, nos últimos anos, uma expansão de consumo devido principalmente às suas propriedades sensoriais únicas e sua longa história associada aos efeitos benéficos à saúde humana. O kefir é classificado como um alimento funcional probiótico, e muitos o designam como o iogurte do século (LEITE *et al*., 2012; SOTTORIVA *et al*, 2018).

O kefir é considerado ideal para diferentes fases da vida, uma vez que, é um alimento de alta digestibilidade, devido ao alto nível da atividade da enzima beta-galactosidase encontrada no mesmo, reduzindo o teor de lactose na fermentação (AHMED *et al*, 2013).

O kefir, quando comparado ao leite não fermentado, apresenta um valor nutricional consideravelmente maior de aminoácidos como serina, lisina, alanina, treonina, triptofano, valina, metionina, fenilalanina e isoleucina, além de ser rico em componentes minerais, fibras, vitaminas e proteínas (TURKMEN, 2017).

O kefir se destaca em um mundo onde cada vez mais existe uma procura por alimentos com propriedades funcionais que promovam o bem-estar, em especial, que possam prevenir as chamadas doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e alergias alimentares. Estes alimentos diferenciam-se por apresentar distintas funções biológicas, devido à presença de componentes bioativos, capazes de modular a fisiologia do organismo (SANTOS, 2015).

No Brasil, o kefir é um produto popular, passado de pessoa para pessoa, não existindo controle em relação a seu transporte e armazenamento. Por ser considerado um produto probiótico existe grande procura e trânsito de “mudas” em todo o país (ALVES *et al*, 2019; MAGALHÃES *et al*., 2011; MIGUEL, 2009).

Os estudos científicos indicam benefícios na ingestão diária do kefir por pessoas com intolerância à lactose (HERTZLER; CLANCY, 2003), assim como a indução de alívio em problemas de transito intestinal e tratamento de diarreias (ALMEIDA *et al*., 2011), efeito antibacteriano (RODRIGUES *et al*., 2005), diminuição de colesterol no sangue (TAYLOR;

WILLIAMS, 1998), efeitos na inibição do desenvolvimento de câncer (GAO *et al*, 2013), controle da hipertensão (LEE *et al*, 2007), desenvolvimento de atividade antioxidante (GUZEL-SEYDIM, 2011), ação anti-inflamatória (KIM *et al*., 2014; LEE *et al*., 2007; MOREIRA *et al*, 2008; RODRIGUES *et al*., 2005) e atividade antitumoral (KIM *et al*., 2014).

Devido ao seu alto teor de triptofano, cálcio e magnésio o kefir apresenta um efeito relaxante no sistema nervoso. Na sua composição também é possível encontrar minerais, vitamina K e vitaminas do complexo B, as quais promovem regulação das funções renais e hepáticas, além de acelerar processos de cicatrização (ALMEIDA *et al*., 2011; MIGUEL, 2009).

O crescente estudo e utilização do kefir devido suas propriedades funcionais levou não apenas a produção de produtos que passam a fazer parte das prateleiras nos supermercados, como também a sua possibilidade de utilização na produção de etanol, devido a fermentação alcoólica em biorreatores (MIRANDA; PEREIRA ARAÚJO, 2014).

Os grãos de kefir lembram a estrutura de um coral ou pequenos grãos duros aglomerados com aparência de couve-flor (MAGALHÃES, 2011; OTLES; CAGINDI, 2013), que de acordo com Santos (2015) são como massas gelatinosas que podem medir de 3 a 35 mm de diâmetro (Figura 1), de forma irregular, com aspecto de uma couve-flor no kefir de leite e glóbulos isolados no kefir de água e com coloração diferenciada que vai do amarelo esbranquiçado ao quase transparente.

Figura 1 – Amostras de Kefir. Em A) Kefir água e em B) Kefir leite.

Os grãos de kefir são compostos por bactérias ácido-lácticas e leveduras fermentadoras (LEITE *et al*., 2013; YOVANOUDI *et al.*, 2013). Quanto a composição microbiana, esta pode variar em número e espécies de acordo com a fase de fermentação (ácido ou álcool) e as condições ambientais de inoculação, resultando em uma massa ligeiramente azeda, cujos vários

microrganismos, associados simbioticamente, parecem conferir ao alimento propriedades terapêuticas (MOREIRA *et al*., 2008).

Embora tradicionalmente se produza a bebida kefir utilizando leite como substrato para o processo fermentativo, existe a possibilidade de utilização de água e açúcar mascavo. Essa bebida é conhecida como kefir de água ("tibicos ou tibi"), sendo bastante consumida no México (ULLOA *et al*., 1994), apresenta grãos translúcidos e cristalinos (Figura 1A) os quais podem ser colocados para fermentar juntamente com frutos secos e cítricos para incorporar à fermentação minerais adicionais e *flavor* ao produto (PIDOUX *et al*., 1990).

Segundo Gulitza *et al.* (2011), existem duas hipóteses quanto a origem do kefir de água, a primeira é que os soldados que retornavam da guerra poderiam ter trazido grãos de uma região próxima à Ucrânia de volta para a Europa Ocidental, enquanto uma segunda versão afirma uma possível formação espontânea de grãos em pastagens de uma cactácea chamada *Opuntia* sp encontrada no México.

3.2 Composição do kefir

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados define kefir como um leite fermentado, adicionado ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, cuja fermentação se realiza com cultivos ácido-lácticos elaborados com grãos de kefir, contendo *Lactobacillus kefir*, além de outros microrganismos (Brasil, 2007).

Independente do kefir ser de água ou leite, a composição geral é predominantemente de bactérias, sendo as leveduras importantes para o equilíbrio da simbiose, além de participarem da formação das características físico-químicas e sensoriais no contexto geral (CASSANEGO *et al*, 2015; NEVE; HELLER, 2002).

O interesse pela presença dos lactobacilos na dieta humana aumentou desde o início do século XX, quando Elie Metchnikoff, pesquisador no Instituto Pasteur, Paris – promoveu o uso desses microrganismos para a bacterioprofilaxia e bacterioterapia (BURITI; ISAY, 2007).

Considera-se atualmente que a maior parcela da biomassa microbiana do kefir seja formada de bactérias lácticas como *Lactobacillus* e *Lactococcus*, numa proporção entre 65% e 90% respectivamente (ROSA *et al*., 2017; SIMOVA *et al*., 2002). Entretanto, a diversidade microbiana de kefir descrita na literatura varia muito, podendo exceder a 300 espécies em algumas amostras (ROSA *et al*., 2017; VAN WYK, 2019), tendo o número médio variando

entre 30 e 100 diferentes microrganismos (VAN WYK, 2019). Esta composição pode variar de acordo com a localização e tempo de utilização (GHEDINI *et al*., 2020).

De acordo com Magalhães *et al*. (2011), as amostras brasileiras de kefir, no geral, apresentaram diversas espécies de bactérias lácticas do gênero *Lactobacillus* que ficam unidas por uma matriz de proteínas e do polissacarídeo denominado de kefiran. Miguel (2009), analisando amostras de grãos de kefir de leite e de água em diferentes estados brasileiros identificou a presença dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter* e *Acetobacter* e relata uma grande diversidade de espécies entre as localidades estudadas, sendo *Lactobacillus kefir* comum em todas as amostras. Outro fator que ocorre é que no Brasil, é que temos diferentes zonas climáticas que incluem temperaturas frias (estados da região sul), temperaturas médias (estados da região sudeste) e temperaturas quentes (estados do norte e nordeste), isto pode levar a diferenças na composição do kefir dependendo do local do desenvolvimento, pois segundo o autor, Miguel (2009), estudos mostram que ocorreu uma adaptação dos grãos de kefir de leite e água nas diferentes áreas durante o processo de propagação contínua, onde fatores como clima, ambiente e métodos de cultivo das populações microbianas impactaram o cultivo de diferentes maneiras, o que pode fornecer para cada região personagens diferentes nessa microbiota.

Uma vez que, existem diferenças entre a microbiota de kefir de diferentes origens, tempo de cultivo e o substrato que é empregado na sua produção, assim como as técnicas para crescimento e a higiene empregadas na manipulação diária, é de se esperar que exista uma diferença também em relação à composição de proteínas e outros componentes, pois o kefir como um todo é resultado metabólico de vários tipos de micro-organismos (MAGALHÃES *et al*., 2011).

Torna-se claro em literatura, que o kefir, por sua vez, apresenta uma larga composição de diferentes bactérias, formando uma microbiota complexa. Estudos de diferentes países mostram que a principal composição do kefir é dada pelas bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *Lactobacillus parakefir* e *Lactobacillus plantarum* (MAGALHÃES *et al*., 2011; MIGUEL, 2009; NEJATI *et al*., 2020; ROSA *et al*, 2017; SIMOVA *et al*, 2002; VAN WYK, 2019), além de representantes dos gêneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* (BRASIL, 2007).

O microrganismo *Lactobacillus kefiranofaciens* é identificado como o principal responsável na produção do polissacarídeo kefiran, seguido pelo *Lactobacillus kefir* presente

em quantidades menores (FUJISAWA *et al*, 1988). Os microrganismos *Lactobacillus kefir* e *Lactobacillus parakefiri* aparecem em diversos estudos que avaliam a composição do kefir (FUJISAWA *et al*, 1988; NEJATI *et al*., 2020; ROSA *et al*, 2017; VAN WYK, 2019), sendo considerados de grande importância para a classificação do fermentado.

3.3 As bactérias Firmicutes e Bacteroidetes

O filo *Bacteroidetes* se caracteriza como sendo formado principalmente por bactérias gram-negativas (DURÇO; MAYNARD, 2018). Segundo Koneman (2012), estima-se que o filo seja formado por 60 espécies, distribuídas entre as classes *Bacteroides*, *Flavobactérias* e *Sphingobacteria*. Já o filo *Firmicutes*, ao contrário do *Bacteroidetes* é representado por uma maioria de bactérias gram-positivas (PISTELLI, COSTA, 2010). O filo é representado pelas classes *Bacili*, *Clostridia* e *Mollicutes*, compreende 274 gêneros de bactérias e conta com uma média de 100 espécies como representantes (FURUHASHI *et al*., 2007).

Nos últimos anos, a obesidade tem sido caracterizada por um aglomerado de várias doenças metabólicas, e por inflamação de baixo grau (ISMAEL *et al*, 2011). A interação entre microbiota e permeabilidade intestinal tem sido objeto de estudo, quando relacionada ao desenvolvimento não apenas da obesidade, como também de suas comorbidades (OLIVEIRA; HAMMES, 2016). As bactérias dos Filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, por serem as mais frequentes, vem sendo consideradas importantes para a manutenção do metabolismo do organismo, podendo sua disrupção interferir na qualidade da saúde dos indivíduos (KIM *et al*, 2015; LEITE *et al*, 2013).

Ao longo da vida, a composição da microbiota pode sofrer variações. Os microrganismos que habitam o intestino dependem essencialmente da interação da criança com o ambiente, nos primeiros anos de vida. A partir dos 3 anos de idade, a microbiota intestinal apresenta semelhança importante com aquela observada nos indivíduos adultos, onde se apresenta relativamente estável, sendo difícil a colonização por um micro-organismo não autóctone (OLIVEIRA; HAMMES, 2016).

As bactérias do filo *Bacteroidetes* são normalmente predominantes no intestino humano e por suas características fermentativas podem modular o sistema imune intestinal de forma benéfica (DURÇO; MAYNARD, 2018; MARIAT *et al*., 2009). Em estudo, observaram que indivíduos obesos apresentam uma razão *Firmicutes/Bacteroidetes* maior que a encontrada em indivíduos magros (ISMAEL *et al*, 2011; LEY *et al*, 2006) enquanto outros estudos não

mostram nenhuma alteração (TURNBAUGH, 2008). Outro fator é que os Firmicutes apresentam espécies relacionadas a indução de inflamação, que estão diretamente associados a algumas doenças crônicas intestinais (PISTELLI, COSTA, 2010).

O papel destas bactérias na homeostase se dá principalmente em relação à proporção entre elas (MARIAT *et al*., 2009). A importância desta proporção é destacada no estudo de Andrade *et al.* (2014) onde mostraram que a maior prevalência de *Firmicutes* em relação a *Bacteroidetes* leva a obesidade nos humanos, porém os autores ressaltam que existe a necessidade de maiores estudos, assim como, sua relação com a alimentação que tenha como base os probióticos, visto que Turnbaugh *et al*. (2008) relata ser possível até um visível aumento de *Bacteroidetes* em indivíduos com obesidade, demonstrando a necessidade de mais estudos sobre essa relação.

Schwiertz *et al* (2010), associaram a obesidade à composição da microbiota humana e à produção de ácidos graxos de cadeia curta. No estudo, 30 pessoas estavam classificadas como peso normal, 35 delas estavam com sobrepeso e 33 eram obesos. Os resultados mostraram que os filos *Firmicutes* e *Bacteroides* foram os grupos bacterianos mais abundantes nas fezes das pessoas analisadas. Kim *et al*. (2015) apresentaram resultados que mostram existir relação entre o balanceamento positivo entre as proporções de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* na microbiota intestinal de camundongos após a ingestão diária de kefir por três semanas quando comparados ao controle, sugerindo que a administração oral de kefir pode ser benéfica para os organismos.

Em outro estudo, a administração de kefir mudou com sucesso a microbiota intestinal, enriquecendo o ambiente intestinal com microrganismos de kefir. Em particular, o aumento da população de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Candida*, diminuindo uma inflamação sistêmica e os níveis de colesterol, fornecendo dados que pareciam promover a melhora da obesidade e de lesões hepáticas nos camundongos (KIM *et al*, 2017).

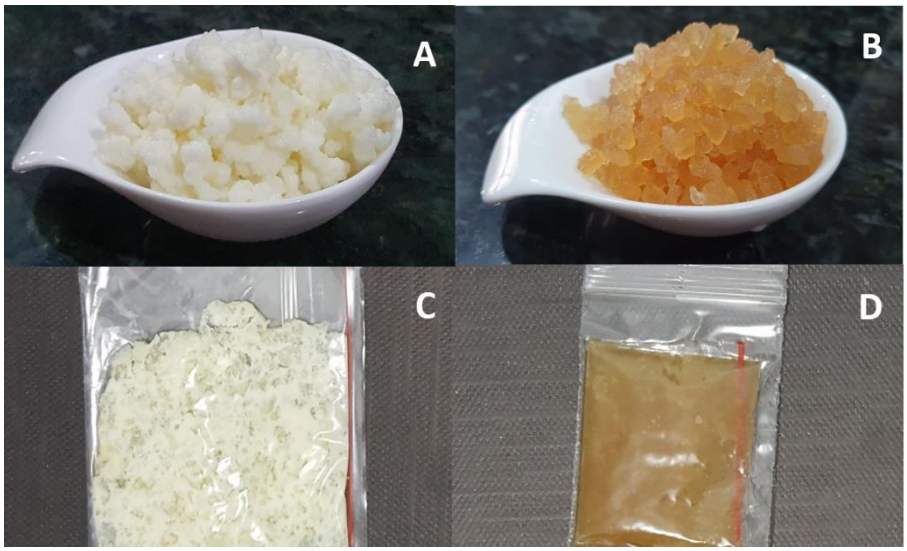
Embora exista grande ligação entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* com a microbiota intestinal, estas estão presentes também em diversos outros microambientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras

As amostras de Grãos de kefir foram adquiridas por meio de doação tradicional, na cidade de Sorocaba no estado de São Paulo (SP) (Figura 2A e 2B). Tanto a amostra de kefir de leite como a kefir de água vieram em recipientes de vidro, na quantidade de aproximadamente 15 gramas (1 colher de sopa) envoltos em leite e água, respectivamente. As demais amostras são procedentes da cidade de Ponta Grossa, no Paraná (PR), adquiridas através da empresa Kefir Brasil Probióticos Vivos. As amostras chegaram acondicionadas em embalagens plásticas tipo *ziplock*, também na quantidade aproximada de 15 g (Figura 2C e 2D), porém quase que totalmente secas. Calcula-se que, contando da data da postagem na cidade de Ponta Grossa até a chegada do material na cidade de Sorocaba, os grãos de kefir permaneceram cerca de 10 dias dentro das embalagens plásticas em trânsito pelo correio.

Figura 2 - Amostras de kefir de leite e de água provenientes de diferentes regiões, sendo A: kefir leite obtido por doação (Sorocaba-SP); B: kefir água obtido por doação (Sorocaba-SP); C: kefir leite adquirido da empresa (Ponta Grossa – PR); D: kefir água adquirido da empresa (Ponta Grossa – PR).



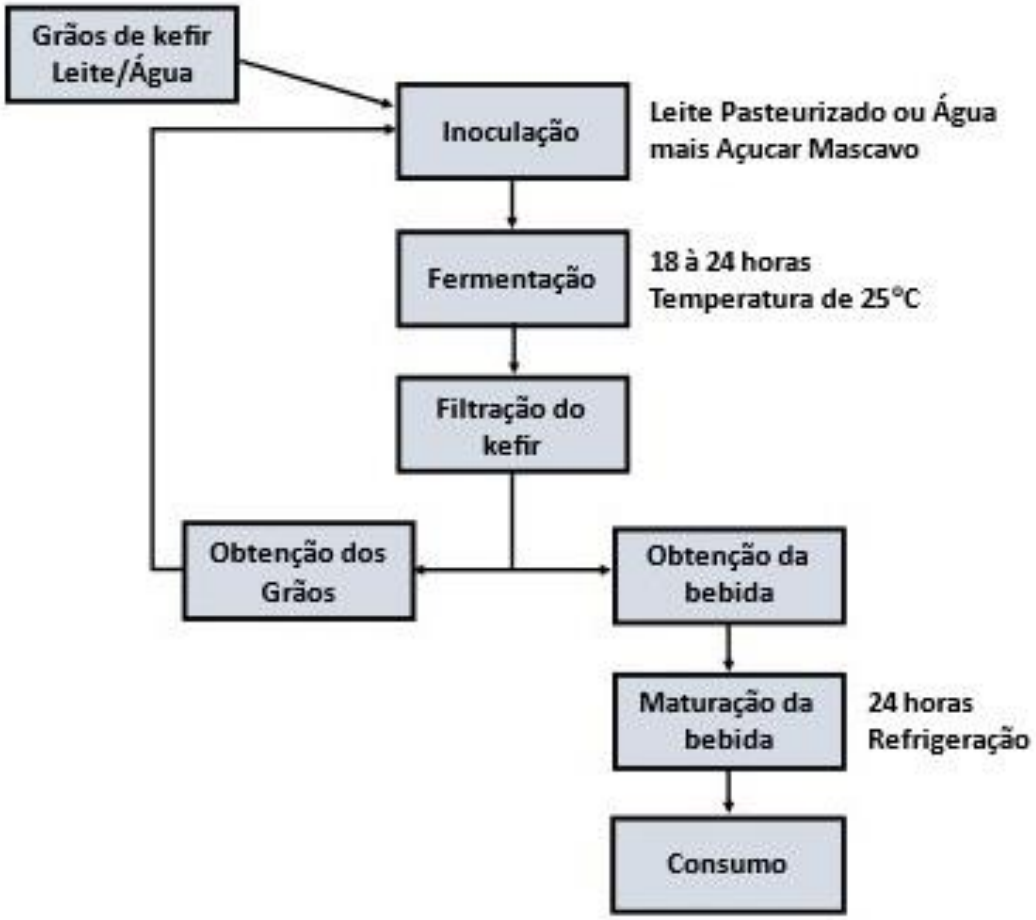
Fonte: Elaboração própria

4.2 Tratamento das amostras

Após a chegada das amostras, elas foram ativadas, acondicionando em recipientes de vidros esterilizados. Utilizou-se de 15g da massa de grãos de kefir para 300 mL de líquido, sendo utilizado de leite pasteurizado integral para o kefir de leite e água filtrada com açúcar

mascavo, numa proporção de 5%, para o kefir de água (MIGUEL, 2009). A mistura foi incubada a temperatura ambiente (± 25Cº) em local fresco ao abrigo de luz por 24 horas. Na sequência, a mistura foi filtrada em peneira de plástico e a parte liquida descartada, os grãos de kefir foram resgatados e reutilizados, repetindo-se o mesmo procedimento dando continuidade ao experimento (Figura 3).

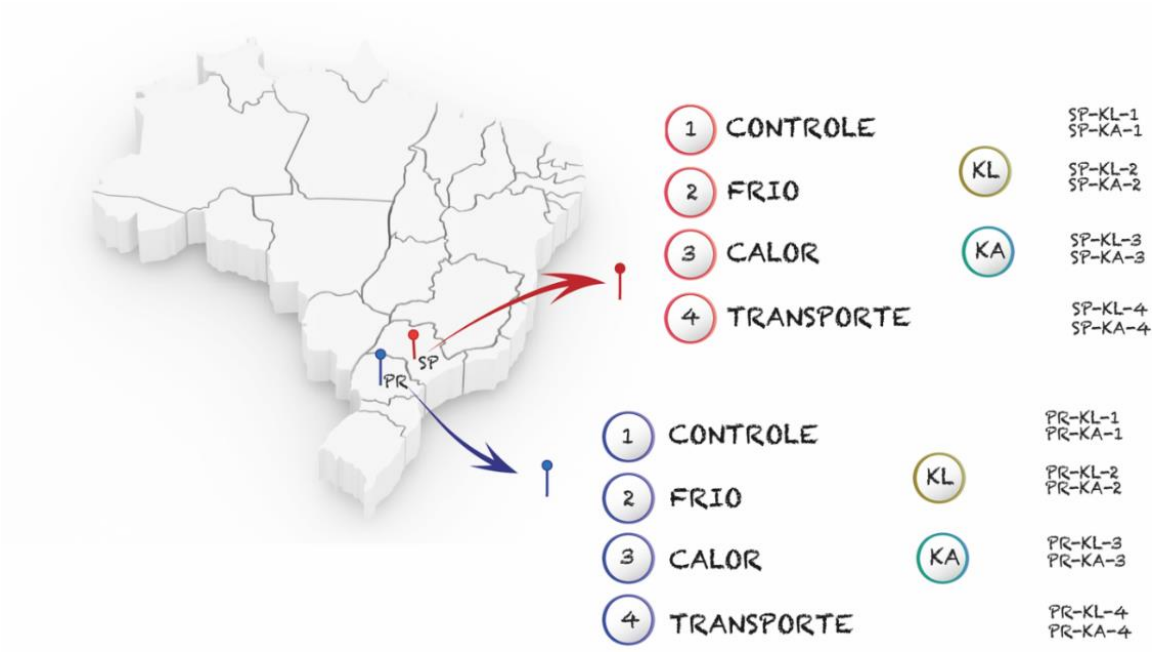
Figura 3 - Método tradicional de produção de bebida fermentada com uso de grãos de kefir.



Fonte: Elaboração própria.

Após 30 dias de fermentação e estabilização o estudo foi inicializado, sendo as amostras subdivididas e expostas em diferentes condições (Figura 4).

Figura 4 - Esquema mostrando a distribuição das amostras conforme a exposição a que foram submetidas no estudo.



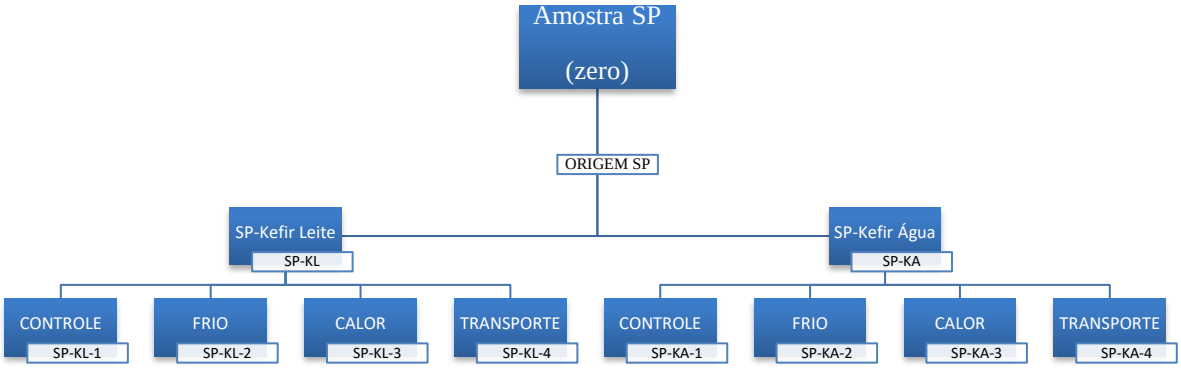
Fonte: Elaboração própria

As amostras controles foram coletadas pela primeira vez, antes da exposição aos diferentes procedimentos e colocadas a -80^{0}C para futura análise de DNA, sendo esta a coleta zero de todas as amostras.

Logo, cada amostra foi dividida em quatro, destas uma continuou no procedimento de fermentação normalmente (amostras denominadas 1), as amostras denominadas 2 foram congeladas, as amostras denominadas 3 foram aquecidas, e as amostras denominadas 4 ficaram embaladas para simular o transporte de envio entre as cidades (Figura 5).

Em relação as exposições, foram seguidos os seguintes procedimentos: para a exposição ao frio, 15g do material inicial foi acondicionado em tubo tipo *falcon* e levado em freezer (-20°C pelo período de dois dias; o mesmo procedimento foi realizado para o tratamento de calor, sendo os 15g do material, levado para estufa a 39ºC. pelos mesmos dois dias; as amostras que simularam transporte foram acondicionadas em embalagem plástica tipo *ziplock* e dentro de envelopes de papel pardo e deixadas em temperatura ambiente por 10 dias.

Figura 5 - Esquema exemplificando os procedimentos realizados com cada amostra (esquema simulando as amostras contando apenas o material provenientes de Sorocaba-SP)



Fonte: Elaboração própria

Após finalização de cada exposição testada (calor, frio e acondicionamento), cada amostras foi novamente colocada para crescimento/fermentação. O primeiro dia pós exposição foi denominado de dia 1. Passados 20 dias do dia 1 realizou-se uma nova coleta de 15g de cada amostra, estas foram acondicionadas a -80ºC até o momento da extração do DNA. O mesmo ocorreu para a mostra denominada de controle.

4.3 Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras de kefir foram realizadas utilizando o kit *Power Soil® DNA Isolation Kit* (MoBio Laboratories), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante e as amostras de DNA foram mantidas a -80°C.

4.4 Avaliação qualitativa dos grãos de kefir por PCR simples

Para as análises de PCR foram utilizados primers específicos para as bactérias *L. kefiri*, *L. paraquefiri*, *L. kefiranofaciens*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, estas foram escolhidas devido sua importância dentro da microbiota do kefir. As reações foram realizadas em um volume final

de 25 µL, contendo: 2,5 µL de buffer 10x, 0,5 µL de DNTP (10 mM), 0,75 µL de MgCl (50 mM), 1,25 µL de cada primer, 0,3 µL de Taq polimerase e quantidade de água ultrapura para completar 25 µL. As condições utilizadas para a amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, em seguida 30 ciclos sequentes de 95°C por 45 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, e incubação final a 72°C por 10 minutos. Os resultados foram avaliados utilizando eletroforese, com gel de agarose a 1,5% (Quadro 1).

Quadro 1 – Primers utilizados para a quantificação de genes específicos no PCR simples e no qPCR.

Gene	*Primers*	Sequência – 5'3'	Pb	Referência
16SrRNA	341F 534R	CCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGGCA	193	WATANABE *et al*., 2001
L. kefir	LKF LKR	CAAACCAACGACTTGAAGAAG CAAGCTTTTGGCGTTGATCG	187	TANIZA, W.A., 2017
L. paraquefir	LPKF LPKR	AGACCAGCGACTTAAAGGCA CCAACGTTTCTCGATGATTC	186	TANIZA, W.A., 2017
L. kefiranofaciens	LKF_KU504F LKFJCU504R	CAGTTCGCATGAACAGCTTTTAA GCACCGCGGGTCCAT	64	DONG-HYEON *et al*., 2015
Firmicutes	Firm934F Firm1060R	GGAGYATGTCCTTTAATTCGAAGCA AGCTGACGACAACCATGCAC	126	GUO *et al*., 2008
Bacteroidetes	Bac934F Bac1060R	GGARCATGTTGGTTTAATTCGATGAT AGTTGACGACAACCATGCAG	126	GUO *et al*., 2008

4.5 Avaliação molecular quantitativa relativa por qPCR

A quantificação bacteriana foi realizada utilizando a técnica de PCR em tempo real (qPCR). Para a quantificação foram realizadas análises quantitativas relativas de genes específicos relacionados ao produto determinado popularmente como kefir. O gene bacteriano 16SrRNA foi utilizado como gene controle (referência) para avaliar as *L. kefir*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Quadro 1).

As reações foram realizadas em duplicata no equipamento termociclador *StepOne SYSTEM*. A reação de pPCR teve volume final de 25 µL contendo: 12,5 µL de Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen); 1 µL de primer sense; 1 µL de primer anti-sense; 1 µL do *template* e quantidade de água ultrapura autoclavada para completar o volume final de 25 µL.

As condições utilizadas para a amplificação foram descritas por Watanabe et al., 2001, Taniza, W.A., 2017 e Guo et al., 2008; consistindo em desnaturação inicial a 95°C durante 10 minutos, acompanhado de 40 ciclos sequentes de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 72°C por 45 segundos. No final de cada incubação a 72°C foi medida a fluorescência.

Para cada análise foram realizadas curvas de calibração utilizando as diluições seriadas do DNA (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000). Para curva padrão, o software procura o melhor ajuste entre os pontos, calcula a regressão linear e fornece o R2, o *slope* (inclinação da curva) e o y *intercept*. O R^2 mede o quão próximo é o ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais de CT das amostras padrão (um valor de 1 indica um ajuste perfeito entre a regressão linear e os dados individuais). A inclinação indica a eficiência de amplificação para o ensaio (um valor de -3,32 representa uma eficiência de 100%), e o y interseção indica o valor esperado de CT para uma amostra com quantidade 1. Utilizando-se a inclinação, pôde-se calcular a eficiência de cada reação, por meio da fórmula:

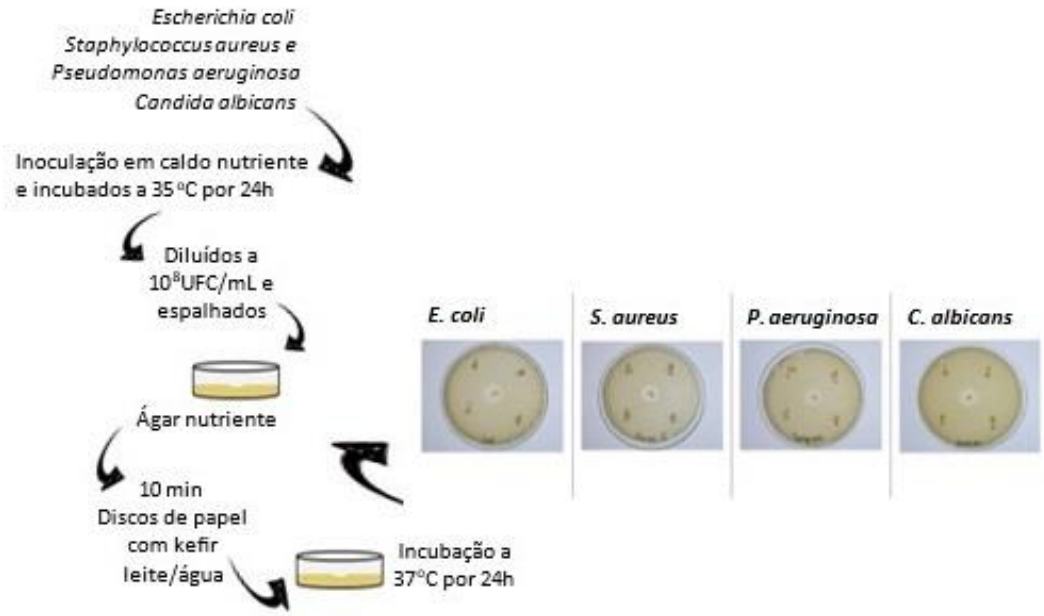
$$\mathrm{E} = 10\,(-1/\text{inclinação}) - 1.$$

O método utilizado para quantificação dos resultados foi a quantificação relativa utilizando-se o cálculo de $\mathbf{2}^{-\Delta\Delta Ct}$. Este é frequentemente utilizado para quantificação relativa, pois possibilita o cálculo da dosagem sem a necessidade de realização de curva padrão, o que se torna possível a partir do momento que o método assumir que as eficiências das reações são iguais. Para que seja realizada a quantificação relativa utilizando $\mathbf{2}^{-\Delta\Delta Ct}$, é necessário um controle endógeno, neste trabalho o gene *Bacterial 16SRNA*.

4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de disco de difusão

Para o teste, as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Candida albicans* foram inoculados em caldo nutriente e incubados a 35°C por 24 h, depois foram diluídos a uma concentração de 10^8 UFC/mL e espalhadas com *swab* em placas contendo ágar nutriente. Após 10 minutos, foram adicionados discos de papel filtro contendo amostras controle de kefir de leite e de água provenientes da cidade de Sorocaba e de Ponta Grossa no centro da placa. As placas foram preparadas em triplicata incubadas a 37 °C por 24 h, quando foi analisado a presença de halo. Como controle, foi utilizado um disco contendo penicilina-estreptomicina 0.1 mg/mL (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de disco de difusão.



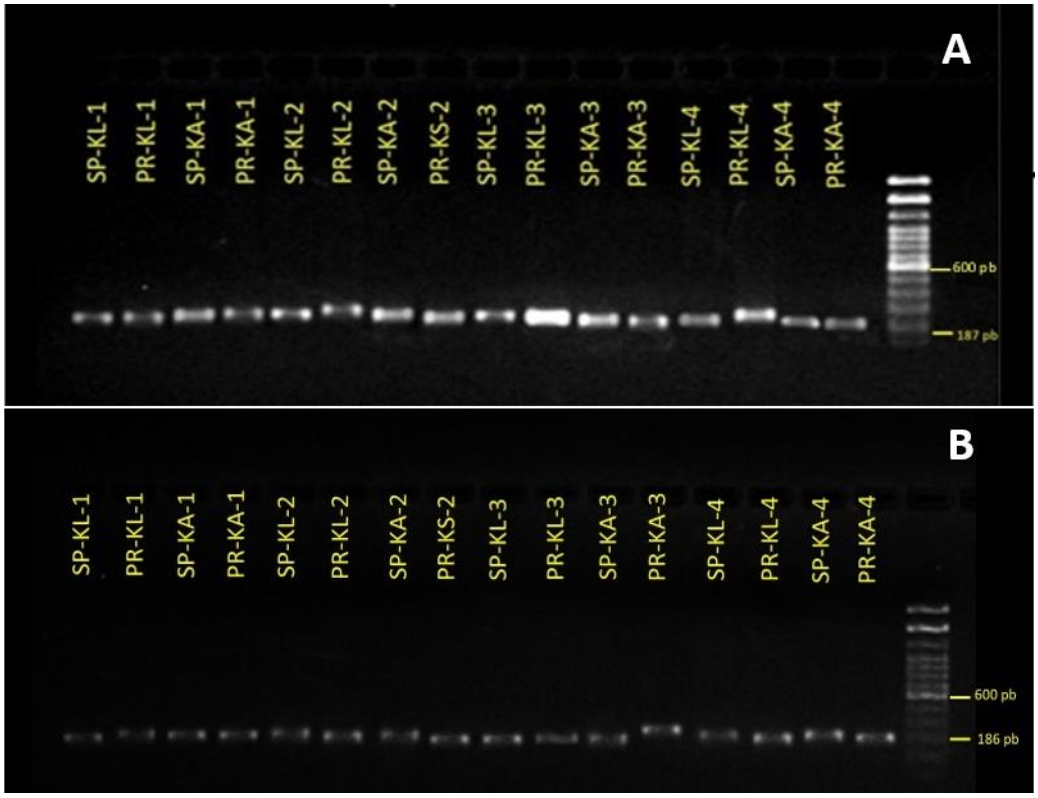
Fonte: Elaboração própria

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise molecular qualitativa dos grãos de kefir por PCR simples

Os resultados das análises moleculares comprovaram presença de DNA referente às bactérias *L. kefir* com 187 pares de bases (Figura 7A) e *L. parakefir* com 186 pares (Figura 7B) em todas as amostras, sendo estas duas bactérias, as mais citadas na literatura (NEJATI *et al*., 2020; ROSA *et al*, 2017; VAN WYK, 2019). Alguns autores apresentam o *L. kefir* um dos principais microrganismos utilizados atualmente pela indústria para a produção de alguns produtos comercializados como kefir (BOURRIE *et al.* 2016; NEJATI *et al.*, 2020; ROSA *et al.* 2017).

Figura 7 – Gel agarose 1,5% das análises de PCR simples para bactérias *L kefir* (A) e *L. paraquefir* (B)



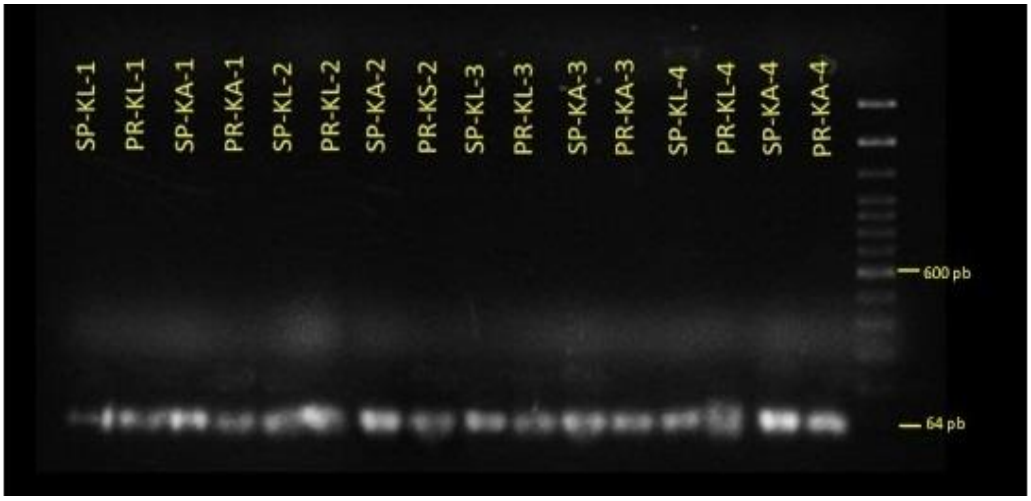
Fonte: Elaboração própria

Como ilustrado na Figura 8, o DNA do microrganismo *L. kefiranofaciens* que apresenta 64 pares de bases, também foi encontrado na formação dos grãos de kefir de todas as amostras. Este microrganismo tem sido estudado devido ser o principal responsável pela produção do kefiran, um exopolisacarídeo produzido por microrganismos presentes nos grãos de kefir e

empregado nos últimos tempos como espessante, estabilizador, emulsificante, substituto de gordura e agente gelificante, além de apresentar propriedade antitumoral e anti-inflamatória e que é citado como o regulador dos níveis bacterianos que caracterizam o kefir (AHMED *et al*., 2013; CHEN *et al*., 2012).

De acordo com Kim *et al*. (2015), a identificação de *L. kefiranofaciens* em grãos de kefir através do emprego de métodos de cultura demonstrou-se complicado, devido a alta afinidade desta bactéria junto aos componentes da matriz do grão e sua estrita características anaeróbicas e requisitos de crescimento exigentes.

Figura 8 - Gel agarose 1,5% das análises de PCR simples para bactérias *L kefiriranofaciens*

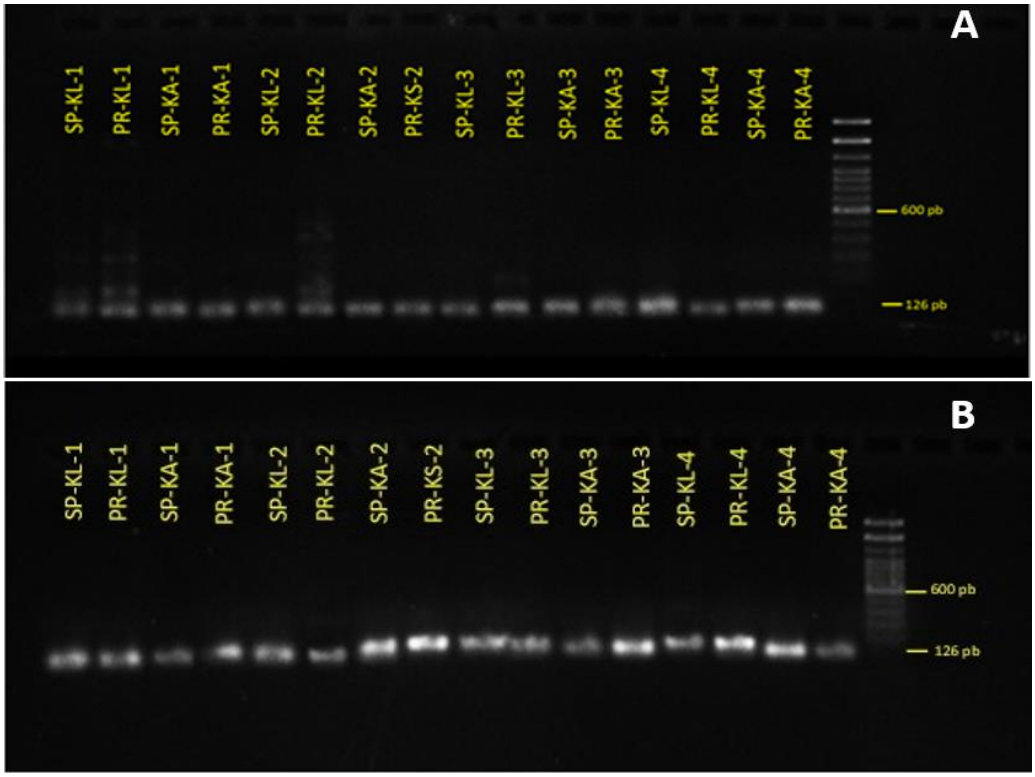


Fonte: Elaboração própria

Ainda, por PCR simples, foi verificado a presença de *Firmicutes* (Figura 9A) e *Bacteroidetes* (Figura 9B), ambos com 126 pares de bases, na composição de todas as amostras de kefir. Além de serem encontrados em toda a natureza, estes dois microrganismos vêm sendo amplamente estudados nos últimos tempos, com ênfase na sua modulação na microbiota intestinal, que pode promover um melhor estado de saúde ou não aos indivíduos (DURÇO, 2018). Chol *et al*. (2017) investigou o efeito inibitório da administração de kefir em pó sobre o acúmulo de gordura em tecidos adiposo e hepático de camundongos obesos, tendo como resposta uma redução do peso corpóreo e de diâmetro dos adipócitos dos camundongos. Estudo baseado na administração periódica de kefir de leite do Tibet em ratos alimentados com microflora fecal de uma pessoa obesa saudável, demonstrou após oito semanas, uma redução da massa de gordura abdominal e resultado positivo no equilíbrio da microbiota intestinal destes

animais (GAO *et al*., 2019). Castaneda Guillot (2020), relata sobre a participação da microbiota intestinal como fator para controle de obesidade e que a modulação dela por parabióticos, probióticos e outras ações terapêuticas podem ser empregadas como possíveis armas para ações preventivas a serem desenvolvidas no futuro.

Figura 9 - Gel agarose 1,5% das análises de PCR simples para representantes do filo Firmicutes (A) e Bacteroidetes (B)



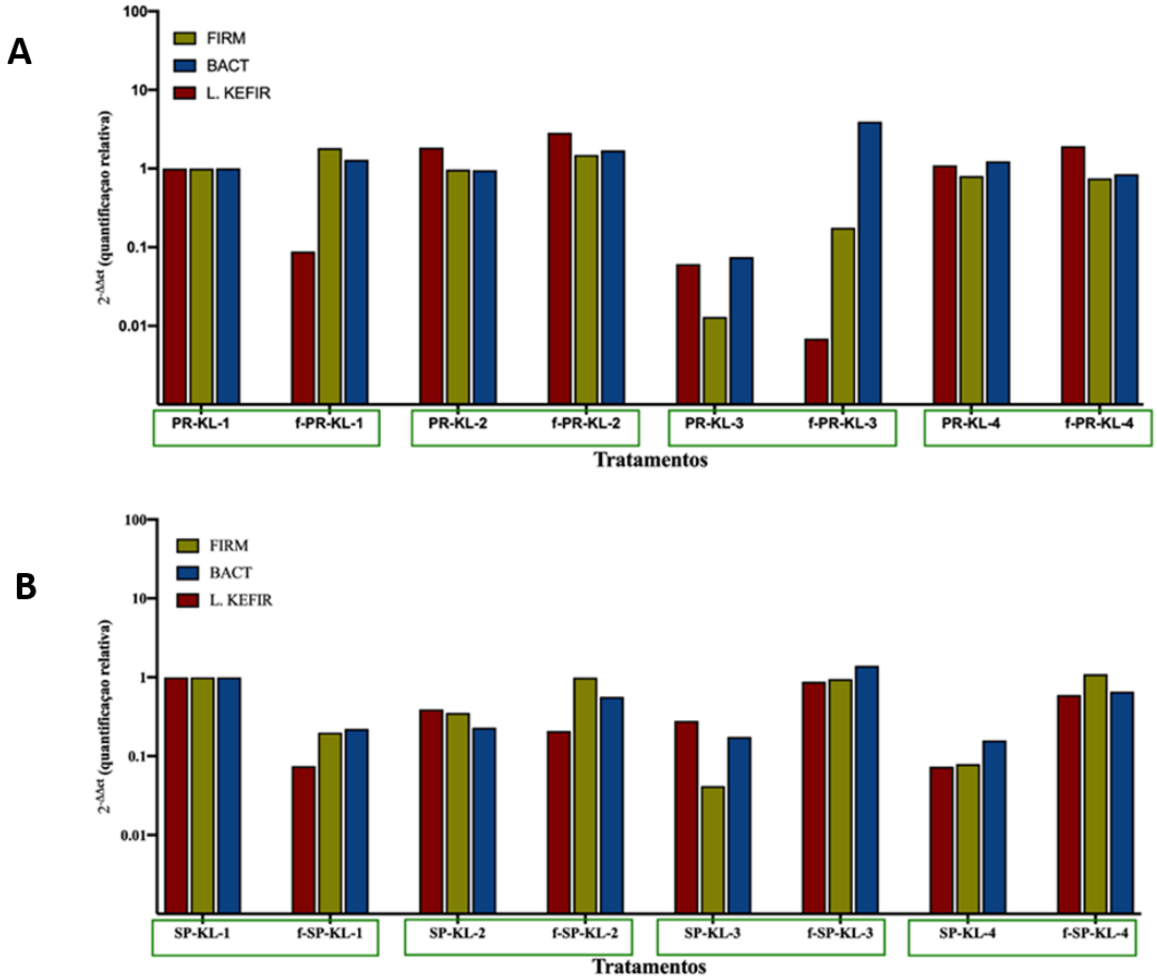
Fonte: Elaboração própria.

5.2 Análise molecular quantitativa relativa por qPCR

Para as análises e comparações quantitativas, as amostras PR KL-1 e SP KL-1 foram utilizadas como referência, uma vez que, são os controles onde os grãos não passaram por nenhuma exposição, sendo a fermentação continua realizada da maneira tradicional.

As análises quantitativas das amostras de kefir de leite mostraram que a bactéria *L. kefir* apresentou uma flutuação na sua quantidade de acordo com a exposição a qual a amostra foi submetida, assim como, em relação ao cultivo ao longo do tempo. Este comportamento seria um indicativo de que alterações de temperatura e o manuseio diário podem levar a alterações do produto (Figura 10).

Figura 10 - Análises de quantificação relativa referente as bactérias *L. kefir*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. As amostras analisadas são de kefir leite (KL), onde o gráfico A refere-se ao material procedente de Ponta Grossa, no Paraná (PR), enquanto o gráfico B refere-se às amostras de Sorocaba, São Paulo (SP). A letra (f) colocada antes de cada sigla indica a amostra final coletada, que passou 30 dias sendo cultivada. A marcação numeral (1) refere-se ao controle, (2) refere-se à exposição ao frio, (3) refere-se à exposição ao calor e (4) refere-se ao material embalado para transporte. Todas as diferenças observadas são consideradas significativas, devido a análise estatística do programa.



Fonte: Elaboração própria

Em relação as alterações apresentadas ao longo do tempo (Figura 10), é possível observar que esta ocorre até mesmo entre os controles iniciais e finais (PR-KL-1/f-PR-KL-1; SP-KL-1/f-SP-KL-1), mostrando que a oscilação neste grupo pode ser um fator comum, desde que este fique dentro de uma variação média, a qual mantenha estabilidade do todo. Estudos mostram que existe uma flutuação em relação aos tipos de bactérias presentes em cada fase do kefir, sendo que, inicialmente existe a multiplicação das espécies de *Lactococcus*, as quais

aumentam a acidez do fermentado, facilitando a introdução e reprodução de *Lactobacillus* (SANTOS, 2008). Esta alteração também é abordada por Dobson *et al*. (2011), onde relata a não uniformidade de microrganismos entre amostras starter de fermentação e amostras de grãos de kefir ao final do curso de fermentação.

Também é possível observar que as amostras provenientes do Paraná, que foram submetidas ao tratamento de calor (PR-KL-3) (Figura 10A), foram as que apresentaram a menor quantidade das bactérias avaliadas, não existido a recuperação de *L. kefir* após 30 dias de cultura. Isso não foi observado nas amostras SP-KL-3, a qual apresentou boa recuperação após 30 dias de cultura. Outro fato interessante foi em relação as *Firmicutes* e *Bacteroidetes* que foram encontradas em quase todas as amostras em uma quantidade semelhante ou superior se comparada aos níveis de *L. kefir* (Figura 10A e 10B).

Vale ainda ressaltar, um ligeiro aumento acima do valor controle observado de *L.kefir* ao final do período de cultivo de 30 dias nas amostras do Paraná submetidas ao tratamento de frio e nas que foram empacotadas para transporte, fato não observado nas amostras de São Paulo. Podemos evidenciar um possível controle nestas amostras visto que são comercializadas e padronizadas para envio para várias localidades, diferentes das amostras de São Paulo, que são doadas de forma mais tradicional.

Poucos estudos tratam da quantificação de bactérias presentes em amostras de kefir, logo, mais estudos são necessários para se determinar o comportamento destes microrganismos no grupo. Porém uma observação, neste trabalho, é que mesmo sofrendo alterações é possível notar a estabilização das amostras ao longo do tempo, o que provavelmente pode impedir a contaminação desta associação simbiótica ao longo do tempo.

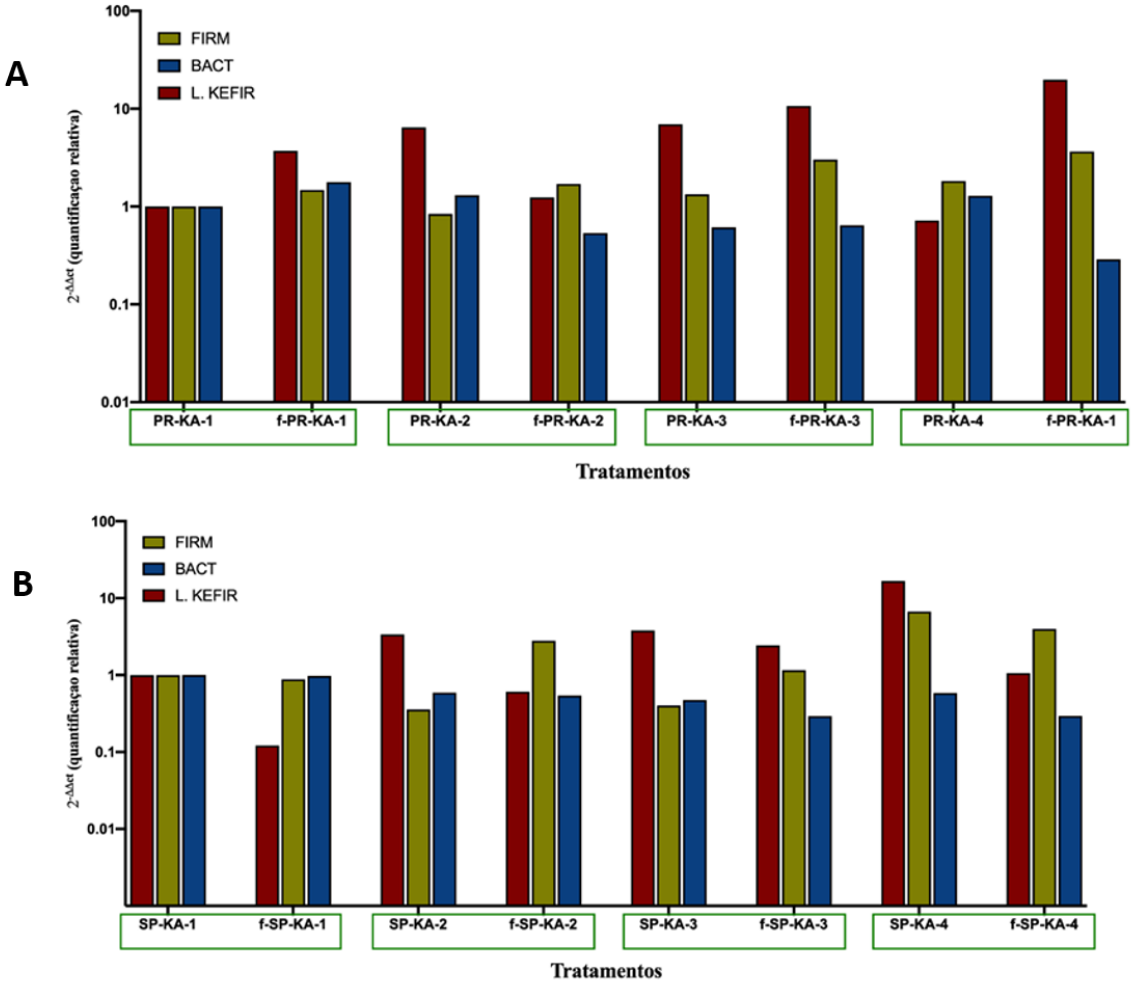
Um pouco diferente das amostras de kefir leite, as amostras de kefir água (Figuras 11A e 11B) não apresentaram flutuação tão expressiva em relação ao *L. kefir*. Estas amostras se mostraram mais estáveis quando expostas a calor, frio e empacotamento para transporte com relação a uma diminuição da quantificação; até mesmo apresentaram uma quantificação maior ao final do período de cultivo de 30 dias, em relação ao controle inicial. Fato esse que corrobora a ideia de estabilidade e simbiose entre os microrganismos de kefir.

O chamado kefir de água, mostra uma morfologia e composição microbiológica um pouco diferente do kefir de leite como abordado por Miguel (2009). Porém a literatura é muito controversa quando se trata de uma real identificação de todos os microrganismos presentes em amostras de kefir de leite, e mais escassa ainda quando se trata de amostras de kefir de água. Vários estudos relatam a presença de um número entre 50 e 60 espécies diferentes de

microrganismos na composição de kefir (VAN WYK, 2019), já outros apontam que dependendo da localidade e das condições de cultivo, certas amostras podem passar de 300 espécies de microrganismos (ROSA *et al.*, 2017).

Neste estudo foi possível observar, durante o cultivo diário, que as amostras de kefir de água demonstraram crescimento de massa/volume dos grãos mais acelerado e uma maior estabilidade quando comparadas as amostras de kefir de leite, facilitando a doação de mudas e permanência do cultivo, logo podemos supor que essa diferença microbiológica pode influenciar na estabilidade das amostras.

Figura 11 - Análises de quantificação relativa referente as bactérias *L. kefir*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*. As amostras analisadas são de kefir água (KA), onde o gráfico A refere-se ao material procedente de Ponta Grossa, no Paraná (PR), enquanto o gráfico B é referente às amostras de Sorocaba, São Paulo (SP). A letra (f) colocada antes de cada sigla indica a amostra final coletada, que passou 30 dias sendo cultivada. A marcação numeral 1 refere-se ao controle, 2 refere-se à exposição ao frio, 3 refere-se à exposição ao calor e 4 refere-se ao material embalado para transporte. Todas as diferenças observadas são consideradas significativas, devido a análise estatística do programa.



Fonte: Elaboração própria

Em relação aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* sabe-se que uma alteração na modulação entre a proporção dos mesmos na microbiota intestinal pode ser o fator desencadeador de obesidade. Mariat el al. (2009), relata que estudos mostram que quanto maior a quantidade de *Firmicutes* maior a chances de desenvolvimento da obesidade.

A diminuição da concentração de *Firmicutes* e aumento de *Bacteroidetes* já foi relacionada a ingestão de kefir e consequente diminuição de peso, sendo possível associar que a presença destes no kefir possam ajudar no restabelecimento do equilíbrio necessário na microbiota intestinal (KIM *et al.*, 2015).

Os estudos encontrados sobre *Firmicutes* e *Bacteroidetes* estão relacionados a visão desta modulação na microbiota e não em relação à presença e quantidades delas no kefir e as ações promovidas de acordo com sua ingestão.

Nas avaliações de quantificação de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* por qPCR é possível observar uma sutil variação entre a ação dos tratamentos e o tempo de cultivo em kefir de leite (Figura 10), sendo importante ressaltar que o tratamento de calor (PR-KL-3 / f-PR-KL-3) (Figura 10A) apresentaram uma queda relevante logo após o tratamento, com uma posterior estabilização dos *Bacteroidetes* em relação ao controle, inclusive sobressaindo sobre este. As amostras de São Paulo (Figura 10B), mostraram queda em quantificação após o tratamento, retomando um crescimento ao longo do tempo de cultivo.

Nas análises de quantificação de *Firmicutes* e *Bacteroidetes* em kefir de água (Figura 11A e 11B) foi possível observar a mesma padronização ocorrida para *L. kefir*, tanto nas amostras vindas do Paraná, quanto nas de São Paulo, demonstraram uma estabilidade maior que no kefir de leite, sendo que os *Bacteroidetes* apresentaram uma quantificação maior ao final do período de cultivo de 30 dias, em relação ao controle inicial.

5.3 Avaliação da atividade antimicrobiana pelo teste de disco de difusão

As amostras denominadas de controle de kefir de leite e de água provenientes da cidade de Sorocaba e de Ponta Grossa foram submetidas ao teste microbiológico de atividade antimicrobiana através do teste de disco difusão (Fluxograma 2). Foi constatado a formação de halos somente nos discos controle contendo penicilina-estreptomicina 0.1 mg/mL, de tamanho médio entre 16 e 18mm.

Os discos contendo a solução de kefir não demonstrou formação de halo. Os resultados mostraram que não ocorreu ação antimicrobiana do kefir em nenhum dos casos (Quadro 2).

Quadro 2 - Formação de halo em teste de disco utilizando fermentado de kefir de leite, kefir de água e antibiótico/penicilina estreptomicina como controle.

	E. coli	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*C. albicans*
Antibiótico	**Presente**	**Presente**	**Presente**	**Presente**
Kefir Leite	**Ausente**	**Ausente**	**Ausente**	**Ausente**
Kefir água	**Ausente**	**Ausente**	**Ausente**	**Ausente**

Fonte: Elaboração própria

Uma variação na ação bactericida promovida pelo kefir é apresentada por Santos (2008), onde três diferentes amostras de kefir foram avaliadas contra os patógenos *Listeria monocytogenes, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Salmonella thyphimurium* e *Bacillus cereus*. Todas as amostras apresentaram redução média de no mínimo 30% para todos os patógenos, sendo observado como os mais afetados o *B. cereus* com 86,8% de inibição, *S. typhimurium* com 73,05% de inibição e *S. aureus* com 69,15% de inibição em específico de uma das amostras.

Amostras de kefir e de soro de kefir mostraram resposta positiva quanto à ação antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* (WESCHENFELDER; WIEST; CARVALHO, 2013). Em outro estudo, *Lactobacillus* isolados de grãos de *kefir* apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *Samonella* sorotipos *enteritidis* e *typhimurium*, *Escherichia coli* (O157:H7), *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, sendo que esta atividade decorre provavelmente de uma alteração do pH do meio, pelos *Lactobacillus*, tornando o meio inadequado para o crescimento dos patógenos. Porém, os autores ressaltam não ser esse o único fator responsável pelo efeito antimicrobiano e que a ação de metabólitos secundários formados durante a fermentação ou produtos de degradação também podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios dos microrganismos (DIAS; SILVA; TIMM, 2018).

Alves *et al.* (2019) ao avaliarem a atividade antibacteriana comprovaram que cepas de *Escherichia coli* (NEWP 0022) apresentam resistência à ambos os tipos de kefir testados. Garrote *et al.* (2000), salientam que uma possível diminuição do poder inibitório ou ausência

do mesmo sobre certas bactérias caso ocorra variação no pH, seja devido ao tempo de fermentação ou quantidades de grãos e substrato empregado, visto que essas bactérias são capazes de adaptação, tornando-se mais resistentes a ambientes menos ácidos ou à pouca quantidade de substância bioativa. Rahimzadeh *et al.* (2015), cogitaram também ser a propriedade bactericida de responsabilidade dos metabólitos produzidos após fermentação e maturação que deve ocorrer em refrigeração por mais 24 a 48 horas. Isso deve ser considerado, visto que muitas pessoas acabam não colocando o produto maturando em refrigeração após a fermentação, consumindo imediatamente pós o fermentado ser peneirado.

Amostras de kefir, provenientes da cidade de Curitiba/PR, foram preparadas diariamente como segue a cultura do kefir. Porém o leite usado foi previamente contaminado com a bactéria *Escherichia coli* (principal indicador de higiene em alimentos), sendo que os resultados do estudo mostraram que o processo fermentativo não foi capaz de inibir o crescimento do referido microrganismo (CAETANO; MONTANHINI, 2014). Fato, também observado por Ghendini *et al* (2020), que após cultivo tradicional de grãos de kefir relata ter encontrado presença de coliformes totais e bolores em algumas amostras, o que reforça a necessidade de mais estudos quanto a indicação de ação antimicrobiana do kefir, visto que com repasses contínuos, a composição microbiana do kefir pode ser alterada, favorecendo a presença de microrganismos contaminantes provavelmente pela manipulação, higienização e armazenamento deficientes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Temperatura, local de cultivo, higiene na troca diária do fermentado e do manipulador, tipos de leite, água e açúcar utilizado nas culturas indicam variações e possíveis resultados diferentes do produto. Os resultados aqui apresentados mostraram que o kefir apresentou ligeira flutuação nas quantidades dos microrganismos após diferentes exposições, mas que devido ao tempo de cultivo, mesmo com essas flutuações, algumas amostras foram capazes de se recuperar e se estabilizar. Acreditamos que a simbiose em que se encontram as mais variadas espécies de bactérias e leveduras possa contribuir para esta estabilidade sem nenhuma perda ao longo do tempo. Em relação a proporção entre *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, foi possível observar uma ligeira quantidade maior de *Firmicutes* em relação aos *Bacteroidetes* após diferentes exposições, porém nosso estudo não visa realizar a ligação desta flutuação com modulação *Firmicutes/Bacteroidetes* da microbiota intestinal.

Também foi possível verificar que os fermentados de kefir não apresentaram ação bactericida quando realizados testes simples de disco difusão em ágar, podendo este efeito citado da literatura ser um efeito indireto.

REFERÊNCIAS

AHMED, Z. *et al*. Characterization of new exopolysaccharides produced by coculturing of L. kefiranofaciens with yoghurt strains. **Int. J. Biol. Macromol.**, n.59, p. 377–383, 2013.

ALMEIDA, F. A. de *et al*. Análise sensorial e microbiológica de kefir artesanal produzido a partir de leite de cabra e de leite de vaca. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, n. 378, p. 51-56, jan./fev. 2011.

ALVES, J. de M. *et al*. Caracterização físico-química e atividade antimicrobiana de kefir coletado em diferentes domicílios frente à cepas de Escherichia coli NEWP 0022. **Revista Brasileira multidisciplinar**, n.22(2), p. 165-177, maio 2019.

ANDRADE, V. L. A., *et al*. Obesidade e microbiota intestinal. **Revista Médica de Minas gerais**, v. 25.4, 2014. Disponível em: http://rmmg.org/artigo/detalhes/1875. Acesso em: 05/09.2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n° 46, de 23 de outubro de 2007. Padrões de Identidade e Qualidade (PIQ) de Leites Fermentados. Disponível em: http://www.cidasc.sc.gov.br/inspecao/files/2012/08/instrução-normativa-nº-46-de-23-de-outubro-de-2007.pdf. Acesso em: 15/05/2018.

BOURRIE, B. C. *et al*. The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir. **Front. Microbiol**.,n. 7, p. 647, 2016.

BURITI, F. C. A.; ISAY SAAD, S. M.. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **ALAN**, Caracas, v. 57, n. 4, p. 373-380, 2007.

CAETANO, D. R.; MONTANHINI, M. T. M. Análise microbiológica de leite fermentado Kefir produzido com leite contaminado por Escherichia coli. **Rebrapa**, v. 5, n.1, p. 33-38, 2014.

CAPRILES, V. D.; SILVA, K. E. A.; FISBERG, M. Prebióticos, probióticos e simbióticos: nova tendência no mercado de alimentos funcionais. **Rev. Nutrição Brasil,** v. 4, n. 6, p. 327-335, 2005.

CASSANEGO, D. B. *et al*. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**, Santa Maria, n. 37, p. 175-186, out. 2015.

CASTANEDA GUILLOT, Carlos. Microbiota intestinal y obesidad en la infancia. **Rev Cubana Pediatr**, v. 92, n. 1, 2020.

COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Alimentos funcionais: Componentes Bioativos e Efeitos Fisiológicos. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016.

CHEN, Y. P. *et al*. Lactobacillus kefiranofaciens M1 isolated from milk kefir grains meliorates experimental colitis in vitro and in vivo. **J. Dairy Sci.**, n. 95. p. 63–74, 2012.

DIAS, Priscila Alves; SILVA, Daiani Teixeira; TIMM, Cláudio Dias. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR. **Ciênc. anim. bras.**, Goiânia, v.19, 2018.

DURÇO, G. M.; MAYNARD, D da C. Obesidade, Fimicutes e Bacteroidetes: uma revisão de literatura. Centro Universitário de Brasília, 2018. Disponível em: https://repositorio.uniceub.br/jspui/bitstream/prefix/13278/1/21409741.pdf. Acesso em: 18.07.2020.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a complex probiotic. **Food Science and Technology Bullletin: Funtional Foods,** New York, v. 2, n. 1, p. 1-17, 2005.

FARNWORTH, E. R. Kefir – a fermented milk product. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of fermented functional foods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, cap. 4, p. 89-127, 2008

FUJISAWA, T. *et al*. Lactobacillus kefiranofaciens sp. nov. Isolated from Kefir Grains. **International Union of Microbiological Societies**, v. 38, n. 1, p. 12-14, jan. 1988.

FURUHASHI, M. *et al*. Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. **Nature International Journal of Science,** Massachusetts, v. 486, n. 21, p: 959–965, jun. 2007.

GALLINA, D. A. *et al*. Caracterização de bebida obtida a partir de leite fermentado simbiótico adicionado de polpa de goiaba e avaliação de viabilidade das bifidobactérias. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes,** Juiz de Fora, v. 67, n. 386, p. 45-54, mai./jun. 2012.

GAO, J. *et al*. Induction of apoptosis of gastric cancer cells SGC7901 in vitro by a cell-free fraction of Tibetan kefir. **International Dairy Journal,** n.30, p. 14–18, may. 2013.

GAO, J., *et al*. Tibet kefir milk decreases fat deposition by regulating the gut microbiota and gene expression of Lpl and Angptl4 in high fat diet-fed rats**. Food Research International**, n. 121, p. 278–287, 2019.

GARROTE, G. L. *et al*. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. **Journal of Food Protection**, 63, 364-369, 2000.

GHEDINI, T. G. M. *et al*. Qualidade microbiológica do kefir Microbiological quality of kefir. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p. 4336-4349, jan. 2020.

GULITZA, A. *et al*. The microbial diversity of water kefir**. International Journal of Food Microbiology**, v. 151:3, 15, p. 284-288, dec. 2011.

GUZEL-SEYDIM, Z. B. *et al*. Review: functional properties of kefir. **Crit Rev Food Sci Nutr**, n.51(3), p. 261-268, mar. 2011.

HERTZLER, S. R.; CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal of the American Dietetic Association**, 103, p. 582–587, may. 2003.

ISMAIL, N. A. *et al*. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Arch Med Sci.**, 7(3), p. 501–507, jun. 2011.

KIM, D. *et al*. Kefir alleviates obesity and hepatic steatosis in high-fat diet-fed mice by modulation of gut microbiota and mycobiota: targeted and untargeted community analysis with correlation of biomarkers. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, n. 44, p. 35–43, 2017.

KIM, D. *et al*. Modulation of intestinal microbiota in mice by kefir administration. **Food Sci Biotechnol,** n.24, p.1397–1403, ago. 2015.

KIM, D. el at. Rapid Detection of *Lactobacillus kefiranofaciens* in Kefir Grain and Kefir Milk Using Newly Developed Real-Time PCR. **Journal of Food Protection**, Vol. 78, No. 4, p. 855–858, 2015.

KONEMAN, E. **Diagnóstico microbiológico:** texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 6 ed, p.760-834.

LEE, M. *et al*. Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. **Immunobiology.** n.212, p. 647–654, 2007.

LEITE, A. M. de O., *et al*. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, 44(2), p. 341–349, 2013.

LEY, R. E., *et al*. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, 444(7122):1022- 3, 2006.

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

MARIAT, D. *et al*. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. **BMC Microbiology**, 9(1), p.123, 2009.

MIGUEL, M. G. da C. P. **Identificação de micro-organismos isolados de grãos Kefir de leite e de água de diferentes localidades**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2009.

MIRANDA, R. F.; PEREIRA, C. S. S.; ARAÚJO, I. O.. Análise da fermentação alcoólica do kefir em biorreator. **Revista Eletrônica Teccen**. v. 7, n. ½, 2014.

MOREIRA, M. E. C. *et al*. Atividade anti-inflamatório de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de Kefir. **Quím. Nova**, São Paulo, p 1738-1742, abril 2008.

NEJATI, F. *et al*. Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. **Microorganisms**, n. 8, p. 192, 2020.

NEVE, H.; HELLER, K. J. The microflora of water kefir: A glance by scanning electron microscopy. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, n.54, p. 337-349, 2002.

OLIVEIRA, A. M.; HAMMES, T. O. Microbiota and intestinal barrier: implications for obesity**. Clin Biomed Res**, 36(4), p. 222-229, 2016.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: a probiotic dairy-composition nutritional and therapeutic aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, Pakistan, v. 2, n. 2, p. 54-59, fev. 2003.

PIDOUX, M. *et al*l. Lactobacilli isolated from sugary kefir grains capable of polysaccharide production and minicell formation. **Journal of Applied Bacteriology**, 69(3), p. 311-320,1990.

PISTELLI, G. C.; COSTA, C. E. M.. Bactérias Intestinais e Obesidade. **Saúde e Pesquisa**. Maringá, v. 3, n.1, jan./abr. 2010.

PRAJAPATI, J. B.; NAIR, B. M. The history of fermented foods. In: FARNWORTH, E. R. **Handbook of fermented functional foods**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, cap. 1, p. 1-25, 2008.

RAHIMZADEH, G *et al*. Evaluation of Anti-Microbial Activity and Wound Healing of Kefir. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, 6(1): 286-93, jan 2015.

RODRIGUES, K. L. *et al*. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **Int J Antimicrob Agents.** N.25, p. 404–408, maio 2005.

RODRIGUES, L. dos S. V.. Relação entre microbiota intestinal e obesidade: terapêutica nutricional através do uso de probióticos. 2016. 34 f. Monografia (Graduação) – Faculdade de Ciências da Educação e Saúde, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2016.

ROSA, D. D. *et al*. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, 30(01), p. 82–96, 2017.

SANTOS, F. L. **Kefir: propriedades funcionais e gastronômicas.** Cruz das Almas/BA. UFRB, 124p., 2015.

SANTOS, J. P. V.. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas.** 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2008.

SCHWIERTZ, A. *et al*. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition.,** v. 18, n. 1, p: 5-109, jun. 2010.

SIMOVA, E. *et al*. Bactérias do ácido láctico e leveduras em grãos de kefir e kefir feito deles. **J Ind Microbiol Biotech,** 28, p. 1-6, 2002.

SOTTORIVA, H. M. *et al*. Características e propriedades do kefir. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, Umuarama, v. 21, n. 4, p. 141-142, out./dez. 2018.

TAYLOR, G. R. J.; WILLIAMS, C. M. Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids. **Br Food J.** n.80, p. 225–230, 1998.

TURNBAUGH, P. J. *et al*. (2008). Microbioma intestinal central em gêmeos obesos e magros. **Nature**, 457(7228), p. 480-484. 2008.

ULLOA, M. *et al*. Mycobiota of the Tibi grains used to ferment Pulque in México. **Revista Mexicana de Micología**. Mexico, v. 10, n. 8, p. 153-159, 1994.

TURKMEN, N. Kefir as a functional dairy product. **In: Dairy in Human Health and Disease Across the Lifespan**, London: Elsevier Inc., cap. 29, p.373-383. 2017.

VAN WYK, J. Kefir: The champagne of fermented beverages. **Fermented Beverages**; Grumezescu, A.M., Holban, A.M., Eds.; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, cap. 12, p. 437–527, 2019.

WESCHENFELDER, S. *et al*. Caracterização físico-química e sensorial de kefir tradicional e derivados. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63, n.2, p.473-480, 2011.

WESCHENFELDER, Simone; WIEST, José Maria; CARVALHO, Heloisa Helena Chaves. Atividade anti-escherichia coli em kefir e soro de kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, [S.l.], v. 64, n. 368, p. 48-55, dez. 2013. ISSN 2238-6416. Disponível em: https://rilct.emnuvens.com.br/rilct/article/view/80. Acesso em: 14 nov. 2020.

YOVANOUDI, M. *et al*. Flow behavior studies of kefir type systems. **Journal of Food Engineering**, Greece, n. 118, p. 41-48, abril 2013.