



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CAMPUS SOBRAL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MARIA LEILAH MONTE COELHO LOURENÇO**

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE  
KEFIR: uma análise in vitro**

**SOBRAL**  
**2021**

MARIA LEILAH MONTE COELHO LOURENÇO

**POTENCIAL PROBIÓTICO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE  
KEFIR: uma análise in vitro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

SOBRAL  
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- L935p Lourenço, Maria Leilah Monte Coelho.  
Potencial probiótico de microrganismos isolados de grãos de kefir : uma análise in vitro / Maria Leilah Monte Coelho Lourenço. – 2021.  
51 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.
1. Enterobactérias. 2. Probióticos. 3. Antimicrobianos. I. Título.

CDD 660.6

---

MARIA LEILAH MONTE COELHO LOURENÇO

A POTENCIAL PROBIÓTICO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE  
KEFIR: uma análise in vitro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Victor Alves Carneiro.

Aprovada em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Antônio Augusto Ferreira Carioca  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser minha força, meu refúgio e por ensinar que esperar pelo Seu tempo é a mais grandiosa forma de confiança em Seu amor.

Ao meu pai, Francisco Augusto Cabral Monte Coelho (*in memorian*), que sempre acreditou no meu potencial e, sem dúvida, derramou suas bênçãos para que tudo desse certo nessa caminhada.

À minha mãe, Fátima Monte Coelho, e aos meus irmãos, Josie e Augusto Júnior, pelo amparo, incentivo e orações.

Ao meu esposo, Paulo Filho, pela torcida, compreensão e apoio incondicional.

À minha filha Maria Louise, que mesmo com a pouca idade, foi minha maior incentivadora e entendeu os momentos de ausência da mamãe.

À minha família Lourenço, em especial meus sogros, Sr. Paulo e Sra. Salvelina, minha eterna gratidão pela atenção, amor e cuidado.

Ao Centro Universitário INTA (UNINTA), em especial a Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Michelle Alves, que me oportunizou o primeiro contato com a docência e ao coordenador do curso de Nutrição, Prof<sup>º</sup> Me. Tércio Aragão, pelo apoio e compreensão.

Aos meus amigos e companheiros de docência Anael Queirós, Lélia Sales, Anita Dorneles, Wandy Policarpo, Débora Eufrásio, Isabel Linhares, Juliana Rêgo e Rafael Sousa pela força, apoio e torcida para a concretização desse sonho.

À minha amiga Mariane Magalhães pela amizade, grande apoio e orientações fundamentais para o bom andamento dos experimentos.

Ao meu orientador Prof<sup>º</sup> Dr. Victor Alves Carneiro, pela atenção, disponibilidade, confiança e pelo grande crescimento proporcionado.

Ao grupo LABAM (Laboratório de Biofilmes e Antimicrobianos), em especial Laína Silva, Edrine Vasconcelos, Mateus Gomes, Brendda Miranda, Vinícius Albuquerque, Rafaela Bastos, Nágila Carneiro e Heloísa Freire, pela presteza, amizade, contribuições e conhecimento compartilhado.

Aos docentes do Programa de Pós – Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará pela dedicação, ensinamentos e oportunidade de crescimento; aos técnicos de laboratório, vigilantes e serventes, pela presteza e, por muitas vezes, serem meus companheiros nos finais de semana e noites de experimentos.

À minha turma, em especial ao Henrique Oliveira (*in memorian*), que mesmo com sua partida precoce nos deixou um pouco do seu carinho, alegria e incentivo.

Aos professores Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lissiana Magna e Prof. Dr. Antônio Augusto, por aceitarem gentilmente o convite para composição da banca examinadora.

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para a finalização desse trabalho.

“Encontrei inúmeros vendedores de sonho pelo caminho. Através de suas inteligências e seus gestos generosos, eles me ensinaram, me inspiraram e me fizeram ver a minha pequenez. Interromperam sua trajetória em algumas curvas da existência para pensar nos outros e se doar sem pedir nada em troca”. Augusto Cury

## RESUMO

O kefir é uma bebida láctea fermentada produzida a partir de seus grãos, nos quais são compostos por uma complexa comunidade microbiana multiespécie formadas, principalmente, de bactérias produtoras de ácido láctico (BAL's) e ácido acético (BAA's), além de leveduras. Dentre suas propriedades, destaca-se a atividade probiótica, sendo capaz de equilibrar a microbiota intestinal nos indivíduos que o consomem. No entanto, há necessidade de um melhor esclarecimento sobre as interações microbianas durante a formação dos grãos de kefir, bem como investigar o potencial biotecnológico oriundo dos micro-organismos existentes na composição desse alimento. Tratou-se de um estudo quantitativo experimental, cujo objetivo foi analisar o potencial probiótico de micro-organismos isolados de grãos de kefir. Para tanto, foi realizado a identificação de micro-organismos, seguido pela avaliação da resistência ao pH ácido e ao cloreto de sódio (NaCl). Posteriormente, foi realizado o ensaio de autoagregação e coagregação com cepas indicadoras, *Escherichia coli* ATCC 11303 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. O potencial antimicrobiano das cepas isoladas foi determinado pela técnica difusão em ágar por poços contra cepas indicadoras. Foram isolados quatro microrganismos, sendo identificados como *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* e *Kluyveromyces marxianus*. No ensaio de tolerância ao pH não foi observado crescimento no pH 2, 3 e 5, exceto para os isolados *L. paracasei* e *K. marxianus* no pH 5. No que diz respeito ao NaCl, todas as estirpes apresentaram resistência na concentração de 2% de sal, exceto o *L. pseudomesenteroides*. Foi observado um forte poder de autoagregação pelo *K. marxianus*, enquanto *E. durans*, *L. paracasei*, *L. pseudomesenteroides* apresentaram uma capacidade moderada. Quando adicionado as cepas indicadoras, o percentual de coagregação com *K. marxianus* reduziu de forma significativa para ambas. Enquanto, apenas a cepa de *K. pneumoniae* interferiu na resposta de agregação de *L. paracasei*. Em relação a análise da atividade antimicrobiano, todos os sobrenadantes, previamente neutralizados, foram capazes de inibir o crescimento de bactérias indicadoras. Os isolados microbianos obtidos a partir dos grãos de kefir apresentaram características probióticas, com destaque para o *L. paracasei* e *K. marxianus* que evidenciaram uma maior tolerância ao pH ácido e uma forte capacidade de auto agregação e coagregação. Além disso, é importante destacar a forte ação antimicrobiana do *L. paracasei* contra *E. coli* e *K. pneumoniae*, o que sugere sua capacidade de estabelecer uma barreira intestinal contra patógenos. No entanto, esses isolados devem ser submetidos à validação experimental em modelos animais e posterior ensaio clínico em seres humanos para confirmação de seu potencial probiótico.

**Palavras-chave:** Enterobactérias; Probióticos; Antimicrobianos.

## ABSTRACT

Kefir is a fermented drink produced by fermentation of milk by kefir grains which contain a complex multispecies microbial community formed mainly of lactic acid bacteria (LAB), acetic acid bacteria (AAB), and yeast. High in nutrients, it is a rich and diverse probiotic source. Several studies have shown the benefits of kefir consumption on gut microbiota composition. However, the microbial interactions during the formation of kefir grains and the biotechnological potential of this beverage are not completely understood yet. The aim of this study was to analyze the probiotic potential of microorganisms isolated from kefir grains. Microorganisms isolated from kefir grains were identified, and the tolerance profile to acid pH and sodium chloride (NaCl) was carried out. The self-aggregation and co-aggregation assays were also conducted, using *Escherichia coli* ATCC and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 as indicator strains. In addition, the antimicrobial potential of the isolated strains was determined by the agar well diffusion technique against indicator strains. Four microorganisms were isolated and identified as *Enterococcus durans*, *Lactobacillus paracasei*, *Leuconostoc pseudomesenteroides* and *Kluyveromyces marxianus*. With respect to the tolerance tests, no growth was observed at pH 2, 3 and 5, except *L. paracasei* and *K. marxianus* at pH 5, while all strains showed resistance at a concentration of 2% of NaCl, except *L. pseudomesenteroides*. High self-aggregation was observed for *K. marxianus*, whereas *E. durans*, *L. paracasei*, *L. pseudomesenteroides* showed moderate capacity. When the indicator strains were added, the percentage of co-aggregation with *K. marxianus* significantly reduced. Meanwhile, only the *K. pneumoniae* strain interfered in the aggregation response of *L. paracasei*. Regarding to the antimicrobial activity, all supernatants, when neutralized, were able to inhibit the growth of the indicator strains. In sum, the microbial isolates obtained from kefir grains showed probiotic properties, with emphasis on *L. paracasei* and *K. marxianus*, which showed a greater tolerance to acid pH and a strong capacity for self-aggregation and co-aggregation. It is important to highlight the strong antimicrobial action of *L. paracasei* against *E. coli* and *K. pneumoniae*, which suggests its ability to establish an intestinal barrier against these pathogens. However, these isolates must be subjected to experimental validation in animal models and subsequent clinical trial in humans to confirm their probiotic potential.

**Keywords:** Enterobacteria; Probiotics; Antimicrobials.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de ação com ausência (A) e presença (B) de microrganismos probióticos .....	17
Figura 2 - Grãos de kefir de leite .....	20
Figura 3 - Modelo de desenvolvimento de um biofilme .....	22
Figura 4 - Fluxograma representativo do delineamento experimental .....	28
Figura 5 - Representação esquemática do isolamento e identificação dos microrganismos..	29
Figura 6 - Representação esquemática das condições de cultivo e do procedimento de ajuste da concentração do inóculo bacteriano para a realização dos ensaios biológicos.....	30
Figura 7 - Representação esquemática da técnica de difusão em ágar por poços .....	32
Figura 8 - Percentual de resistência ao pH e NaCl dos isolados.....	35
Figura 9 - Percentual de autoagregação e coagregação dos isolados.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAA	Bactéria Ácido Acética
BAL	Bactéria Ácido Láctica
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
EPS	Exopolissacarídeo
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
H	Hora
IgA	Imunoglobulina A
Nm	Nanômetro
PBS	Solução Salina Tamponada de Fosfato
pH	Potencial Hidrogeniônico
V/V	Volume / volume
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SDA	Ágar de Glicose <i>Sabourawd</i>
SII	Síndrome do Intestino Irritável
SCf	Sobrenadantes das cepas probióticas do kefir
RPM	Rotações por minuto
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC/mL	Unidades formadoras de colônia por mililitro
ZI	Zona de inibição
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Probióticos.....	14
2.2	Kefir .....	18
2.2.1	<i>Características gerais</i> .....	18
2.2.2	<i>Microrganismos envolvidos na formação de grãos de kefir</i> .....	22
3	OBJETIVOS .....	26
3.1	Objetivo geral .....	26
3.2	Objetivos específicos .....	26
4	METODOLOGIA .....	27
4.1	Planejamento experimental .....	27
4.2	Obtenção e manutenção dos grãos de kefir .....	27
4.3	Isolamento e identificação dos microrganismos .....	28
4.4	Condições de cultivo .....	29
4.5	Ensaio de agregação e coagregação .....	29
4.6	Tolerância ao pH e Cloreto de Sódio (NaCl) .....	30
4.7	Atividade antimicrobiana - Difusão em ágar por poços.....	31
4.8	Análise Estatística.....	32
5	RESULTADOS .....	33
5.1	Isolamento e identificação dos microrganismos.....	33
5.2	Tolerância ao pH e Cloreto de Sódio (NaCl) .....	33
5.3	Ensaio de agregação e coagregação .....	34
5.4	Atividade antimicrobiana .....	35
6	DISCUSSÃO .....	37
7	CONCLUSÃO .....	41
	REFERÊNCIAS .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O Kefir é uma bebida láctea fermentada produzida a partir de seus grãos, os quais são compostos por Bactérias do Ácido Lático (BAL's), Bactérias do Ácido Acético (BAA's) e leveduras (AJAM; KOOHSARI, 2021; BENGGOA et al., 2018; ERDOGAN et al., 2019; KIM; KIM; SEO, 2020; SINDI; BADSHA; ÜNLÜ, 2020). Considerada uma bebida levemente alcoólica (0,1 a 2% de álcool) e nutritiva, foi originado na Ásia Central, onde, juntamente com países da Europa Oriental, é tradicionalmente consumido. No entanto, sua demanda vem aumentando de forma substancial em outras partes do mundo devido aos vários benefícios proclamados desses produtos na saúde humana (ROSA et al., 2017).

Os microrganismos presentes no kefir são capazes de fermentar os açúcares contidos em diversos tipos de leite, como o de cabra, búfala, ovelha, camelo ou vaca, dando origem a um alimento com amplo benefício a saúde (FARAG et al., 2020; ŁOPUSIEWICZ et al., 2020; NEJATI; JUNNE; NEUBAUER, 2020). Comumente esse processo fermentativo acontece através da interação entre espécies dos gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018). Porém, é importante destacar que a composição microbiana dos grãos de kefir variam de acordo com a origem geográfica, os métodos de produção, tipos de leite, temperaturas e tempos de incubação, além das proporções de grãos de kefir para leite (SINDI; BADSHA; ÜNLÜ, 2020). Apesar dessa diversidade, todos os microrganismos que o compõem geralmente são capazes de equilibrar a microbiota intestinal nos indivíduos que o consomem, através de sua atividade probiótica (BENGGOA et al., 2018).

Os probióticos são definidos como produtos contendo microrganismos vivos que produzem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (RIZZOLI; BIVER, 2020). Dentre seus principais mecanismos de ação destaca-se o aumento da integridade da mucosa intestinal, atividade antimicrobiana, inibição da aderência bacteriana e capacidade de invasão no epitélio intestinal, regulação do sistema imune e do sistema nervoso central (STAVROPOULOU; BEZIRTZOGLU, 2020; YAN; POLK, 2020). A utilização desses microrganismos na modulação da microbiota intestinal é considerada uma conduta promissora para a prevenção e tratamento de patologias, como infecções, condições autoimunes e alergias (STAVROPOULOU; BEZIRTZOGLU, 2020; ZHOU et al., 2020), além das condições intestinais crônicas, como Doença Inflamatória Intestinal (DII) (YAN; POLK, 2020). Tais

achados tem aumentado a demanda desse produto artesanal, o que tem contribuído para o aumento substancial de estudos acerca de seu potencial terapêutico (DE SAINZ et al., 2020).

Diante das constantes pesquisas e da diversidade de questionamentos em relação as propriedades benéficas de produtos de origem natural, nota-se uma maior diversidade molecular quando comparados às drogas sintéticas, assim podem ser utilizados como alternativas para o desenvolvimento de novas terapias e abordagens farmacêuticas (ROY et al., 2018).

Ademais, considerando que há uma maior aplicabilidade na indústria de alimentos de microrganismos isolados de grãos de kefir para produção de alimentos fermentados, ao invés desses grãos em sua forma íntegra, torna-se imprescindível o isolamento e a caracterização dos microrganismos envolvidos na microbiota do kefir (PLESSAS et al., 2016). No entanto, há necessidade de maiores evidências científicas a fim de comprovar sua atividade probiótica como potencial biotecnológico, além de determinar os mecanismos envolvidos para a formação desses aglomerados microbianos. Portanto, torna-se necessário responder a seguinte problematização: Qual o potencial probiótico dos microrganismos isolados de grãos de kefir? Sendo assim, o objetivo desse trabalho é analisar o potencial probiótico de microrganismos isolados de grãos de kefir.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Probióticos

O conceito histórico dos probióticos vem sendo relatado há séculos quando Henry Tessler, cientista do *Pauster Institute*, em Paris, descobriu que crianças que continham bifidobactérias intestinais apresentavam menos episódios de diarreia (KECHAGIA et al., 2013). Porém, foi apenas em 1907, que o russo Eli Metchnikoff propôs que o uso de probióticos suprimia episódios de intoxicação intestinal através da substituição de microrganismos patogênicos por bactérias benéficas. Tal evidência motivou-o a desenvolver uma dieta com leite fermentado por uma bactéria denominada “bacilo búlgaro” (GORDON, 2008). Dez anos depois, o cientista alemão Alfred Nissle isolou uma cepa bacteriana das fezes de um soldado da Primeira Guerra Mundial que não apresentou enterocolite durante um surto grave de shigelose (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017). A partir de então, a estirpe, identificada como *Escherichia coli* Nissle 1917, foi utilizada no tratamento de pacientes diagnosticados com tal agravo (ISLAM, 2016).

Atualmente, os probióticos são definidos pela Organização para Alimentos e Agricultura/Organização Mundial da Saúde como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; NET et al., 2014; RIZZOLI; BIVER, 2020). Esses microrganismos não patogênicos que compõem a microbiota intestinal normal passaram a ser utilizados no tratamento de distúrbios associados ou não ao trato gastrointestinal (ISLAM, 2016).

Dentre as bactérias com propriedades probióticas destacam-se os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* caracterizadas como Gram-positivos e anaeróbicos facultativos (CHEW et al., 2015; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Porém, existem outros menos comuns, como *Saccharomyces boulardii* e algumas espécies *Escherichia coli*, *Bacillus* e *Clostridium butyricum* (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017). Entre as espécies do gênero *Lactobacillus*, destacam-se *Lc. acidophilus*, *Lc. rhamnosus*, *Lc. bulgaricus*, *Lc. reuteri* e *Lc. casei*. Enquanto que as espécies de *Bifidobacterium* mais comumente usadas em probióticos incluem *B. animalis*, *B. infantis*, *B. lactis* e *B. longum* (ISLAM, 2016).

O isolamento das estirpes com alegação probiótica pode acontecer no ser humano, no animal, nas plantas ou no ambiente (SHOKRYAZDAN et al., 2017). Por conseguinte,

critérios importantes devem ser considerados para que esse microrganismo isolado seja classificado como probiótico, dentre eles destacam-se: apresentar resistência aos processos tecnológicos, ser capaz de aderir aos tecidos epiteliais, ser estável na presença de ácido e bile, ter capacidade de sobreviver no ambiente gastrointestinal e ser capaz de influenciar atividades metabólicas do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/ WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; KECHAGIA et al., 2013). Além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução nº 241 de 26 de julho 2018, que dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos, cita a necessidade da identificação e caracterização dessas estirpes por meio de métodos genotípicos e fenotípicos; especificação da origem e comprovação do depósito da cepa em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida (BRASIL, 2018). Como última etapa para o reconhecimento da cepa com potencial probiótico, o status de segurança para humanos é verificado através de testes *in vitro* e *in vivo* e sequenciamento de genoma (SHOKRYAZDAN et al., 2017). Certamente há necessidade de elucidações científicas quanto a formulação adequada para um melhor fornecimento de cepas viáveis a todas essas condições (DO CARMO et al., 2018; ISLAM, 2016).

Dentre as espécies que colonizam o trato gastrointestinal, as bactérias produtoras de ácido láctico (BALs) são geralmente consideradas microrganismos favoráveis a todas essas condições devido à sua capacidade de estimular o desenvolvimento da microbiota do hospedeiro, função digestiva, tolerância da mucosa, resposta imune estimulante e melhor resistência à doenças (RINGØ et al., 2018). Comumente aplicadas na indústria, produção agrícola, pecuária, empresa de alimentos, engenharia farmacêutica, as BALs devem enfrentar o baixo pH para desempenhar suas propriedades probióticas, através do seu próprio crescimento e fermentação (WANG; CUI; QU, 2017). É importante ressaltar que o uso clínico desses microrganismos depende de vários fatores intrínsecos ao probiótico, como formulação, armazenamento, viabilidade, assim como fatores dependentes ao paciente, como a idade, patologia e condição clínica geral (DO CARMO et al., 2018; ISLAM, 2016). Portanto, mais pesquisas *in vivo* são necessárias para caracterização, segurança na preparação e qualidade das estirpes utilizadas (CAMERON et al., 2017; KECHAGIA et al., 2013; RINGØ et al., 2018).

Embora existam dados clínicos conflitantes sobre muitas cepas e formulações, o consumo de probióticos aumentou significativamente nos últimos anos. Diante de tal fato, a literatura propõe a melhoria da qualidade de evidências clínicas, transparência quanto às alegações dos produtos comercializados, conscientização do consumidor, assim como sua regulamentação frente aos órgãos de saúde (SUEZ et al., 2019). Adicionado a isso, com a

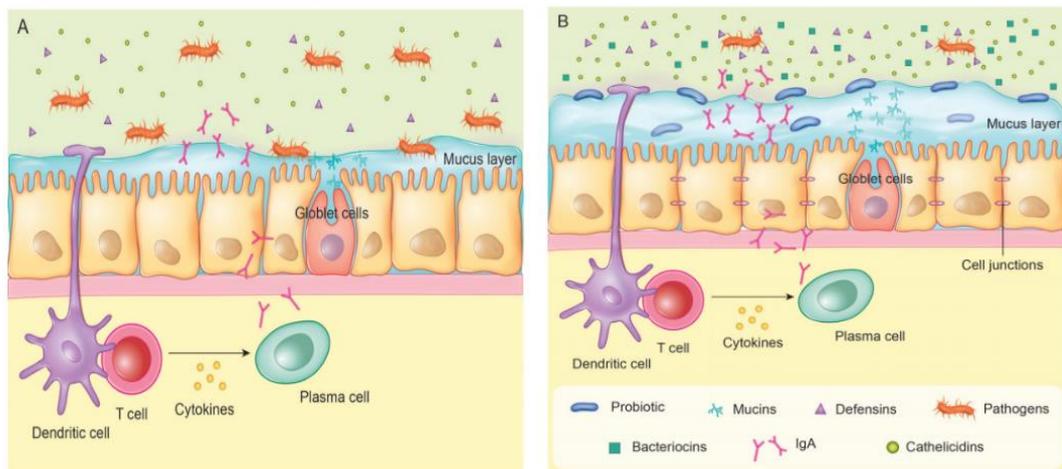
comercialização de produtos que não atendem aos critérios mínimos, a ausência do registro de células viáveis conforme o tempo de prateleira e frente a falta de evidências quanto às alegações do produtos, torna necessário um maior conhecimento por parte dos consumidores e profissionais de saúde prescritores quanto a seleção e recomendação do produtos existentes no mercado (NET et al., 2014).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2017) as linhagens autorizadas para uso em suplementos no Brasil são *Bacillus coagulans* BGI-30, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Bifidobacterium lactis* BL-04, *Lactobacillus acidophilus* LA-14, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus casei* LC-11, *Lactobacillus paracasei* LPC-37, *Lactobacillus reuteri* DSM17938, *Lactobacillus helveticus* R0052, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus rhamnosus* LR-32, *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 e *Lactococcus lactis* LL-23.

Os efeitos desses probióticos no hospedeiro ocorrem principalmente por competição de nutrientes com bactérias patogênicas, imunomodulação, além de alterar o pH local, impedindo a colonização de patógenos (SÁNCHEZ et al., 2017; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017). Entende-se por infecção bacteriana intestinal a colonização epitelial pelo patógeno, com produção de mucinas pelas células caliciformes e de peptídeos antimicrobianos, como as defensinas e catelicidinas, pelas células intestinais. Posteriormente, as células dendríticas fagocitam o agente patogênico e apresentam seus antígenos aos linfócitos T. Estes, por sua vez, liberam citocinas responsáveis pela ativação das células B, com subsequente liberação de imunoglobulina A (IgA), anticorpos específicos para o patógeno infeccioso (Figura 1A) (DO CARMO et al., 2018).

Dentro deste contexto, considerando que as cepas probióticas ocupam os mesmos receptores dos microrganismos patogênicos, sua colonização na microbiota intestinal diminui a incidência de doenças oriundas desses agentes. Isso se deve ao fato dos probióticos provocarem maior estimulação na produção de mucina e de peptídeos antimicrobianos, com aumento da estabilidade da junção celular, maior liberação de IgA pelas células B ativadas e inibição do crescimento de patógenos pela produção de moléculas antimicrobianas, como ácidos graxos de cadeia curta, bacteriocinas e microcinas (Figura 1B) (DO CARMO et al., 2018; RAGHUWANSHI et al., 2018).

Figura 1 – Mecanismo de ação com ausência (A) e presença (B) de microrganismos probióticos.



Fonte: Do Carmo et al. (2018).

De fato, as evidências a favor das alegações dos benefícios atribuídos aos probióticos para a saúde vêm sendo acumuladas de forma substancial (KECHAGIA et al., 2013). Diante das constantes pesquisas destacam-se as características já elucidadas na literatura: a regulação de energia em vários processos metabólicos, a modulação da resposta imune e consequente combate a patógenos, a tolerância a ácidos biliares, a aderência às células entéricas e estimulação da angiogênese intestinal. Tais propriedades beneficiam a atuação dessas linhagens na saúde humana, com otimização nutricional, regulação de distúrbios orgânicos ou anormalidades metabólicas (KERRY et al., 2018).

A principal alegação para utilização de probióticos é o equilíbrio da microbiota intestinal, promoção da digestão da lactose por indivíduos intolerantes, alívio da constipação e aumento da absorção de vitaminas e minerais (VUOTTO; LONGO; DONELLI, 2014). Acrescenta-se ainda a melhora da saúde intestinal, melhora da resposta imune, redução do colesterol e prevenção do câncer. Ademais, embora alguns desses benefícios estejam bem documentados, como doenças diarreicas agudas e prevenção de diarreia associada a antibióticos, outros requerem mais estudos para serem estabelecidos (KECHAGIA et al., 2013).

Com sua aplicabilidade nutricional e clínica, os probióticos demonstram influência direta no tratamento clínico da diarreia associada ao rotavírus, Síndrome do Intestino Irritável (SII) e alergias alimentares. Além de fornecer subsídios funcionais para prevenção e tratamento da diabetes, obesidade e câncer (KERRY et al., 2018). Além disso, o uso dessas estirpes no tratamento e prevenção da diarreia em crianças já está bem descrito na literatura. De certo, se ofertado nos primeiros meses de vida, as cepas probióticas diminuem a incidência de outros distúrbios gastrintestinais, como a enterocolite necrosante e sepse de foco intestinal (DO CARMO et al., 2018). Um estudo *in vivo* e *in vitro* realizado por Blackwood et al. (2017)

verificou eficácia dos probióticos na prevenção da enterocolite necrosante. Nesse caso, foi detectado que os *Lactobacillus* aumentam a resistência das proteínas juncionais que, por sua vez, preservam a integridade da membrana epitelial, prevenindo a evolução dessa patologia (BLACKWOOD et al., 2017).

Em relação à capacidade de imunomodulação acredita-se que há uma interação dos probióticos com as células epiteliais e dendríticas. No entanto, suas propriedades são específicas de cada cepa, sendo dependente para o perfil de citocinas liberadas pelos linfócitos, enterócitos ou células dendríticas. Além disso, as vias de sinalização intracelular são ativadas com a interação das bactérias probióticas e os receptores da superfície celular, induzindo o sistema imunológico (RAGHUWANSHI et al., 2018). Ressalta-se que seus efeitos são transitórios e há necessidade do uso continuado, ademais, há possibilidade de haver uma pressão seletiva semelhante à antibioticoterapia de uso frequente, podendo levar a ineficácia da atividade antimicrobiana. Embora não haja evidências que indiquem redução de microrganismos benéficos na microbiota há necessidade de elucidações quanto aos efeitos ao longo prazo do consumo regular e probióticos em indivíduos saudáveis (DO CARMO et al., 2018).

Salienta-se que, apesar da comprovação dos potenciais terapêuticos dos probióticos, é preciso ter cautela na utilização em bebês sob cuidados neonatais ou indivíduos com algumas condições clínicas, incluindo doenças malignas, intestino permeável, diabetes mellitus e pós-transplante de órgão (KOTHARI; PATEL; KIM, 2019). Esses microrganismos podem ocasionar a translocação bacteriana, induzindo infecções oportunistas e, como consequência, desenvolvendo pneumonia, endocardite e sepse (ZAWISTOWSKA-ROJEK; TYSKI, 2018). Diante das constantes pesquisas e da diversidade de questionamentos em relação ao consumo dos probióticos para a manutenção da saúde do intestino, houve um aumento significativo de sua utilização. Atualmente, dentre os produtos mais populares, carreadores dessas bactérias, encontram-se os leites fermentados, com destaque para o kefir (MARCO et al., 2021).

## **2.2 Kefir**

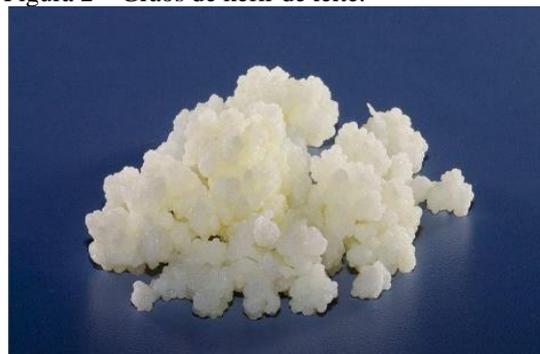
### ***2.2.1 Características gerais***

O kefir, produto alimentício utilizado desde a Antiguidade, possui atividade probiótica, o que lhe confere um amplo benefício a saúde (DIAS; SILVA; TIMM, 2018; PRADO et al., 2015; ROSA et al., 2017). De certo, a presença de diversas bactérias e leveduras

que favorecem o equilíbrio da microbiota intestinal se destaca dentre as características que conferem suas propriedades probióticas (ERDOGAN et al., 2019; KIM et al., 2019b; PLESSAS et al., 2016). Nesse contexto, o kefir é definido como uma cultura microbiana preparada a partir de grãos de kefir, através da interação entre espécies dos gêneros bacterianos *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Acetobacter* e leveduras fermentadoras de lactose (*Kluyveromyces marxianus*) e não fermentadoras de lactose (*Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018).

Originado nas Montanhas do Cáucaso, no Tibet, a palavra kefir advém do eslavo Keif que significa "bem-estar" ou "bem-viver". No entanto, também é reconhecido como quefir, tibicos, cogumelos tibetanos, plantas de iogurte, cogumelos do iogurte (OTLES; CAGINDI, 2003). Pode-se mencionar que o kefir é o produto da fermentação do leite pelos seus grãos que são compostos por uma associação simbiótica de bactérias do ácido láctico ( $10^8 - 10^9$  UFC/g), leveduras ( $10^5 - 10^6$  UFC/g) e bactérias do ácido acético ( $10^5 - 10^6$  UFC/g), submersas em uma matriz composta de polissacarídeos e proteínas. (BENGOA et al., 2018; DIAS; SILVA; TIMM, 2018; GAROFALO et al., 2015; GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2001). Essa matriz forma grãos de superfície irregular (Figura 2) que são capazes de fermentar em diversos substratos nutritivos, como leite de vaca, cabra, ovelha, búfala, açúcar mascavo, sucos de frutas e extrato de soja, dando origem a bebida fermentada com amplo benefício à saúde (WANG et al., 2019).

Figura 2 – Grãos de kefir de leite.



Fonte: Farnworth (2005).

Atualmente, são conhecidos dois tipos de kefir: de água e de leite. Seus métodos tradicionais de cultivo ocorrem artesanalmente através da adição de 5% dos grãos no leite ou em água açucarada (5%). O substrato de preferência deve ser pasteurizado ou fervido e, logo após, resfriados para posterior inoculação dos grãos. Após 18 a 24 horas em temperatura ambiente os grãos são separados da bebida fermentada por filtração em peneira e inoculados

em um novo substrato nutritivo. O filtrado deve ser armazenado na geladeira por 24 horas antes do consumo (FARNWORTH, 2005). Durante essa etapa, a atividade metabólica dos microrganismos presentes nos grãos que produzem ácidos lático e acético, etanol e dióxido de carbono darão origem ao sabor e aroma característicos (GAMBA et al., 2020).

No decorrer do processo fermentativo, os grãos de kefir aumentam seu volume, obtendo a nova biomassa. Posteriormente, são transferidos para um novo substrato para darem início a um novo ciclo (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2001). A partir da fermentação do leite pelos seus grãos, os microrganismos que compõem o kefir ficam submersos a uma matriz de exopolissacarídeos (EPS), a qual eles produzem, denominada kefiran (DIAS; SILVA; TIMM, 2018; GAROFALO et al., 2015). Essa matriz composta de polissacarídeos e proteínas contém ampla propriedade biológica, físico-químicas e reológicas que agregam valor ao produto. Cita-se, por exemplo, sua adição em outros alimentos, assim como sua utilização como revestimento para produtos alimentícios e farmacêuticos entre outras funções (PRADO et al., 2015).

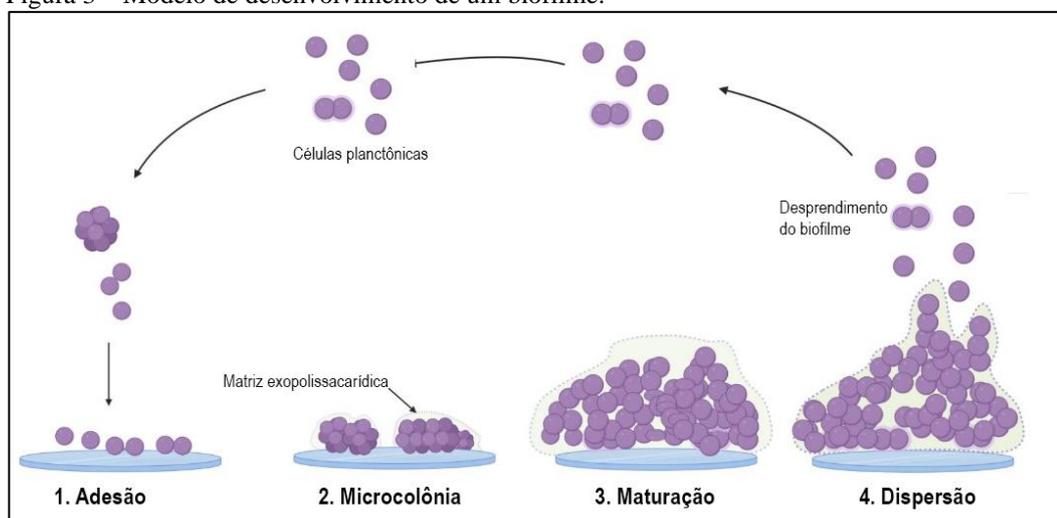
Do ponto de vista nutricional, o kefir contém quantidade significativa de aminoácidos essenciais, vitaminas e minerais. Apesar da escassez de estudos científicos, há relatos da presença dos minerais Zinco, Cobre, Manganês, Ferro, Cobalto e Molibdênio (ROSA et al., 2017). Outro aspecto relevante é que a composição microbiana dos grãos pode variar, dependendo da região de origem e da forma do processo fermentativo (GAROFALO et al., 2015). Cita-se também influência das condições de armazenamento, tempo/temperatura de fermentação, proporção de grãos e substrato fermentativo na composição do leite fermentado pelo grão de kefir (ROSA et al., 2017; SINDI; BADSHA; ÜNLÜ, 2020).

No que diz respeito a sua aplicabilidade clínica, há muito tempo acreditava-se no seu poder curativo, sendo utilizado no tratamento de câncer, tuberculose e distúrbios gastrointestinais. Além disso, já havia alguns relatos sobre seus possíveis efeitos antibacterianos, antitumorais, anticarcinogênicos e redutores de colesterol. Atualmente, alegam-se outros benefícios, como melhora do sistema imunológico e da tolerância à lactose em humanos (DIAS; SILVA; TIMM, 2018). Todas as características funcionais e probióticas mencionadas estão diretamente relacionadas a presença dos microrganismos e/ou aos metabólitos sintetizados pela fermentação do leite, como ácido lático e acético, EPS e peptídeos bioativos, como as bacteriocinas produzidas pelos próprios microrganismos presentes nos grãos (BENGOA et al., 2018). Além disso, há presença constante de peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, etanol, diacetil que também favorecem sua atividade antibacteriana frente aos patógenos (FARNWORTH, 2005).

Acrescenta-se que os grãos de kefir são formados a partir de aglomerados celulares, denominados biofilmes microbianos (GUT et al., 2019; HAN et al., 2018). Os biofilmes consistem em agregados microbianos multicelulares que podem aderir-se a superfícies bióticas e abióticas (COWAN, 2011; HAN et al., 2018; HANEY et al., 2018). Ou seja, os microrganismos planctônicos (livres) se unem e se transformam em comunidades multicelulares envolvidos por substâncias poliméricas extracelulares (VERDEROSA; TOTSIKA; FAIRFULL-SMITH, 2019). Esta matriz extracelular é constituída por exopolissacarídeos, DNA extracelular, material proteico, bem como apêndices celulares, no qual possui função protetora contra condições ambientais adversas, tais como, variações de pH, temperatura, escassez de nutrientes, ação de agentes antimicrobianos e fagocitose mediada pelo sistema imune do organismo hospedeiro (AZEREDO et al., 2017; HALL; MAH, 2017; SCHIEBEL et al., 2017).

Em suma, os estágios de desenvolvimento do biofilme consistem na adesão primária a uma superfície, agregação intercelular, maturação e posterior dispersão (Figura 3) (VASUDEVAN, 2014). Inicialmente, ocorre à ligação da célula a uma superfície, seguida de proliferação celular, formação de microcolônias e produção da matriz polimérica. Finalmente, ocorre a maturação, dispersão e, por conseguinte, um possível surgimento de aglomerados celulares na forma de um novo biofilme (PETROVA; SAUER, 2016). Além disso, faz parte do seu ciclo de formação difundir regularmente bactérias no meio, denominadas microrganismos planctônicos, os quais comumente adquirem propriedades do biofilme primário, incluindo a resistência a antimicrobianos (COWAN, 2011).

Figura 3 – Modelo de desenvolvimento de um biofilme.



Fonte: Adaptado de Carneiro et al. (2020).

Nessa perspectiva, essas comunidades microbianas estão associadas ao desenvolvimento de diversas doenças infecciosas crônicas (ROY et al., 2018). No entanto, elas podem possuir efeitos benéficos, dependendo das espécies de microrganismos que o compõem (AZEREDO et al., 2017; MIQUEL et al., 2016). Alguns destes biofilmes, como a microbiota intestinal, desempenham uma função protetora e funcional ao sistema gastrointestinal (MIQUEL et al., 2016). Acrescenta-se ainda seu papel fundamental na formação dos grãos de kefir (HAN et al., 2018).

Diante das constantes pesquisas e da diversidade de questionamentos em relação aos antimicrobianos de origem natural, nota-se que eles possuem uma maior diversidade bioquímica e estrutural comparados às drogas sintéticas e podem ser utilizados como alternativas para o desenvolvimento de novas terapias e abordagens farmacêuticas. Portanto, as diversas elucidações sobre o mecanismo de ação podem oferecer subsídios para uma melhor compreensão sobre a formação dos biofilmes benéficos ao hospedeiro (ROY et al., 2018). Adicionalmente, embora os estudos tenham avançado, há necessidade de mais pesquisas para esclarecimento do complexo ecossistema do kefir (BENGOA et al., 2018).

### **2.2.2 *Microrganismos envolvidos na formação de grãos de kefir***

Os grãos de kefir são formados a partir da interação entre BALs, BAAs e leveduras (GAROFALO et al., 2015). Um estudo realizado por Han et al. (2018), evidenciou sua diversidade microbiana, sendo identificados os filos bacterianos *Proteobacteria* e *Firmicutes*, e apenas um filo fúngico, *Ascomycota*. Dentre os gêneros bacterianos foram detectados *Acetobacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, enquanto os gêneros fúngicos foram *Kluyveromyces* e *Kazachstania* (HAN et al., 2018).

As BALs são consideradas um dos primeiros microrganismos estudados devido a sua influência na fermentação de alimentos e na saúde humana (PAPADIMITRIOU et al., 2016; ZHOU et al., 2020). São microrganismos microaerófilos, catalase negativa, tolerantes ao pH ácido (pH < 5,0) e sua temperatura de crescimento pode variar de 20 °C a 40 °C (GARCIA; ARRÁZOLA; DURANGO, 2010). Também são reconhecidas como bactérias fermentativas Gram positivas não patotóxicas (MARCO et al., 2021). Dentre as espécies de BALs destacam-se espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017). A maioria deles é pertencente à microbiota do ser humano, e são responsáveis por diversos efeitos benéficos, incluindo alívio da intolerância à lactose, diarreia, úlcera péptica, estimulação do sistema imunológico, efeitos

antialérgicos, ações antifúngicas, preservação de alimentos e prevenção de câncer de cólon (MASOOD et al., 2011). Podem ser classificadas em homofermentativo ou heterofermentativo de acordo com a quantidade e os tipos de ácidos orgânicos produzidos (GARCIA; ARRÁZOLA; DURANGO, 2010). As homofermentativas produzem ácido láctico como o principal produto da fermentação da glicose, enquanto as heterofermentativas, além de ácido láctico, formam outras substâncias, como dióxido de carbono, ácido acético, e etanol (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

Essas bactérias degradam carboidratos, como a lactose, para síntese de ácido láctico e energia, através de um processo conhecido como fermentação láctica. Na indústria, esses microrganismos são usados no processo de fermentação para a fabricação de queijos, iogurte, leite fermentado e outros produtos derivados do leite (QUINTERO, 2018). Além disso, elas também estão presentes no processamento de carnes (linguiça e presuntos), bebidas alcoólicas (vinhos e cervejas) e vegetais (repolho, milho, cevada, couve e picles) (CARR; CHILL; MAIDA, 2002). Dentre outros benefícios, esses microrganismos são capazes de prolongar o prazo de validade dos produtos fermentados e agir como antimicrobianos a partir da secreção de metabólitos, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, sendo capazes de inibir bactérias patogênicas como *Salmonella*, *E. coli* enterohemorrágica e *Listeria* (AWOJOBI; ADEYEMO; SANUSI, 2016; HERNÁNDEZ-AQUINO et al., 2019; ÖZOGUL; HAMED, 2017)

As BAAs são um grupo distinto de microrganismos da família *Acetobacteraceae*, a classe *Alphaproteobacteria*, as quais são classificadas em 17 gêneros: *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Gluconacetobacter*, *Asaia*, *Komagataeibacter*, *Acidomonas*, *Kozakia*, *Swaminathania*, *Saccharibacter*, *Neoasaia*, *Granulibacter*, *Tanticharoenia*, *Ameyamaea*, *Endobacter*, *Nguyenibacter*, *Swingsiao* e *Neokomagataea* (SAICHANA et al., 2015). Promovendo o crescimento de diferentes espécies de plantas e insetos (DE ROOS; DE VUYST, 2018), as BAAs são bactérias Gram-negativas capazes de oxidar o etanol em ácido acético (DE ROOS; DE VUYST, 2018; GOMES et al., 2018). Caracterizadas com aeróbicos mesofílicos obrigatórios, esses microrganismos oxidam açúcares, álcoois de açúcar e etanol, resultando na produção de ácido acético como principal produto final (RASPOR; GORANOVIČ, 2008). Fisiologicamente, exibem resistência a altas concentrações de ácidos orgânicos e pH baixos (RASPOR; GORANOVIČ, 2008).

Há séculos, esses microrganismos atuam na produção alimentícia de fermentados, como vinagre, kombucha, kefir (água) e cacau (GOMES et al., 2018; LYNCH et al., 2019; MARCO et al., 2021). Mas também tem forte atuação na bioprodução industrial de produtos

químicos (RASPOR; GORANOVIČ, 2008). Apesar de seus efeitos benéficos, esses microrganismos são capazes de deteriorar produtos submetidos a fermentações alcoólicas (vinho, cidra e cerveja), assim como refrigerantes e frutas (DE ROOS; DE VUYST, 2018; RASPOR; GORANOVIČ, 2008), ocasionando um sabor azedo indesejável (GOMES et al., 2018). Considerando o aumento do consumo de bebidas fermentadas, assim como o desenvolvimento de novos produtos, essas estirpes são consideradas promissoras. No entanto, há necessidade de mais pesquisas sobre seus benefícios à saúde, assim como uma avaliação mais criteriosa da segurança desses microrganismos para uso como culturas alimentares microbianas (LYNCH et al., 2019).

Leveduras são consideradas fungos unicelulares, ascósporos, pertencentes ao filo *Ascomycetes*, classe *Hemiascomycetes* e estão separadas em uma ordem principal *Saccharomycetales* (ŽYMAŃCZYK-DUDA et al., 2017). Comumente isolada de habitats naturais, como laticínios tradicionais fermentados, grãos de kefir e plantas, podem metabolizar em uma variedade de substratos de baixo custo, incluindo derivados lácteos (NURCHOLIS et al., 2020). Devem tolerar estresses fisiológicos, como baixo pH, alta concentração de etanol e alto estresse osmótico. Representam um grupo muito diversificado de microrganismos, nas quais as cepas da mesma espécie geralmente apresentam um alto nível de divergência genética. Sua biodiversidade está intimamente relacionada à sua aplicabilidade (ŽYMAŃCZYK-DUDA et al., 2017). Sua utilização como probióticos oferece uma série de vantagens em relação às bactérias, principalmente por características particulares, como seu maior tamanho celular (LIMA et al., 2017). Salienta-se que, há muito tempo, essas cepas são utilizadas no ramo industrial e biotecnológico devido às suas diversas aplicações, tanto para fermentação quanto para produção de metabólitos específicos (KARIM; GERLIANI; AĪDER, 2020; NURCHOLIS et al., 2020).

Reconhecidas por seu potencial enzimático na área alimentícia, as leveduras tem alto poder fermentativo, principalmente das espécies do gênero *Saccharomyces*, possuindo grande potencial biotecnológico (ARANDA et al., 2019; ŽYMAŃCZYK-DUDA et al., 2017). Outras menos comuns, tais como *Scheffersomyces stipitis*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis* e *Dekkera bruxellensis* também têm colaborado no processo industrial de fermentação (STEENSELS et al., 2014). Na indústria, destaca-se a utilização probiótica de duas leveduras: *S. cerevisiae* var. *bouardii* e *K. fragilis* (B0399) (MENEZES et al., 2020). Várias pesquisas têm evidenciado novos gêneros, espécies e linhagens de leveduras com potencial probiótico promissor, porém não há elucidação científica dessas estirpes probióticas adicionadas aos alimentos (CASSANEGO et al., 2015).

Vários gêneros e espécies de leveduras convertem açúcares em etanol e dióxido de carbono, assim como outros metabólitos, isto é, glicerol, acetato, succinato, piruvato, álcoois superiores e ésteres, através da fermentação alcoólica. Esse processo bioquímico é responsável pela produção de alguns alimentos e bebidas, como vinho, cerveja e pão. Tradicionalmente, os produtos fermentados são obtidos quando leveduras pertencentes a microflora natural de substratos ricos em carbono (cereais, no caso de pão e cerveja e mostos de uva, no caso de vinho) fermentam espontaneamente açúcares (ALBERGARIA; ARNEBORG, 2016).

A interação complexa entre fungos e bactérias ocorre em uma ampla variedade de ambientes, desempenhando papel importante na agricultura, horticultura, silvicultura, proteção ambiental, processamento de alimentos e biotecnologia (DEVEAU et al., 2018). Essas comunidades microbianas são frequentemente observadas nos processos de fabricação de alimentos e bebidas fermentados, como pão de fermento, queijo, kefir, vinho e saquê, sendo consideradas pontos fundamentais no estudo da microbiologia alimentar moderna (WATANABE; TAKAGI, 2019).

Nessa perspectiva, Wang et al. (2012) verificaram que a formação dos grãos inicia a partir da interação de *Lb. kefiranofaciens* e *S. turicensis* a fim de formar pequenos grânulos. Logo em seguida, o produtor de biofilme *Lb. kefir* liga-se à superfície dos grânulos e coagrega-se a outros microrganismos e componentes do leite para formar os grãos. Quando investigado por microscopia eletrônica de varredura, verificou-se que lactobacilos de cadeia curta, como *Lb. kefir* ocupam a superfície, enquanto lactobacilos de cadeia longa, como *Lb. kefiranofaciens* se agregaram em direção ao centro dos grãos de kefir (WANG et al., 2012). A interação desses microrganismos ocorre por competição por nutrientes, alimentação cruzada, inibição dos produtos finais, mas também por sua distribuição espacial (MELKONIAN et al., 2019). Representam um potencial na agricultura sustentável e na saúde humana, podendo ser utilizados como alternativas terapêuticas (DEVEAU et al., 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Analisar o potencial probiótico de microrganismos isolados de grãos de kefir.

#### 3.2 Objetivos específicos

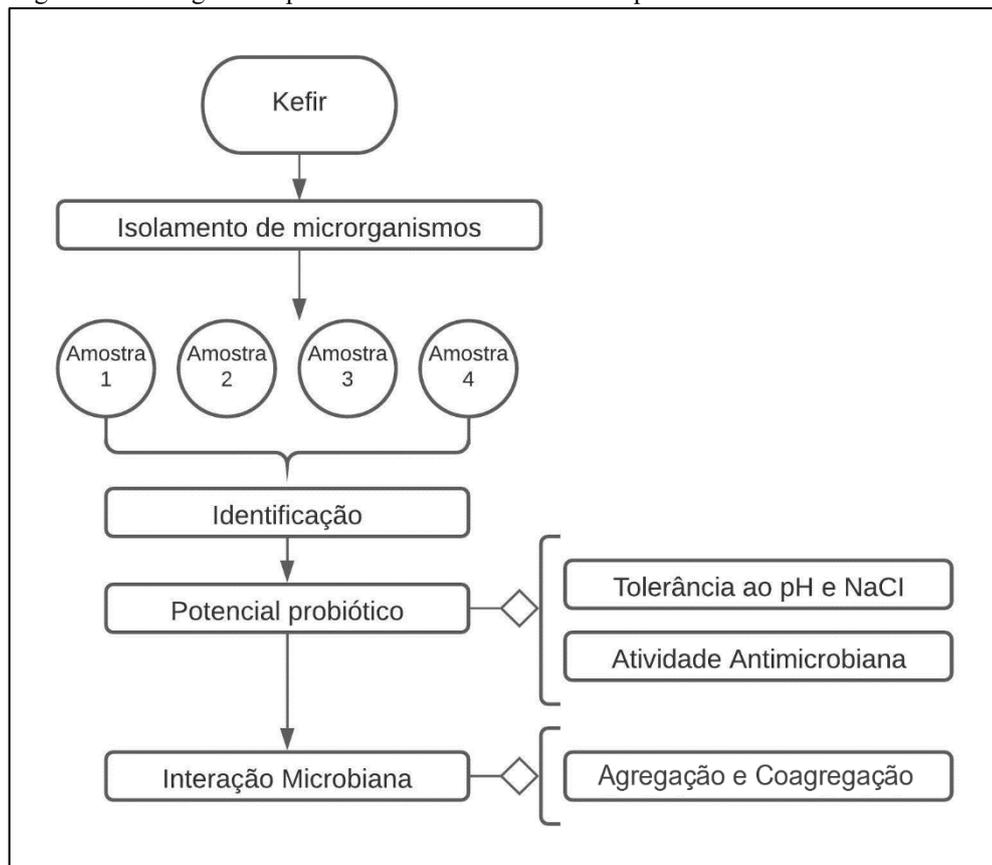
- Isolar e identificar microrganismos presentes em grãos de kefir;
- Caracterizar os isolados quanto a suas propriedades probióticas (tolerância ao cloreto de sódio e pH);
- Avaliar a capacidade de autoagregação das cepas isoladas, bem como a coagregação com cepas indicadoras (*E. coli* ATCC 11303 e *K. pneumoniae* ATCC 700603);
- Realizar *screening* de atividade antagônica dos isolados sobre o crescimento de bactérias indicadoras.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Planejamento experimental

O delineamento experimental do presente estudo encontra-se sintetizado no fluxograma ilustrado abaixo (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma representativo do delineamento experimental.



Fonte: Autoria própria (2021).

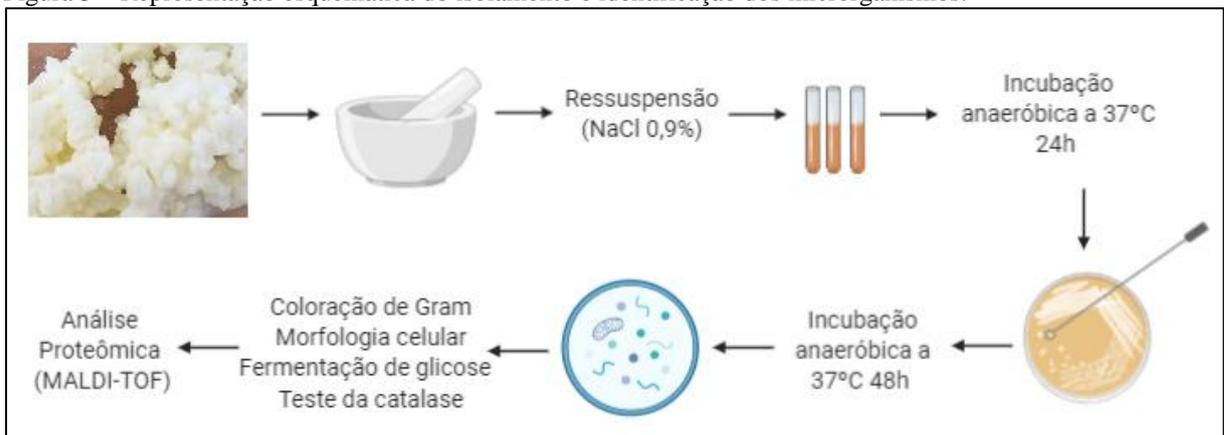
### 4.2 Obtenção e manutenção dos grãos de kefir

Os grãos de kefir foram cedidos por famílias tradicionais residentes na cidade de Sobral – CE que realizam o cultivo e o consumo domiciliar. Os grãos foram armazenados a partir de sucessivas subculturas em leite pasteurizado como substrato para o processo fermentativo. Desta maneira, dois gramas de grãos de kefir foram inoculados em 100 mL (1:50 p/v) de leite e incubados a 37°C por 48 horas. Após esse período, os grãos foram separados do leite fermentado por filtração em peneira de plástico e lavados para dar início a próxima cultura (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2001).

### 4.3 Isolamento e identificação dos microrganismos

Os grãos de kefir foram macerados com o auxílio de almofariz e pistilo esterilizados até formar uma massa uniforme, e ressuspensos em solução salina estéril (0,9 % de NaCl). Em seguida, uma alíquota de 50 µL dessa suspensão foi inoculada em diferentes meios de cultivo seletivo em caldo: *Man, Rogosa e Sharpe* (MRS) para espécies de lactobacilos; *Mitis Salivarius* (MSA) para estreptococos; glicose *Sabouraud* 4 % (SDA) para leveduras. As culturas foram incubadas a 37° C durante 24 e 48 horas com 5 % de CO<sub>2</sub>. Após o crescimento visual, alíquotas de 10 µL foram resgatadas para semeadura por estriamento em placas de Petri contendo meios de cultura específicos para isolamento dos microrganismos e incubadas nas mesmas condições para obtenção de colônias isoladas (GARROTE; ABRAHAM; DE ANTONI, 2001). A representação esquemática do isolamento e identificação das cepas bacterianas está apresentada na Figura 5.

Figura 5 – Representação esquemática do isolamento e identificação dos microrganismos.



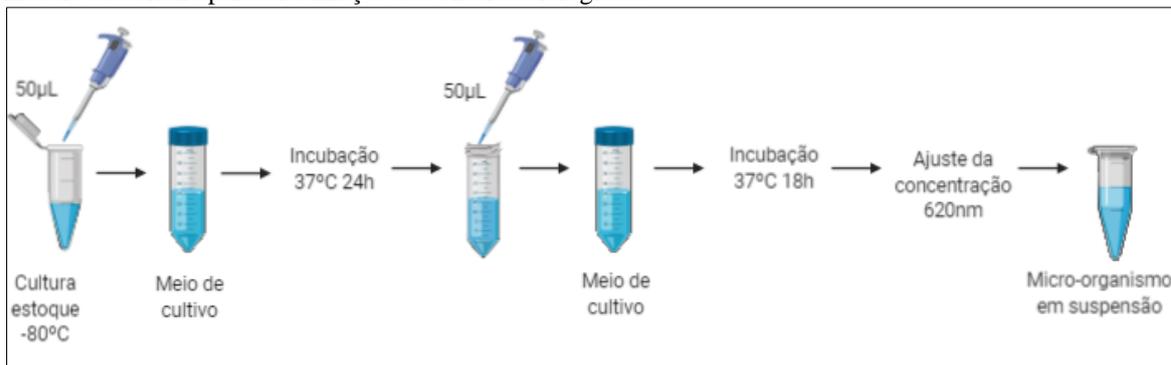
Fonte: Autoria própria (2021).

As colônias obtidas foram identificadas presuntivamente por meio dos seguintes testes morfológicos e bioquímicos: coloração de Gram, morfologia celular, fermentação de glicose e teste da catalase. A identificação final das bactérias quanto ao seu gênero e espécie foi obtida através de MALDI-TOF MS e MS/MS usando um espectrômetro ABI 4700 *Proteomics Analyzer* com óptica TOF-TOF (*Applied Biosystems, Framingham, MA*) (MORENO et al., 2018).

#### 4.4 Condições de cultivo

As cepas foram mantidas em estoque em meio adequado, em alíquotas de 200µL com 20% de glicerol a -80° C. Para a ativação das estirpes, uma alíquota inicial de 50µL foi inoculada em 5 mL de meio específico, e incubada por 24 h a 37° C. Após, a cultura foi renovada inoculando-se uma alíquota de 50µL em 5mL dos meios, mantendo as mesmas condições de cultivo. A densidade óptica (DO) foi verificada com o auxílio de um leitor de placas de microtitulação (BioTrak II, Amersham Biosciences) a 620nm, e a partir desta, foi realizado o ajuste da concentração de células para  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>), de acordo com a escala 0,5 de Mcfarland (Figura 6).

Figura 6 – Representação esquemática das condições de cultivo e do procedimento de ajuste da concentração do inóculo bacteriano para a realização dos ensaios biológicos.



Fonte: Autoria própria (2021).

#### 4.5 Ensaio de agregação e coagregação

Os ensaios de agregação foram realizados de acordo com Del Re et al. (2000) com adaptações. Após o cultivo as células foram colhidas por centrifugação a 5000 rpm por 15 min, lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão fosfato (PBS) com NaCl 0,15M. As suspensões celulares ajustadas na concentração de  $10^8$  células/mL (4 mL) foram misturadas por 10 segundos e a autoagregação foi determinada durante 5 horas de incubação à 37 °C. A cada hora, 0,2 mL da suspensão superior foi retirada e a densidade óptica (DO) foi medida a 620 nm através de um leitor de placas de microtitulação (BioTrak II, Amersham Biosciences). A porcentagem de autoagregação foi expressa como:  $1 - (DO_t / DO_0) \times 100$ , onde  $DO_t$  representa a densidade óptica nos tempos 1, 2, 3, 4 ou 5 horas, e  $DO_0$  a densidade óptica no tempo inicial. Foi considerada uma alta porcentagem de autoagregação quando maior que 40%, moderada entre 10% e 40% e, menor que 10% com fraco poder de autogregação (WANG et al., 2010).

O método para preparo das suspensões celulares para a coagregação foi o mesmo da agregação. Volumes iguais (2 mL) de cada suspensão de células foram misturados em pares por 10 s. Os tubos de controle foram montados ao mesmo tempo, contendo 4 mL de cada suspensão bacteriana por si só. A DO (620 nm) das suspensões foram medidas após mistura e após 5 horas de incubação à 37°C. A porcentagem de coagregação foi calculada usando a equação de Handley et al. (1987), conforme fórmula abaixo:

$$\text{Coagregação (\%)} = \frac{((\text{DO}_x + \text{DO}_y)/2) - \text{DO}(x + y)}{(\text{DO}_x + \text{DO}_y)/2} \times 100$$

Fonte: Handley et al. (1987). Legenda: x e y: cepas nos tubos de controle; (x + y): mistura das cepas microbianas.

#### 4.6 Tolerância ao pH e Cloreto de Sódio (NaCl)

A capacidade dos isolados para tolerar os valores de pH ácido foi determinada como descrito por Sieladie et al. (2011) 1 mL de inóculo ( $10^8$  UFC/mL) de cada isolado foi transferido para 10 mL de meio de cultivo em pH 2, 3 e 5, respectivamente, e DO foi coletada após 24 h incubado a 37°. O meio com pH 7,0 foi considerado o controle. Isolados mostrando resistência superior a 50% a pH 3 foram consideradas cepas tolerantes a pH ácido. Para a determinação da tolerância ao NaCl foi utilizada a metodologia adaptada de Hoque et al. (2010). Dez tubos contendo MRS foram ajustados com diferentes concentrações (2%, 4%, 6%, 8%, 10%) de NaCl. Após a esterilização, cada tubo foi inoculado com 1% (v/v) de cada cepa probiótica e incubado em 37 ° C durante 24h. Após a incubação a DO foi coletada após 24 h incubado a 37° contra o controle (NaCl 0%) (HOQUE et al., 2010). A porcentagem de resistência em ambos os casos (valores de pH ácido / NaCl) foi calculada conforme fórmula abaixo:

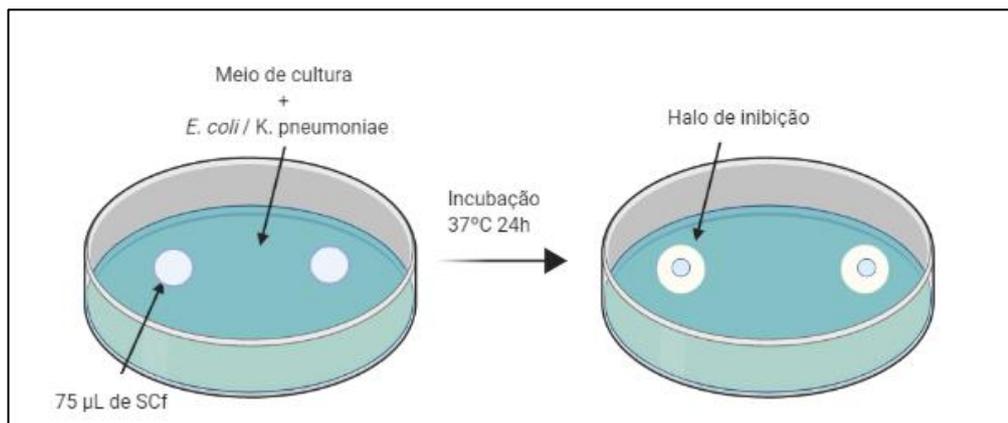
$$\text{Resistência (\%)} = \frac{\text{DO}_{\text{pH 2, 3, 5 / NaCl 2, 4, 6, 8, 10\%}}}{\text{DO}_{\text{pH 7 / NaCl 0\%}}} \times 100$$

Fonte: Vinderola; Reinheimer (2003). Legenda: DO: densidade óptica

#### 4.7 Atividade antimicrobiana (Difusão em ágar por poços)

Segundo a metodologia proposta por Chew (2015), culturas primárias das cepas isoladas foram ajustadas a  $1 \times 10^8$  UFC.mL em caldo BHI, MRS ou SDA. Em seguida, 1 mL de cultura foi adicionada a 10mL de MRS caldo e incubado nas condições adequadas para cada uma das cepas. O sobrenadante *cell-free* (SCf) foi coletado após centrifugação a 11000 g por 10 minutos e armazenado em alíquotas de 1 mL a  $-80$  °C. Para anular o efeito do pH sobre a atividade inibitória contra *E. coli* ATCC 11303 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 o SCf foi neutralizado a pH 7,0 por adição de NaOH a 4 N imediatamente antes da etapa de filtração. Para uma avaliação da atividade antimicrobiana do sobrenadante contra as cepas indicadoras foi conduzida a técnica de difusão em ágar por poços, de acordo com Tagg; McGiven (1971) com modificações (Figura 7).

Figura 7 – Representação esquemática da técnica de difusão em ágar por poços.



Fonte: Autoria própria (2021).

Cilindros inox (*Oxford cups*) de aproximadamente 5 mm foram colocados na superfície do ágar inoculado com as cepas indicadoras ( $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) e, posteriormente, cada poço foi preenchido com 75 µL de SCf. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em condições aeróbicas para permitir o crescimento da enterobactéria. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados determinados a partir da medição do diâmetro da zona de inibição (ZI) ao redor dos poços e classificados quanto a sua atividade antagônica como baixa, moderada e alta atividade, com  $ZI \leq 10$  mm (+), 11 a 14 mm (++) e  $\geq 14$  mm (+++), respectivamente, conforme (HALDER et al., 2017) com adaptações.

#### **4.8 Análise estatística**

Tratou-se de um estudo quantitativo experimental de carácter descritivo. Todos os resultados foram categorizados em Microsoft Excel (Versão 2012 para Windows) e posteriormente analisados no software GraphPad Prism (Versão 8.0 para Windows, San Diego, California USA). As diferenças significativas entre os grupos foram verificadas através da aplicação do teste Two-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,01$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Isolamento e identificação dos microrganismos

Foram isoladas quatro espécies diferentes de microrganismos a partir dos grãos de kefir. As amostras 1 e 2 apresentaram morfologia de cocos ovoides visualizados como células individuais ou arrançadas aos pares ou em cadeias e coloração positiva ao teste de Gram, sendo identificadas como *Enterococcus durans* e *Leuconostoc pseudomesenteroides*. A amostra 3 exibiu-se em forma de bastões arrançados aos pares ou em cadeias, Gram-positivos, identificadas como *Lactobacillus paracasei*. Já a amostra 4 apresentou-se em formato ovoide, dispostos como células individuais ou em cadeias, Gram-positiva, sendo identificada como *Kluyvomyces marxianus* (Quadro 1).

Quadro 1 – Identificação das estirpes isoladas de grãos de kefir.

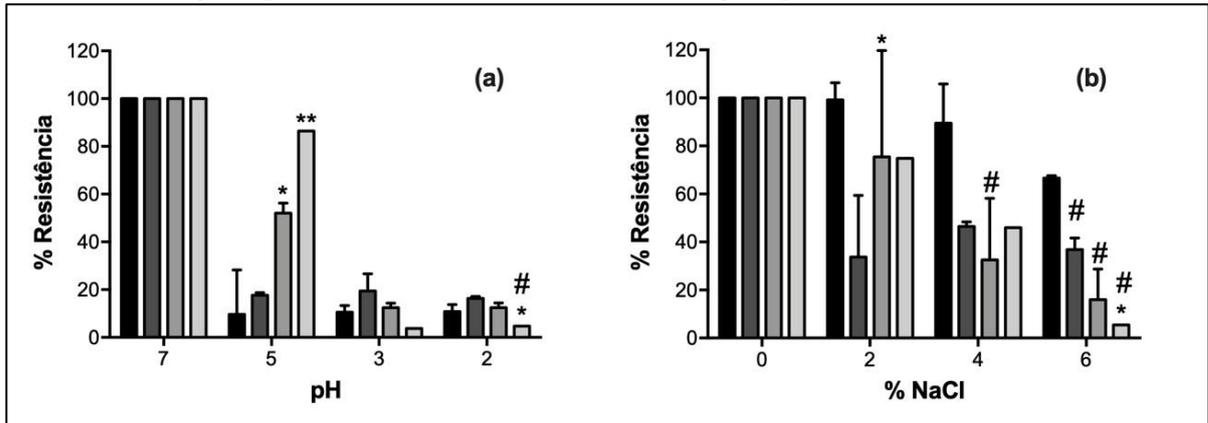
Amostras	Meio de cultura	Gram	Morfologia	Identificação (MALDI-TOF)
1	MSA	Positivo	Cocos	<i>Enterococcus durans</i>
2	MRS	Positivo	Cocos	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
3	MRS	Positivo	Bastão	<i>Lactobacillus paracasei</i>
4	SDA	Positivo	Ovoide	<i>Kluyvomyces marxianus</i>

Fonte: Autoria própria (2021).

### 5.2 Tolerância ao pH e Cloreto de Sódio (NaCl)

No ensaio de tolerância ao pH não foi observado crescimento no pH 2, 3 e 5, exceto para os isolados *L. paracasei* e *K. marxianus* no pH 5, cujo percentual de resistência foram 52,03 % e 86,45 %, respectivamente. No que diz respeito ao NaCl, todas as estirpes apresentaram resistência (> 50%) na concentração de 2% de sal, exceto o *L. pseudomesenteroides* ( $33,78 \pm 16,41$ ). Em concentrações acima de 4%, apenas *E. durans* ( $89,43 \pm 16,35$ ) apresentou resistência (Figura 8).

Figura 8 – Percentual de resistência ao pH e NaCl de *E. durans* (■); *L. pseudomesenteroides* (▣), *L. paracasei* (▢) *K. marxianus* (□). Foram considerados estatisticamente significantes  $p < 0,01$ . # diferente em relação *E. durans*; \*diferente em relação *L. pseudomesenteroides*; \*\*diferente em relação *L. paracasei*.

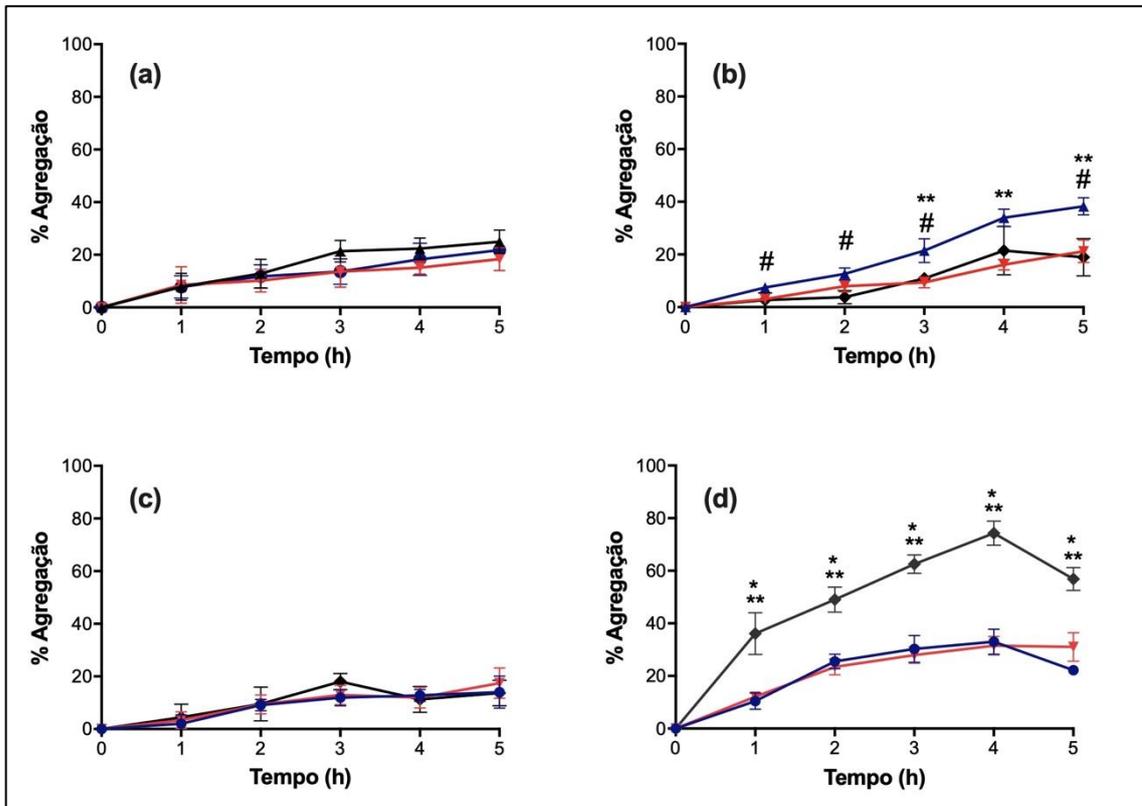


Fonte: Autoria própria (2021).

### 5.3 Ensaio de agregação e coagregação

De um modo geral, todos os isolados apresentaram capacidade de interagir entre si após incubação. Foi observado um forte poder de autoagregação pelo *K. marxianus* (56,90%), enquanto *E. durans* (24,92%), *L. paracasei* (18,97%), *L. pseudomesenteroides* (13,74%) apresentaram uma moderada agregação, conforme a Figura 9. A capacidade de interação das quatro cepas individualmente foi diretamente proporcional ao tempo de incubação, com destaque para *K. marxianus* que alcançou o maior potencial agregativo, logo após a primeira hora (36 %) de incubação, chegando a 75 % após 4 horas (Figura 9D).

Figura 9 – Percentual de autoagregação dos micro-organismos isolados de grão de kefir e coagregação com cepas indicadoras. (a) *E. durans*; (b) *L. paracasei*; (c) *L. pseudomesenteroides*; (d) *K. marxianus*. (■) isolado; (▲) isolado+*K. pneumoniae*; (▼) isolado+*E. coli*. Foram considerados estatisticamente significantes  $p < 0,01$ . # diferente em relação ao isolado; \* diferente em relação ao isolado + *K. pneumoniae*; \*\* diferente em relação ao isolado + *E. coli*.



Fonte: Autoria própria (2021).

Quando adicionado às cepas indicadoras, *E. coli* e *K. pneumoniae*, para avaliar a coagregação com os isolados, *E. durans* e *L. pseudomesenteroides* (figura 1A e 1C) não demonstram nenhuma interferência na formação de agregados. Entretanto, foi possível perceber que a capacidade de agregação da *K. marxianus* reduziu de forma significativa ( $p < 0,01$ ) quando associado as cepas indicadoras. Enquanto apenas a cepa de *K. pneumoniae* interferiu na resposta de agregação de *L. paracasei*, elevando em 40 % após 5 horas, quando comparado ao isolado individualmente ( $p < 0,01$ ).

#### 5.4 Atividade Antimicrobiana

A análise da atividade antimicrobiana a partir da difusão em ágar por poços revelou que todos os sobrenadantes dos quatro isolados foram capazes de inibir o crescimento de bactérias patogênicas (Tabela 1).

Tabela 1 – Inibição (mm) do isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, após tratamento com os sobrenadantes *cell-free* neutralizado obtidos de cepas provenientes de grãos de kefir.

Amostra	Inibição ± D.P. (mm)			
	<i>E. coli</i>		<i>K. pneumoniae</i>	
<i>Enterococcus durans</i>	12,50 ± 2,89	++	9,67 ± 1,53	+
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	14,0 ± 1,00	++	11,00 ± 0,50	++
<i>Lactobacillus paracasei</i>	14,67 ± 0,60	+++	14,33 ± 2,08	+++
<i>Kluyvomyces marxianus</i>	6,67 ± 5,77	+	9,00 ± 1,00	+

Fonte: Autoria Própria. D.P.: Desvio padrão das médias de inibição. + baixa inibição ( $\leq 10$  mm); ++ inibição moderada (11mm - 14mm); alta inibição (>14mm). (HALDER et al., 2017).

A partir da análise dos percentuais observa-se que o *L. paracasei* apresentou alta inibição contra a *E. coli* (14,67 mm) e *K. pneumoniae* (14,33 mm). Por sua vez, o *L. pseudomesenteroides* obteve uma atividade inibitória moderada, perfazendo 14,0 mm e 11,0 mm para as respectivas cepas indicadoras. O isolado *E. durans* apresentou ação antagônica moderada contra a *E. coli* (12,50 %) e baixo poder de inibição contra a *K. pneumoniae* (9,67 mm). Já, a *K. marxianus* exibiu um baixo poder antagônico contra as duas cepas patogênicas, representando 9,00 mm para *K. pneumoniae* e 6,67 mm para *E. coli*.

Face ao exposto, destaca-se a alta atividade antimicrobiana demonstrada pelo *L. paracasei* e moderada ação antagônica do *L. pseudomesenteroides* contra as duas cepas indicadoras, o que lhes confere uma atividade antimicrobiana superior ao dos demais isolados utilizados no estudo. Em contraponto, *K. marxianus* apresentou uma menor ação antagônica quando comparada aos demais microrganismos.

## 6 DISCUSSÃO

O kefir é uma fonte rica em microrganismos potencialmente probióticos (PLESSAS et al., 2020). Destacam-se as bactérias do ácido lático, do ácido acético e leveduras pertencentes a diferentes gêneros e espécies, assim como seus metabólitos oriundos da fermentação que podem contribuir para propriedades benéficas à saúde (AJAM; KOOHSARI, 2021; BENGGOA et al., 2018; KIM; KIM; SEO, 2020). Sabe-se que a composição microbiana do kefir varia dependendo da origem geográfica do grão, método e substrato empregado na produção (GAROFALO et al., 2015). Porém, há de se considerar que, apesar da diversificada comunidade microbiana, esses microrganismos agem através de mecanismos similares no organismo, como o potencial efeito probiótico, a produção de peptídeos bioativos, aminas biogênicas, e conversão de compostos fenólicos em produtos biologicamente ativos, bem como a redução de antinutrientes (DIMIDI et al., 2019).

No presente estudo foram detectadas espécies frequentemente relacionadas com a composição do kefir, *E. durans*, *L. pseudomesenteroides*, *L. paracasei*, *K. marxianus*, também citados anteriormente por outros estudos (Carasi et al. (2014), Zanirati et al. (2015), Kotova; Cherdyntseva; Netrusov (2016), Han et al. (2018), Talib et al. (2019), Hecer; Ulusoy; Kaynarca (2019), Kim et al. (2019b), Chang-Liao et al. (2020), Purutoglu et al. (2020), De Almeida Brasiel et. al (2021)). Do ponto de vista científico, o uso terapêutico desses isolados tem sido amplamente pesquisado e suas propriedades estão se tornando populares principalmente pela alta resistência a condições ambientais adversas (LIMA et al., 2017). Para isso, os isolados precisam ter a capacidade de sobreviver às condições do trato gastrointestinal humano (TGI), como as alterações de pH, sais biliares no suco pancreático e diferentes enzimas digestivas, para posteriormente colonizar o cólon (BENGGOA et al., 2017). Diante de tal circunstância, a investigação inicial do comportamento de cada microrganismo sob condições que simulam o ambiente gástrico é primordial para a caracterização de cepas com potenciais probióticos.

A partir desse princípio, o pH do suco gástrico é considerado um dos principais fatores que afetam a sobrevivência dessas estirpes durante a passagem pelo estômago (MANTZOURANI et al., 2018). Tanto Bengoa et al. (2017) como Mantzourani et al. (2018) e Sornsenee et al. (2021) destacam níveis satisfatórios de viabilidade do *L. paracasei*, nos valores de pH entre 2,0 e 4,0, critério essencial para que a cepa possa ser considerada probiótica, resultado esse que se assemelha ao encontrado na presente pesquisa, cujo percentual de resistência no pH 5 foi 52,03 %.

Concomitantemente, *K. marxianus* obteve 86,45% de tolerância ao pH ácido. Tal fato assemelha-se a elucidação proposta por Reyes-Sánchez et al. (2019) que destacam sua alta produção de metabólitos e biomassa, além da alta taxa de crescimento, uma característica microbiológica que lhe diferencia dentre os demais microrganismos. Fundamentados nesses dados, Moradi et al. (2018) isolaram e identificaram essa levedura do grão de kefir e os microrganismos foram capazes de tolerar uma temperatura de 37 ° C, pH de 1,5 e resistir à concentração de 5% de sal biliar. No presente estudo, estes microrganismos demonstraram resistência a partir do pH 5. Porém, há de se considerar que essa tolerância ocorreu após uma exposição de longa duração (24 h), tempo superior quando comparado a passagem pela cavidade gástrica.

Outra propriedade importante é a capacidade de autoagregação e coagregação, definidas como a interação entre micro-organismos intra ou interespecíficos (CAMPANA; VAN HEMERT; BAFFONE, 2017). Tais fenômenos estão diretamente relacionados aos efeitos benéficos dos probióticos, uma vez que a autoagregação favorece a adesão desses microrganismos às células epiteliais, critério essencial para a colonização e persistência no trato gastrointestinal (NAMI et al., 2019). Enquanto que a coagregação impede a colonização da superfície intestinal dos microrganismos potencialmente patogênicos, por competição por receptores celulares (NAMI et al., 2019). Em conformidade com a classificação proposta por Wang et al. (2010) e Han et al. (2018), os resultados do presente estudo detectaram uma forte capacidade de autoagregação de *K. marxianus*, representada por um percentual de 81,6% e 56,90%, respectivamente. Por sua vez, Tareb et. al (2013) e Nami et al. (2019) detectaram que a autoagregação das estirpes aumenta proporcionalmente ao tempo de incubação, o que favorecerá a sua a colonização e persistência no trato gastrointestinal.

Em relação à capacidade de coagregação, os resultados encontram-se em consonância com Campana; Van Hemert; Baffone (2017), onde os isolados apresentaram capacidade de interação variáveis de acordo com as cepas utilizadas e do tempo de incubação. Os autores justificam tal fato pela presença de moléculas específicas na superfície dos isolados, atuando como ligantes de patógenos e / ou como adesinas para fixação às células epiteliais. Salienta-se que os isolados de *K. marxianus* apresentaram uma autoagregação relativamente superior quando comparado a coagregação com as cepas indicadoras. Tal fato pressupõe que há uma maior colonização desses isolados com potencial probiótico no trato gastrintestinal, sendo considerado um efeito benéfico para a microbiota.

A respeito das propriedades antimicrobianas dos isolados de BAL's, esta característica está relacionada à produção de metabólitos, como peróxido de hidrogênio,

bacteriocina e ácidos orgânicos, que podem reduzir o pH do ambiente (DIAS; SILVA; TIMM, 2018). Acrescenta-se a competição de nutrientes, fortalecimento da barreira intestinal, bloqueio dos sítios de adesão e sítios receptores de toxinas, além de removê-los por coagregação, conforme descrito anteriormente (MIKELSAAR; ZILMER, 2009; WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017). Sua aplicabilidade também está associada a segurança alimentar e vida útil de produtos comercializados, evitando a colonização de bactérias patogênicas (YAZGAN et al., 2021).

Dentre as cepas com essa atividade antagônica destaca-se o *L. paracasei*, caracterizados como “geralmente considerados seguros” (*status* GRAS) de acordo com a *American Food and Drug Administration* devido ao seu longo histórico de uso seguro em alimentos fermentados e sua presença na microbiota intestinal e urogenital normal de humanos (UNITED; ORGANIZATION; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006) Ressalta-se a alta ação antimicrobiana dessa cepa, evidenciada no presente estudo, contra a *E. coli* (14,67 %) e *K. pneumoniae* (14,33 %). O mesmo foi encontrado no estudo de Ghane; Babaeekhou; Ketabi (2020) ao identificar o potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* isoladas de kefir e avaliar suas atividades antimicrobiana e antibiofilme frente a *Escherichia coli*. Os autores detectaram que o *L. paracasei* destacou-se por seu potencial probiótico, capacidade de inibição do biofilme e atividade antibacteriana (REFs). Romero-Luna et al. (2020) também avaliaram as propriedades probióticas desse isolado e verificaram uma tolerância às condições gástrica e intestinal simulada, além da significativa ação antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (ROMERO-LUNA et al., 2020). Dado o exposto, evidencia-se o papel antimicrobiano desse isolado frente a cepas patogênicas.

Vários autores também têm evidenciado a ação antagônica do gênero *Leuconostoc*, em conformidade com os achados do presente estudo (DE OLIVEIRA COELHO et al., 2019; THANGAVEL; SUBRAMANIYAM, 2019). Ao isolar esse microrganismo de uma bebida funcional de kefir à base mel, De Oliveira Coelho et al. (2019b) detectaram sua ação antipatogênica contra *E. coli* e *Staphylococcus aureus*. Já Thangavel; Subramaniyam (2019), identificaram esses isolados em carne indiana e, similarmente, confirmaram sua atividade antimicrobiana contra patógenos alimentares. Não foram encontradas evidências científicas sobre a atividade antimicrobiana da espécie isolada em grãos de kefir.

A partir da avaliação da viabilidade microbiana, é possível comprovar que a cepa probiótica irá influenciar na composição da microbiota intestinal (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2017). Nesse contexto, o presente estudo

constata a aplicabilidade de cepas isoladas de grãos de kefir e assegura a hipótese de que esses microrganismos com potenciais probióticos exercem ação antagônica contra patógenos intestinais e possuem propriedades de interações interespecies, através de diferentes mecanismos e características probióticas. Tal elucidação propõe a utilização de diferentes cepas probióticas a fim de garantir maiores benefícios à saúde.

Salienta-se que, apesar da comprovação dos potenciais terapêuticos dos probióticos, é preciso ter cautela na utilização em bebês sob cuidados neonatais ou indivíduos com algumas condições clínicas, incluindo doenças malignas, intestino permeável, diabetes mellitus e pós-transplante de órgão (KOTHARI; PATEL; KIM, 2019). Esses microrganismos podem ocasionar a translocação bacteriana, induzindo infecções oportunistas e, como consequência, desenvolvendo pneumonia, endocardite e sepse (ZAWISTOWSKA-ROJEK; TYSKI, 2018).

## 7 CONCLUSÃO

Os isolados microbianos obtidos a partir dos grãos de kefir apresentaram características probióticas, com destaque para o *L. paracasei* e *K. maxianus* que evidenciaram uma maior tolerância ao pH ácido e uma forte capacidade de auto agregação e coagregação. Além disso, é importante destacar a forte ação antimicrobiana do *L. paracasei* contra *E. coli* e *K. pneumoniae*, o que sugere sua capacidade de estabelecer uma barreira intestinal contra patógenos. Adiciona-se que o presente estudo realizou uma série de ensaios *in vitro* para avaliar as propriedades probióticas dos microrganismos e a viabilidade de cada cepa específica em condições que simulam o trato gastrointestinal. No entanto, esses isolados devem ser submetidos à validação experimental em modelos animais e posterior ensaio clínico em seres humanos para confirmação de seu potencial probiótico. Ademais, a futura confirmação de suas propriedades biotecnológicas pode contribuir para o desenvolvimento de culturas iniciadoras para utilização no processo de fermentação industrial de laticínios.

## REFERÊNCIAS

- AJAM, F.; KOOHSARI, H. The Effect of Some Fermentation Conditions on the Production of Kefiran by Kefir Grains in Fermented Milk. **Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology**, v. 9, p. 399–410, 2021.
- ALBERGARIA, H.; ARNEBORG, N. Dominance of *Saccharomyces cerevisiae* in alcoholic fermentation processes: role of physiological fitness and microbial interactions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2035–2046, 2016.
- ARANDA et al. Yeast Life Span and its Impact on Food Fermentations. **Fermentation**, v. 5, n. 2, p. 37, 2019.
- AWOJOBI, K. O.; ADEYEMO, S. M.; SANUSI, O. O. Biosynthesis of Antimicrobial Compounds by Lactic Acid Bacteria and Its Use as Biopreservative in Pineapple Juice. **Frontiers in Science**, v. 6, n. 1, p. 17–24, 2016.
- AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2017.
- BENGOA, A. A. et al. Simulated gastrointestinal conditions increase adhesion ability of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from kefir to Caco-2 cells and mucin. **Food Research International**, v. 103, p. 462–467, 2017.
- BENGOA, A. A. et al. Kefir micro-organisms: their role in grain assembly and health properties of fermented milk. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 686–700, 2018.
- BLACKWOOD, B. P. et al. Probiotic *Lactobacillus* Species Strengthen Intestinal Barrier Function and Tight Junction Integrity in Experimental Necrotizing Enterocolitis. **Journal of Probiotics & Health**, v. 05, n. 01, p. 1–10, 2017.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Anvisa, 2018.
- CAMERON, D. et al. Probiotics for gastrointestinal disorders: Proposed recommendations for children of the Asia-Pacific region. **World Journal Gastroenterology**, v. 23, n. 45, p. 7952–7964, 2017.
- CAMPANA, R.; VAN HEMERT, S.; BAFFONE, W. Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 1, p. 12, 2017.
- CARASI, P. et al. Safety and potential beneficial properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 1, p. 193–200, 2014.
- CARNEIRO, V. A. et al. Essential Oils as an Innovative Approach against Biofilm of

Multidrug-Resistant Staphylococcus aureus. In: **Bacterial Biofilms**. London: Intechopen, 2020. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/bacterial-biofilms/essential-oils-as-an-innovative-approach-against-biofilm-of-multidrug-resistant-em-staphylococcus-au>. Acesso em 13 dez. 2020.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281–370, 2002.

CASSANEGO, D. B. et al. Leveduras: diversidade em kefir, potencial probiótico e possível aplicação em sorvete. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 175–185, 2015.

CHANG-LIAO, W. P. et al. Isolation of a Leuconostoc mesenteroides Strain With Anti-Porcine Epidemic Diarrhea Virus Activities From Kefir Grains. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1–20, 2020.

CHEW, S. Y. et al. Probiotic Lactobacillus rhamnosus GR-1 and Lactobacillus reuteri RC-14 exhibit strong antifungal effects against vulvovaginal candidiasis-causing Candida glabrata isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 5, p. 1180–1190, 2015.

COWAN, T. Biofilms and their management: from concept to clinical reality. **Journal of Wound Care**, v. 20, n. 5, p. 220–226, 2011.

DE ALMEIDA BRASIEL, P. G. et al. Microbial community dynamics of fermented kefir beverages changes over time. **International Journal of Dairy Technology**, p. 1471–1477, 2021.

DE OLIVEIRA COELHO, B. et al. In Vitro Probiotic Properties and DNA Protection Activity of Yeast and Lactic Acid Bacteria Isolated from A Honey-Based Kefir Beverage. **Foods**, v. 8, n. 10, p. 485, 2019.

DE ROOS, J.; DE VUYST, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 115–119, 2018.

DE SAINZ, I. et al. Short communication: Effect of different kefir grains on the attributes of kefir produced with milk from Costa Rica. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 215–219, 2020.

DEL RE, B. et al. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, n. 6, p. 438–442, 2000.

DEVEAU, A. et al. Bacterial–fungal interactions: ecology, mechanisms and challenges. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 3, p. 335–352, 2018.

DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE GRÃOS DE KEFIR. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, p. 1–8, 17 maio 2018.

DO CARMO, M. S. et al. Probiotics, mechanisms of action, and clinical perspectives for diarrhea management in children. **Food & Function**, v. 9, n. 10, p. 5074–5095, 2018.

ERDOGAN, F. S. et al. The effect of kefir produced from natural kefir grains on the intestinal

microbial populations and antioxidant capacities of Balb/c mice. **Food Research International**, v. 115, p. 408–413, jan. 2019.

FARAG, M. A. et al. The Many Faces of Kefir Fermented Dairy Products: Quality Characteristics, Flavour Chemistry, Nutritional Value, Health Benefits, and Safety. **Nutrients**, v. 12, n. 2, p. 346, 2020.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk With Live Lactic Acid Bacteria**. Cordoba, Argentina: 2001.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Probiotics in food Health and nutritional properties and guidelines for evaluation FAO FOOD AND NUTRITION PAPER. **Food and Nutrition Paper**, 2006.

GAMBA, R. R. et al. Chemical, Microbiological, and Functional Characterization of Kefir Produced from Cow's Milk and Soy Milk. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1–11, 2020.

GARCIA, C. A.; ARRÁZOLA, G. S.; DURANGO, A. M. Producción de Ácido Láctico por Via Biotecnológica. **Temas Agrarios**, v. 15, n. 2, p. 9–26, 2010.

GAROFALO, C. et al. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food Microbiology**, v. 49, p. 123–133, 2015.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, n. 4, p. 639–652, 2001.

GEORGE KERRY, R. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927–939, 2018.

GHANE, M.; BABAEKHO, L.; KETABI, S. S. Antibiofilm activity of kefir probiotic lactobacilli against uropathogenic escherichia coli (Upec). **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 221–229, 2020.

GOMES, R. J. et al. Acetic Acid Bacteria in the Food Industry: Systematics, Characteristics and Applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, p. 139–151, 2018.

GORDON, S. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 12, p. 3257–3264, 2008.

GUT, A. M. et al. Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. **Journal of Functional Foods**, v. 58, p. 56–66, 2019.

HALDER, D. et al. Indigenous probiotic Lactobacillus isolates presenting antibiotic like activity against human pathogenic bacteria. **Biomedicines**, v. 5, n. 2, p. 1–11, 2017.

- HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.
- HAN, X. et al. Investigation of microorganisms involved in kefir biofilm formation. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 111, n. 12, p. 2361–2370, 2018.
- HANDLEY, P. S. et al. A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, n. 11, p. 3207–3217, 1987.
- HANEY, E. F. et al. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. **Biomolecules**, v. 8, n. 2, p. 1–22, 2018.
- HECER, C.; ULUSOY, B.; KAYNARCA, D. Effect of different fermentation conditions on composition of kefir microbiota. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 401–409, 2019.
- HERNÁNDEZ-AQUINO, S. et al. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria to Improve Shelf Life of Raw Meat. **Biocontrol Science**, v. 24, n. 4, p. 185–192, 2019.
- HOQUE, M. Z. et al. Isolation, Identification and Analysis of Probiotic Properties of *Lactobacillus* Spp. From Slective Regional Yoghurts. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 5, n. 1, p. 39–46, 2010.
- ISLAM, S. U. Clinical Uses of Probiotics. **Medicine**, v. 95, n. 5, p. 1–5, 2016.
- KARIM, A.; GERLIANI, N.; AİDER, M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, p. 1–24, 2020.
- KECHAGIA, M. et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. **ISRN Nutrition**, v. 2013, p. 1–7, 2013.
- KIM, D.-H. et al. Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 11, p. 1782–1793, 2019a.
- KIM, D. H. et al. Modulation of the intestinal microbiota of dogs by kefir as a functional dairy product. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 5, p. 3903–3911, 2019b.
- KIM, D.; KIM, H.; SEO, K. Microbial composition of Korean kefir and antimicrobial activity of *Acetobacter fabarum* DH1801. **Journal of Food Safety**, v. 40, n. 1, p. 1–9, 2020.
- KOTHARI, D.; PATEL, S.; KIM, S. K. Probiotic supplements might not be universally-effective and safe: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, n. December 2018, p. 537–547, 2019.
- KOTOVA, I. B.; CHERDYNTSEVA, T. A.; NETRUSOV, A. I. Russian kefir grains

microbial composition and its changes during production process. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 932, p. 93–121, 2016.

LIMA, M. DOS S. F. DE et al. Saccharomyces cerevisiae from Brazilian kefir-fermented milk: An in vitro evaluation of probiotic properties. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 670–677, 2017.

ŁOPUSIEWICZ, Ł. et al. The Effect of Fermentation with Kefir Grains on the Physicochemical and Antioxidant Properties of Beverages from Blue Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) Seeds. **Molecules**, v. 25, n. 24, p. 5791, 2020.

LYNCH, K. M. et al. Physiology of Acetic Acid Bacteria and Their Role in Vinegar and Fermented Beverages. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 3, p. 587–625, 2019.

MANTZOURANI, I. et al. Application of A Novel Potential Probiotic *Lactobacillus paracasei* Strain Isolated from Kefir Grains in the Production of Feta-Type Cheese. **Microorganisms**, v. 6, n. 4, p. 121, 2018.

MARCO, M. L. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on fermented foods. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 18, n. 3, p. 196–208, 2021.

MASOOD, M. I. et al. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 91–98, 2011.

MELKONIAN, C. et al. Finding Functional Differences Between Species in a Microbial Community: Case Studies in Wine Fermentation and Kefir Culture. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–16, 2019.

MENEZES, A. G. T. et al. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 12, n. 1, p. 280–288, 2020.

MIKELSAAR, M.; ZILMER, M. *Lactobacillus fermentum* ME-3 – an antimicrobial and antioxidative probiotic. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 21, n. 1, p. 1–27, 2009.

MIQUEL, S. et al. Anti-biofilm Activity as a Health Issue. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 592, p. 1–14, 2016.

MORADI, R. et al. Screening and characterization of in-vitro probiotic criteria of *saccharomyces* and *kluuyveromyces* strains. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 123–131, 2018.

MORENO, L. Z. et al. Identification through MALDI-TOF mass spectrometry and antimicrobial susceptibility profiling of bacterial pathogens isolated from sow urinary tract infection. **Veterinary Quarterly**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2018.

NAMI, Y. et al. Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 300, p. 1–13, 2019.

NEJATI, F.; JUNNE, S.; NEUBAUER, P. A Big World in Small Grain: A Review of Natural Milk Kefir Starters. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, p. 192, 2020.

NET, M. E. S. M. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 11, p. 506–514, 2014.

NURCHOLIS, M. et al. Integration of comprehensive data and biotechnological tools for industrial applications of *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 2, p. 475–488, 2020.

OTLES, S.; CAGINDI, O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 54–59, 2003.

ÖZOGUL, F.; HAMED, I. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 10, p. 1660–1670, 2017.

PAPADIMITRIOU, K. et al. Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 837–890, 2016.

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 30, p. 67–78, 2016.

PLESSAS, S. et al. Microbiological Exploration of Different Types of Kefir Grains. **Fermentation**, v. 3, n. 1, p. 1–10, 2016.

PRADO, M. R. et al. Milk kefir: Composition, microbial cultures, biological activities, and related products. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–10, 2015.

PURUTOĞLU, K. et al. Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 1, p. 57–66, 2020.

QUINTERO, P. M. J. V. Bacterias del Ácido Láctico un Potencial para la Producción de Alimentos Probióticos Fermentados en la Industria Láctea de Panamá. **Knowledge Eneering**, v. 3, n. 1, p. 38, 2018.

RAGHUWANSHI, S. et al. Probiotics: Nutritional Therapeutic Tool. **Journal of Probiotics & Health**, v. 06, n. 01, p. 1–8, 2018.

RASPOR, P.; GORANOVIČ, D. Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 101–124, 2008.

REYES-SÁNCHEZ, F. J. et al. Study of the Enzymatic Capacity of *Kluyveromyces marxianus* for the Synthesis of Esters. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1–6, p. 1–9, 2019.

RINGØ, E. et al. Lactic acid bacteria in finfish-An update. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. AUG, p. 1–37, 2018.

- RIZZOLI, R.; BIVER, E. Are Probiotics the New Calcium and Vitamin D for Bone Health? **Current Osteoporosis Reports**, v. 18, n. 3, p. 273–284, 2020.
- ROMERO-LUNA, H. E. et al. Probiotic Potential of *Lactobacillus paracasei* CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos). **Current Microbiology**, v. 77, n. 10, p. 2584–2592, 2020.
- ROSA, D. D. et al. Milk kefir : nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition Research Reviews**, v. 30, n. 1, p. 82–96, 2017.
- ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 522–554, 2018.
- SAICHANA, N. et al. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1260–1271, 2015.
- SÁNCHEZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 61, n. 1, p. 1–15, 2017.
- SCHIEBEL, J. et al. Genotypic and phenotypic characteristics associated with biofilm formation by human clinical *Escherichia coli* isolates of different pathotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 24, 2017.
- SHOKRYAZDAN, P. et al. Probiotics: From Isolation to Application. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 36, n. 8, p. 666–676, 2017.
- SIELADIE, D. et al. Probiotic properties of lactobacilli strains isolated from raw cow milk in the Western highlands of Cameroon. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 12–18, 2011.
- SINDI, A.; BADSHA, M. B.; ÜNLÜ, G. Bacterial populations in international artisanal kefirs. **Microorganisms**, v. 8, n. 9, p. 1–15, 2020.
- SORNSENEE, P. et al. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Species Isolated from Fermented Palm Sap in Thailand. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 1, p. 3, 2021.
- STAVROPOULOU, E.; BEZIRTZOGLU, E. Probiotics in Medicine: A Long Debate. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- STEENSELS, J. et al. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 5, p. 947–995, 2014.
- SUEZ, J. et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. **Nature Medicine**, v. 25, n. 5, p. 716–729, 2019.
- TAGG, J. R.; MCGIVEN, A. R. Assay system for bacteriocins. **Applied microbiology**, v. 21, n. 5, p. 943, 1971.
- TALIB et al. Isolation and Characterization of *Lactobacillus* spp. from Kefir Samples in Malaysia. **Molecules**, v. 24, n. 14, p. 2–18, 2019.

THANGAVEL, G.; SUBRAMANIYAM, T. Antimicrobial efficacy of *Leuconostoc* spp. Isolated from Indian Meat against *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* in Spinach Leaves. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 4, p. 677–685, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED/ WORLD HEALTH NATIONS ORGANIZATION. **Standard for Fermented Milks**. Codex Alimentarius International Food Standards, 2018.

VASUDEVAN, R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 1, n. 3, p. 1–16, 2014.

VERDEROSA, A. D.; TOTSIKA, M.; FAIRFULL-SMITH, K. E. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 824, p. 1–17, 2019.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, n. 9–10, p. 895–904, 2003.

VUOTTO, C.; LONGO, F.; DONELLI, G. Probiotics to counteract biofilm-associated infections: promising and conflicting data. **International Journal of Oral Science**, v. 6, n. 4, p. 189–194, 2014.

WANG, C.; CUI, Y.; QU, X. Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 2, p. 195–201, 2017.

WANG, L. Q. et al. Influence of cell surface properties on adhesion ability of bifidobacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1999–2007, 2010.

WANG, S. Y. et al. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 274–285, 2012.

WANG, Y. et al. *L. pseudomesenteroides* and *L. johnsonii* isolated from yaks in Tibet modulate gut microbiota in mice to ameliorate enteroinvasive *Escherichia coli*-induced diarrhea. **Microbial Pathogenesis**, v. 132, p. 1–9, 2019.

WATANABE, D.; TAKAGI, H. Yeast prion-based metabolic reprogramming induced by bacteria in fermented foods. **FEMS yeast research**, v. 19, n. 6, 2019.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION. **World Gastroenterology Organization World Guidelines - Probiotics and Prebiotics**, 2017.

YAN, F.; POLK, D. B. Probiotics and Probiotic-Derived Functional Factors—Mechanistic Insights Into Applications for Intestinal Homeostasis. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1428, p. 1–12, 2020.

YAZGAN, H. et al. The antimicrobial properties and biogenic amine production of lactic acid bacteria isolated from various fermented food products. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 1, p. e15085, 28 jan. 2021.

ZANIRATI, D. F. et al. Selection of lactic acid bacteria from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70–76, 2015.

ZAWISTOWSKA-ROJEK, A.; TYSKI, S. Are probiotic really safe for humans? **Polish Journal of Microbiology**, v. 67, n. 3, p. 251–258, 2018.

ZHOU, Z. et al. Engineering probiotics as living diagnostics and therapeutics for improving human health. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 56, 2020.

ŻYMAŃCZYK-DUDA, E. et al. Yeast as a Versatile Tool in Biotechnology. In: **Yeast - Industrial Applications**. London: Intechopen, 2017.