

ATIVIDADE ANTI-*ESCHERICHIA COLI* EM KEFIR E SORO DE KEFIR TRADICIONAIS¹

Anti-Escherichia coli activity in traditional kefir and kefir whey¹

Simone Weschenfelder²

José Maria Wiest³

Heloisa Helena Chaves Carvalho⁴

SUMÁRIO

Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se, *in vitro*, a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/bactericidia) de kefir e soro de kefir tradicionais, não submetidos a tratamento térmico, padronizados em relação ao tipo de leite e ao binômio tempo/temperatura de incubação e maturação, frente a inóculo padronizado de *Escherichia coli* (ATCC 11229) microrganismo indicador de interesse em alimentos. Kefir é um leite fermentado produzido pela adição de grãos de kefir ao leite, constituindo uma associação simbiótica entre bactérias ácido lácticas, bactérias ácido acéticas e leveduras envolvidas por uma matriz de polissacarídeos, o kefiran, enquanto o soro é o produto obtido da filtração do kefir. Tanto o kefir, quanto o soro de kefir apresentaram capacidade de inibição e inativação máximas sobre o inóculo bacteriano em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL.

Palavras-chave: kefir tradicional; atividade antibacteriana do kefir; inibição bacteriana; inativação bacteriana.

1 INTRODUÇÃO

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm merecendo lugar de destaque nos meios científicos, isso se deve ao grande número de produtos existentes e uma tendência atual ao consumo de produtos naturais. Dentre esses produtos destacam-se os leites fermentados, que são resultantes da fermentação microbiológica do leite (BASTOS, 1995).

Kefir é um leite fermentado, ligeiramente efervescente e espumoso, de fácil preparo e economicamente acessível, originado da ação da microbiota natural presente nos grãos ou grumos de kefir (WITTHUHN *et al.*, 2004; MARCHIORI, 2007). Estes são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envolvidas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran, apresentando tamanhos variados entre 0,5-3,5cm de diâmetro, com volume de 0,5-20,0mL/grão,

forma irregular, cor amarelada ou esbranquiçada (PINTADO *et al.*, 1996; HERTZLER *et al.*, 2003).

A composição microbiana dos grãos de kefir é variável, sofrendo influencia da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato utilizado para proliferação dos grãos e das técnicas utilizadas para sua manipulação (WITTHUHN *et al.*, 2004; WSZOLEK *et al.*, 2001).

Durante a fermentação no leite, os grãos multiplicam-se e aumentam de volume passando suas propriedades às gerações seguintes de novos grãos e dispersando os microrganismos no leite (SIMOVA *et al.*, 2002). De acordo com Toba *et al.* (1989) os grãos perdem a capacidade de se multiplicar após o terceiro ou quarto dia de fermentação do leite.

A partir do kefir pode-se obter o leban e o soro de kefir. O leban é a fase sólida, obtida da filtração do kefir. É um produto leve e altamente digerível, com sabor e textura semelhantes ao queijo quark, pode ser consumido puro ou usado em formulações substituindo o *cream chesse* ou queijo

- 1 Parte da dissertação apresentada pelo primeiro autor ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS.
- 2 Mestranda, Bacharel em Química Industrial de Alimentos UNIJUÍ-RS.E-mail: simone.weschenfelder@yahoo.com.br
- 3 Doutor, Veterinário Docente orientador do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS. E-mail: jmwiest@ufrgs.br
- 4 Doutora Nutricionista do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS.E-mail: hhearvalho@terra.com.br

cottage, além do desenvolvimento de outros produtos. O soro de kefir consiste na fase líquida obtida da mesma filtração, este pode ser aproveitado de diversas maneiras, desde o uso como matéria prima na elaboração de bebidas lácteas, até a utilização de modernas tecnologias para obtenção de produtos específicos a serem utilizados principalmente pelas indústrias alimentícias (CZAMANSKI 2003; SCHNEEDORF *et al.*, 2004).

A dupla fermentação no leite por bactérias e leveduras resulta na produção de um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares (HERTZLER *et al.*, 2003). O ácido láctico formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro, este combina-se também com os nutrientes cálcio e ferro, facilitando a absorção desses elementos. O produto possui ainda, alta digestibilidade, que é atribuída à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram, durante a fermentação, desnaturação em vários graus, obtendo assim uma coalhada de partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (SOUZA *et al.*, 1984).

Através da composição microbiológica e química o kefir pode ser considerado um produto probiótico complexo, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome. Sua capacidade de imunomodulação, resultante da ingestão oral já foi relatada em alguns estudos (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2005).

Outro benefício atribuído ao kefir é a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (GARROTE *et al.*, 2000). Estudos relatam que as bactérias ácido-lácticas dos grãos de kefir produzem bacteriocinas e o próprio kefir, que são substâncias que têm sido responsabilizadas por suas propriedades antimicrobianas (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Board (1988) afirma que *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, e outros como *Vibrio parahemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* são os microrganismos de maior importância em saúde pública, contaminando direta ou indiretamente os alimentos, principalmente os produtos de origem animal, envolvidos em toxinfecções alimentares.

Dentre eles, destaca-se a *Escherichia coli*, que se encontra largamente difundida na natureza, tendo como habitat principal o trato intestinal de animais de sangue quente, integrando as bactérias do grupo coliforme, subdividindo-se em vários biótipos e

sorotipos, alguns dos quais patogênicos em potencial para o homem, constituindo-se os alimentos e a água sua principal fonte de infecção. Esta bactéria é referenciada ainda hoje como indicador de contaminação fecal em alimentos, pela facilidade de sua comprovação diagnóstica e por sua representatividade (FRAZIER *et al.*, 1993). Os diferentes sorotipos (*enterohemorrágico*, *enterotoxigêno*, *enteroinvasor*, *enteropatôgeno* e *enteroagregativo*) de *Escherichia coli* vem merecendo crescente atenção epidemiológica, considerando os riscos para os humanos expostos à esta zoonose (ACHA *et al.*, 2003). Para que se desenvolva uma enfermidade enterotoxigênica e invasora, necessita-se de doses elevadas de *Escherichia coli*, portanto uma grande multiplicação.

Segundo Ota (1998) o uso do kefir auxilia na prevenção da contaminação por *Escherichia coli* O-157 enterohemorrágica, pois ele é capaz de aumentar o número de bactérias ácido lácticas e bifidas, nativas do trato gastrointestinal.

Ulusoy *et al.* (2007) ao testar a atividade antibacteriana do kefir frente à *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) verificou atividade antibacteriana frente a todos os agentes testados.

Vários estudos demonstram a atividade antibacteriana do kefir frente à *Escherichia coli* e a outros agentes de interesse em alimentos como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (ALM, 1983; KWON *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2005).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar, *in vitro*, a atividade antibacteriana do kefir e do soro de kefir tradicional, não submetidos a tratamento térmico, padronizados em relação ao tipo de leite e ao binômio tempo/temperatura de incubação e maturação, frente à *Escherichia coli* (ATCC 11229) indicador de interesse em alimentos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Manipulação e padronização do kefir

Para a realização do experimento foram utilizadas populações de grãos de kefir tradicional, oriundas de manipulações familiares, existentes no Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS. A inoculação dos grãos de kefir ao leite foi realizada utilizando-se leite pasteurizado, padronizado e homogeneizado tipo C, na relação entre o peso dos grãos e o volume de leite de 1:10, de acordo com Simova *et al.* (2002).

A inoculação dos grãos ao leite foi feita em recipiente de vidro esterilizado, onde a amostra

foi incubada por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em condições aeróbias. A seguir, procedeu-se à maturação, sob refrigeração a $7^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 144 horas. Após esta maturação, realizou-se uma tamisação prévia em peneira de aço inoxidável, sob assepsia, obtendo-se o kefir e os grãos de kefir. O kefir assim obtido foi submetido a uma filtração, em tecido de algodão esterilizado, por 24 horas a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para obtenção do soro de kefir. Os grãos retidos na tamisação prévia foram novamente inoculados ao leite, repetindo-se as etapas acima descritas. O fluxograma abaixo (figura 1) ilustra o processo adotado durante o experimento:

O kefir e o soro de kefir foram previamente testados quanto à colimetria total e fecal através do plaqueamento direto de diferentes alíquotas em meio Ágar Chromocult® (Merck).

2.2 Determinação de atividade antibacteriana

2.2.1 Amostras

Para a realização do experimento foram utilizadas amostras de kefir e de soro de kefir tradicional não submetidas a tratamento térmico. Os experimentos foram realizados em três

repetições, em períodos de tempo distintos, sendo que cada repetição foi analisada em triplicata.

2.2.2 O inóculo

Foi testada amostra padrão *Escherichia coli* (ATCC 11229) oriunda da coleção bacterioteca do Laboratório de Higiene de Alimentos do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos ICTA/UFRGS para a avaliação da atividade antibacteriana. O inóculo foi reativado em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion, OXOID), à 37°C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbia, até atingir a concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL (AVANCINI, 2002).

Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1mL deste para tubos de ensaio contendo 9mL de água peptonada 0,1% para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-12} . Das diluições 10^{-6} e 10^{-7} foram transferidas três gotas para placas de Petri contendo Ágar Chromocult® (MERCK), utilizando micropipetas de 15 μL e a leitura realizada em 24 horas de incubação aeróbia à 37°C , para avaliação da concentração inicial do inóculo em estudo. O valor final considerado constituiu-se da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

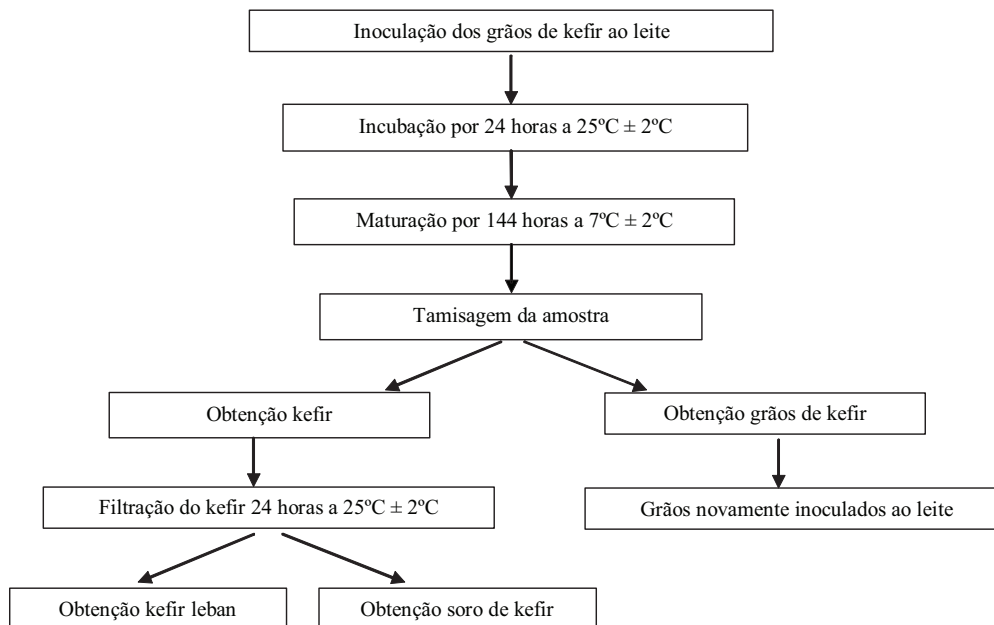


Figura 1 – Fluxograma do processo de manipulação e padronização do kefir.

Fonte: Adaptado de Czamanski (2003)

2.2.3 O método

O método utilizado para determinação da atividade antibacteriana do kefir e do soro de kefir tradicional foi o teste de diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1980), com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini (2002). Foram organizadas duas baterias de tubos de ensaio, cada uma composta por doze tubos contendo caldo duplo de BHI (Brain heart infusion, OXOID) no volume de 4,5mL, sendo que uma bateria continha desinibidores bacterianos (Tween 80 a 3%; Histidina a 0,1% e Lecitina a 0,3%) e a outra não continha desinibidores. A cada tubo foi adicionado 4,5mL de kefir ou soro de kefir, passando a concentração dos mesmos para 50%, em seguida, foram contaminados com 1mL de cada diluição serial logarítmica (10^{-1} a 10^{-12} UFC/mL) do inóculo bacteriano padrão. Os tubos foram então agitados e incubados a 36°C.

Os resultados foram lidos como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB). Entende-se por IINIB o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana de kefir ou soro de kefir em meio BHI (Brain heart infusion, OXOID), através de leitura por plaqueamentos, independentes de crescimento/turvação em meio seletivo, Ágar Chromocult® (MERCK), em intervalos de 24, 48 e 72 horas de incubação a 36°C. Entende-se por IINAB o mesmo resultado, porém sob a influência dos desinibidores bacterianos (Tween 80 a 3%; Histidina a 0,1% e Lecitina a 0,3%) acrescidos ao BHI. Segundo Andrade *et al.* (1996) estes desinibidores tem a função de inativar as soluções antibacterianas em teste, além de fornecer substrato para as bactérias, facilitando seu crescimento.

IINIB e IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram

valores de 12 a 0, sendo que o valor de 12 (doze) representava atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, que uma amostra testada tem sobre uma dada dose infectante do microrganismo, nas diferentes condições do experimento, ou seja, com e sem desinibidores bacterianos (tabela 1).

2.2.4 Determinação do pH

Determinou-se o pH do kefir e do soro de kefir, bem como das baterias dos sistemas de tubos múltiplos na presença do kefir e do soro de kefir através do pHmetro MP220 (Mettler Toledo) conforme as normas descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.3 Análise estatística

Os resultados da avaliação da atividade antibacteriana (IINIB e IINAB) do kefir e do soro de kefir foram tratados através do programa Statistical Analysis System (SAS versão 6. 4), sendo avaliados através da Análise de Variância (Anova) e teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a fermentação com leite pasteurizado padronizado homogeneizado tipo C, o kefir e o soro de kefir, *in natura*, não submetidos a tratamento térmico, apresentaram resultado negativo em relação ao controle de colimetria total e fecal. A partir deste resultado, optou-se em trabalhar com o kefir e o soro de kefir em condições naturais.

As amostras de kefir utilizadas para a realização dos experimentos apresentaram pH na faixa de 3,6 a 3,8 enquanto que as amostras de soro de kefir apresentaram pH na faixa de 3,5 a 3,9. Porém, depois de adicionadas aos tubos de ensaio contendo caldo duplo de BHI estes valores

Tabela 1 – Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----|------------------------------------------------------|
| 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | Variáveis ordinárias de intensidade de atividade |
| 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} | 10^{-10} | 10^{-11} | 10^{-12} | n.a | UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas |
| 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 | 1 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | n.a | UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas |

n.a: ausência de atividade antibacteriana;

UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mL.

de pH passaram para faixas de 5,8 para os tubos sem desinibidores e 8,5 para os tubos com desinibidores bacterianos. Sendo assim, constatou-se que o pH não exerceu influência na intensidade de inibição e inativação bacteriana, fato reportado também por Czamanski (2003).

Os resultados da determinação da Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e da Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida do kefir tradicional, encontrados em três repetições do experimento, realizadas em períodos distintos, sendo todos avaliados em triplicata, estão descritos na Tabela 2.

Os resultados da determinação da Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e da Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida do soro de kefir tradicional, encontrados em três repetições do experimento, realizadas em períodos distintos, sendo todos avaliados em triplicata, estão descritos na Tabela 3.

As tabelas demonstram que, tanto o kefir como o soro de kefir, na concentração testada de 50%, apresentaram total inibição e inativação frente ao inóculo *Escherichia coli* ATCC (11229), em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL, em ambas as análises. Estes resultados tornam-se relevantes, considerando que, dificilmente, em preparações alimentares, seriam encontradas concentrações tão elevadas deste

microorganismo. Isto sugere, a precisão do método (resistência a fatores extrínsecos) e a padronização das técnicas quanto a preditividade dos resultados positivos e negativos (CÔRTEZ, 1993), pela diferença não significativa ao nível de 5% de probabilidade dos resultados obtidos.

A *Escherichia coli* ATCC (11229) sofrendo inibição e inativação frente ao kefir e ao soro do kefir, teve este resultado garantido pela presença e ausência dos desinibidores bacterianos recomendados no experimento.

Os tempos de incubação dos inóculos testados, tanto frente ao kefir como ao soro de kefir, (24, 48 e 72 horas) não influenciaram na intensidade de ação do mesmo, pois, como indicam as tabelas 2 e 3, não houve diferença significativa entre os tempos de confrontação da mesma repetição entre si e em relação a presença ou ausência de desinibidores.

Este comportamento permite concluir que a técnica de manipulação e padronização adotada para o kefir no experimento foi eficaz, pois permitiu a obtenção de um produto com características antibacterianas similares e reprodutivas.

Resultados semelhantes ao presente experimento, obtidos com o kefir resultante da fermentação do leite com os grãos de kefir, foram observados por Shama (1998), que, através de estudos

Tabela 2 – Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB) do Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições.

| | | <i>Escherichia coli</i> ATCC (11229) | | | | | |
|---------|-----------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 1ª repetição | | 2ª repetição | | 3ª repetição | |
| Amostra | Tempo (h) | IINIB | IINAB | IINIB | IINAB | IINIB | IINAB |
| Kefir | 24 | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} |
| | 48 | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} |
| | 72 | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} |

Resultados representam a média das triplicatas

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Tabela 3 – Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida (IINAB) do soro de Kefir tradicional não submetido a tratamento térmico, frente à *Escherichia coli* ATCC (11229) determinadas em três repetições.

| | | <i>Escherichia coli</i> ATCC (11229) | | | | | |
|---------------|-----------|--------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 1ª repetição | | 2ª repetição | | 3ª repetição | |
| Amostra | Tempo (h) | IINIB | IINAB | IINIB | IINAB | IINIB | IINAB |
| Soro de kefir | 24 | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} |
| | 48 | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} |
| | 72 | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} | 12 ^{Aa} |

Resultados representam a média das triplicatas

Letras maiúsculas iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

Letras minúsculas iguais na mesma linha indicam que não há diferença significativa ($p \geq 0,05$)

"*in vitro*", trabalhou com seis amostras de kefir que foram contaminadas com *Escherichia coli* (NCDC nº 25922). Às vinte e quatro horas do processamento tradicional adotado, atingiu-se, em todas as amostras, 10^6 UFC/mL. Após dez dias houve redução para 10^4 UFC/mL em cinco das amostras, e para 10^5 UFC/mL na amostra restante, havendo evidências de descontaminação. Czamanski (2003) determinou as concentrações inibitórias mínimas e as concentrações bactericidas mínimas do filtrado de kefir tradicional frente a duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) e duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC 11076). Os resultados encontrados demonstraram um maior efeito bacteriostático frente a bactérias Gram-negativas e um melhor efeito bactericida frente a bactérias Gram-positivas.

Outros autores encontraram atividade antibacteriana e antifúngica trabalhando, porém, com cepas bacterianas isoladas individualmente de grãos de kefir. Cevikbas *et al.* (1994) encontraram cepas que produziam uma bacteriocina com amplo espectro de inibição, frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumonia*, *Bacillus subtilis* e *Candida* spp. Santos *et al.* (2003) avaliou a atividade antimicrobiana de 58 cepas isoladas do kefir frente a bactérias enteropatogênicas e observou atividade da maioria delas frente aos agentes testados. Ulusoy *et al.* (2007) ao testar a atividade antibacteriana do kefir liofilizado frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Escherichia coli* (ATCC 8739) verificou atividade antibacteriana frente a todos os agentes testados.

Os diferentes resultados encontrados nos trabalhos realizados sobre atividade antibacteriana do kefir justificam-se pelas diferentes técnicas de manipulação e padronização das amostras, bem como ao tipo de substrato utilizado para proliferação dos grãos e a origem dos mesmos. Embora utilizando diferentes técnicas e distintas populações, todos os trabalhos indicam que o kefir e seu soro apresentam atividade antibacteriana frente a agentes de interesse em alimentos.

4 CONCLUSÕES

O kefir e o soro de kefir tradicional apresentaram, espontaneamente, resultados negativos em relação à colimetria total e fecal, garantindo desta forma, a preditividade frente ao padrão ATCC desafiado.

A padronização das amostras resultou em um produto com características antibacterianas semelhantes e reprodutivas.

O tempo de exposição do inóculo frente ao kefir e ao soro de kefir não influenciou significativamente na Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e na Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida, pois nos tempos de 24, 48 e 72 horas de exposição, os resultados foram iguais.

As diferentes repetições do experimento, realizadas em momentos distintos, apresentaram resultados reprodutivos, onde a concentração de 50% tanto do kefir quanto do soro de kefir, foram suficientes para inibir e inativar a *Escherichia coli* ATCC (11229) em concentrações $\leq 10^8$ UFC/mL.

Considerando as hipóteses iniciais formuladas tanto o kefir quanto o soro de kefir apresentaram Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericida máximas frente ao inóculo bacteriano testado.

SUMMARY

Through Dilution Tests, in Multiple Tubes System it was determined, *in vitro*, the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB / bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/bactericidie) from traditional kefir and kefir whey, not heat-treated, patterned on the type of milk and the binomial time/temperature of incubation and maturation, as opposed to standardized inoculum of *Escherichia coli* (ATCC 11229) indicator microorganism in food interest. Kefir is a fermented milk produced by the addition of kefir grains, forming a symbiotic association between acid-lactic bacteria, acid-acetic bacteria and yeast, surrounded by a matrix of polysaccharides, the kefiran, while the whey is the product of the filtration of kefir. Both, the kefir, as the whey of kefir, had maximum capacity for inhibition and inactivation of the bacterial inoculum, in concentrations $\leq 10^8$ CFU/mL.

Keywords: traditional kefir; antibacterial activity of kefir; bacterial inhibition; bacterial inactivation.

5 REFERÊNCIAS

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis and communicable diseases common to men and animals: bacteriosis and mycosis**. 3 ed. Washington: World Health Organization. Cientifical and Technical Publication n. 580. 2003, 398p.

ALM, L. Survival rate of Salmonella and Shigella in fermented milk products with and without added human gastric juice na *in vitro* study. **Program Food Nutrition Science**, Philadelphia, Pergamon Press Ltd. Vol 7. p 19-28. 1983.

- ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J. A. **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996. 186p.
- AVANCINI, C. A. M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do Sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum*- Cham e Schlecht. Hypericaceae (Guttiferae) — (“escadinha”/”sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico**. 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Programa de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, UFRGS. Porto Alegre, 2002.
- BASTOS, M. do S.R. **Informações de sistema de qualidade NB 9.000 em laticínios em produção de iogurte e leite longa vida (UHT)**. Viçosa: UFV, (Universidade Federal de Viçosa 1995. 243p. (Tese - mestrado em ciência e tecnologia de alimentos).
- BOARD, R.G. **Introducción a la Microbiología moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. 272p.
- CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.
- CEVIKBAS, A.; YEMMI, E.; EZZEDENN, F. W.; YARDIMICI, T. Antitumoral, antibacterial and antifungal activities of kefir and kefir grain. **Phytother Res**. 1994; 8: 78-82.
- CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia Conceito e princípios fundamentais**. São Paulo; Livraria Varela, 1993.
- CZAMANSKI, R. T. **Avaliação da atividade antibacteriana de filtrados de quefir Artesanal**. 2003. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT/SOCIEDADE ALEMÃ DE MEDICINA VETERINÁRIA (DVG). *Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin*/Normas para a testagem de desinfetantes químicos para a medicina veterinária. Giessen, 1980. In: SCHLISSER, Th.; Strauch, D. *Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft/Desinfecção na produção animal, em laticínios e em frigoríficos*. Stuttgart: Enke Verlag, 1981. 455p.
- FARNWORTH, E.R. Kefir - a complex probiotic. *Food Sci. Technol. Bull.*, v.2, n.1, p.1-17, 2005.
- FRAZIER, W.C.; WESTHOFF, D.C.. **Microbiología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia. 1993. 681p.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Inhibitory Power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63. n. 3, 2000.
- HERTZLER, S. R., CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. **Journal os American Dietetic Association**,. v. 153, n. 5, p. 582-587, 2003.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo v.1, 533p., 1985.
- KWON, H.; KIM, Y.K.L. **Korean fermented foods: kimchi and doenjang**. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). *Handbook of fermented functional foods*. Boca Raton: CRC Press, 2003. p.287-304.
- MARCHIORI, R. C. Caracterização do kefir e propriedades probióticas – uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. V. 62, p. 21-31, set/out. 2007.
- OTA, A. Protection against na infectious disease by enterohaemorrhagic E. coli O-157. **Medical Hypotheses**, Japão, v. 53, n. 1, p. 87-88, jan. 1998.
- PINTADO, M. E.; SILVA, J. A. L.; FERNANDES, P. B.; MALCATA, F. X.; HOGG, T. A. Microbiological and rheological studies on Portuguese kefir grains. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 31, p. 15-26, 1996.
- RODRIGUES, K. L.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, Vol. 13, No. 5–6, pp. 485–492 2005
- SANTOS, A.; MAURO, S. M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* spp. **System. Appl. Microbiol.** 26, 434–437 2003.
- SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. Quefir, um probiótico produzido por microorganismos encapsulados e inflamação, in: *Fitoterápicos anti-inflamatórios aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*, Carvalho, J. C. T. (Ed.), ch. 33, pp. 443–467. Tecmedd, Ribeirão Preto 2004.

SHAMA, S. de F.M.S. **Características higiênicas sanitárias e contaminação fecal-experimental de amostras de kefir tradicional**. 1998. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, T. S., FRENGOVA, G., SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 28, p. 1-6, 2002.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J.L. Kefir e sua tecnologia - aspectos gerais. **Boletim ITAL**, Campinas. Vol 21. Nº 2. P 137-155. Abril/junho 1984.

TOBA, T. ARIHARA, K., ADACHI, S. Distribution of microorganisms with particular reference to encapsulated bacteria in kefir grains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 219-224, out. 1989.

ULUSOY, B.H.; ÇOLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; ERKAN, M. E. An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. **Türk Mikrobiyol Cem Derg** 2007

VINDEROLA, C.G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **J. Dairy Res.**, v.72, p.195-202, 2005.

WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T., CILLIERS, A., BRITZ, T. J. Impact of preservation and different packaging conditions on the microbial community and activity of kefir grains. **Food Microbiology**, África do Sul, v. 22, p. 337-344, set. 2004.

WSZOLEK, M., TAMIME, A. Y., MUIR, D. D., BARCLAY, M. N. Properties of kefir made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with different Starter Cultures. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 34, p. 251-261, fev. 2001.

ILCT