



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO PRO-BIÓTICO KEFIR (CONSÓRCIO
BIONAT 01) E SEUS DERIVADOS**

ALINE LIMA DO NASCIMENTO

RECIFE

2017

ALINE LIMA DO NASCIMENTO

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO PRO-BIÓTICO KEFIR (CONSÓRCIO
BIONAT 01) E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração:
Bioquímica

Orientadora: Profa. Dr^a. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Yara

RECIFE

2017

Catálogo na fonte

Elaine Barroso

CRB 1728

Nascimento, Aline Lima do

Aplicações biotecnológicas do pro-biótico Kefir (Consórcio BIONAT 01) e seus derivados/ Aline Lima do Nascimento- 2017.

74 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Belmira Lara de Silveira A. da Costa

Coorientador: Ricardo Yara

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Ciências Biológicas. Programa de Pós- Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2017.

Inclui referências e anexo

1. Kefir 2. Probióticos 3. Cândia albicans 4. Alimentos- Biotecnologia
I. Costa, Belmira Lara de Silveira A. (orient.) II. Yara, Ricardo
(coorient.) III. Título

637.146

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-065

ALINE LIMA DO NASCIMENTO

**APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DO PRO-BIÓTICO KEFIR (CONSÓRCIO
BIONAT 01) E SEUS DERIVADOS**

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 23/02/2017.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a Dra. Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa (Orientadora)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFPE

Prof. Dr. Eduardo Carvalho Lira (Examinador interno 1)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador interno 2)
Departamento de Bioquímica - UFPE

Prof^a Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento (Examinadora externa 1)
Departamento de Antibióticos (DAnt) - UFPE

Prof. Dr. Rubem Carlos Araújo Guedes (Suplente interno)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Prof^a. Dr^a. Gardênia Carmen G. Militão (Suplente externo)
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

Aos meus pais.

A Cascão, com muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, por todo o amor e cuidado que sempre me dedicaram.

Aos amigos dos laboratórios de Biofísica Química e Neurofisiologia, pelos constantes ensinamentos, pela paciência e, principalmente, pela amizade.

Agradeço especialmente aos meus professores orientadores, pela pronta ajuda e paciência. Ao Prof. Ricardo Yara, que me acompanha desde o início da graduação, sempre solícito e amigo, e à professora Belmira, por toda sua paciência, por tudo que me ensinou e, acima de tudo, pelo exemplo.

A todos dos laboratórios de Biofísica de Membranas e de Enzimologia, pela receptividade e solicitude.

Aos professores Leucio, Claudio Gabriel, Gardênia e Dijannah que nunca mediram esforços para ajudar no que fosse preciso. Meus sinceros agradecimentos por todo auxílio e atenção prestada.

Aos meus queridos “Cocós”, Natália e Rafael, que sempre se fizeram presentes durante a minha formação, com palavras de carinho e sempre me ajudando muito.

Meu agradecimento especial a João Paulo, Yago, Antônio, Gabriel, Rafael Miguel e Marcelo Simões por toda a dedicação e empenho, vocês são parte fundamental desse projeto.

Aos amigos que me acompanharam no decorrer dessa jornada, Leonice e Ian.

À Claudia e Raquel, veterinárias do Biotério do Departamento de Fisiologia, por toda a ajuda prestada, pelo apoio e amizade.

Aos membros da banca examinadora, por terem aceito o convite e contribuído para a melhoria deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos animais que inocentemente tiveram suas vidas destinadas a realização deste trabalho. A eles, minha gratidão e respeito.

Enfim, agradeço imensamente a vocês e a todos aqueles que de alguma maneira estiveram presentes, me alegrando, motivando e ajudando a construir mais essa etapa da minha vida. Meus sinceros agradecimentos e profunda consideração e carinho.

RESUMO

Probióticos são organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. O kefir é um probiótico originário da região do Cáucaso, composto por leveduras e bactérias ácido láticas que produzem um líquido metabólico fermentado e um biopolímero denominado kefirana. Tanto o kefir quanto seus produtos apresentam atividade biológica, tais como ação antibiótica *in vitro*, atividade anti-inflamatória e imunomoduladora *in vivo*, além de aplicações na indústria alimentícia. O presente estudo investigou os efeitos de extratos obtidos a partir dos grãos de kefir (consórcio BIONAT 01), do seu líquido metabólico fermentado e da kefirana em linhagens de células tumorais (MCF-7, NCI-H292, HEP-2 e HeLa) e cultura primária de astrócitos. O açúcar mascavo, utilizado como substrato para a manutenção das culturas de kefir, foi empregado como controle. Para a preparação dos extratos, tanto os grãos de kefir quanto o açúcar mascavo foram secos e em seguida submetidos à extração fracionada, utilizando-se um gradiente de polaridade (ciclohexano, acetato de etila e metanol-água 8:2). Além destes, também foi produzido um extrato ciclohexânico a partir do meio fermentado da cultura do micro-organismo 29, isolado do BIONAT 01. Os extratos de kefir e seus produtos foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e antimicrobiana pelo método de difusão em disco utilizando *Staphylococcus aureus* (UFPEDA- 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA-06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA-138), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-39), *Escherichia coli* (UFPEDA-224) *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71), *Serratia marcescens* (UFPEDA - 398) e *Candida albicans* (UFPEDA-1007). Também foram realizados testes para avaliação de antibiose em ensaios de blocos de gelose e estria cruzada utilizando 25 amostras, selecionadas a partir de 49 isolados da cultura BIONAT 01, frente a *C. albicans*. Os extratos obtidos a partir dos grãos de kefir, a kefirana e o líquido metabólico também foram testados frente às diferentes linhagens celulares, por 24 h, e avaliados quanto à viabilidade celular por protease ativa e por brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] (MTT). Apenas o extrato de açúcar mascavo em acetato de etila, utilizado como controle, apresentou atividade antioxidante pelo DPPH. Na avaliação antimicrobiana, o extrato de kefir de ciclohexano apresentou atividade frente aos seguintes micro-organismos: *C. albicans*, *M. smegmatis* e *E. faecalis*. Posteriormente os testes de antibiose indicaram que a linhagem nº 29 apresentou atividade contra *C. albicans*. Extratos hexânicos do fermentado da cultura da bactéria nº 29, isolada do BIONAT 01, não apresentaram atividade antimicrobiana. Nas culturas de células HeLa os compostos testados não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao controle para o teste de viabilidade celular com o MTT, o mesmo se deu em cultura primária de astrócitos analisadas nos períodos de 24, 48 e 72h. Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o kefir e seus derivados não apresentam diminuição da viabilidade celular frente as linhagens celulares analisadas e apontam os grãos do kefir como uma fonte promissora de atividade biológica, até então pouco explorada, como foi comprovado pela ação do extrato ciclohexânico dos grãos de kefir frente aos micro-organismos referidos.

Palavras-chave: Kefir. Kefirana. Linhagens tumorais. Astrócitos. *Candida albicans*.

ABSTRACT

Probiotics are living organisms which, when administered in suitable amount, confer benefits to the health of the host. Kefir is a probiotic from the Caucasus region, composed of yeasts and lactic acid bacteria that produce a fermented metabolic fluid and a biopolymer called kefirana. Both kefir and their products presents biological activity, such as antibiotic action *in vitro*, anti-inflammatory and immunomodulatory activity *in vivo* and applications in the food industry. The present study investigates the effects of extracts obtained from kefir grains (BIONAT 01 consortium), their metabolic fluid and the kefirana in tumor cell lines (MCF-7, NCI-H292, HEP-2 and HeLa) and primary culture of cortical astrocytes. The brown sugar, used as substrate for the maintenance of kefir cultures, was applied as control. To prepare the extracts, both the kefir grains and the brown sugar were dried and following fractionated using a polarity gradient (cyclohexane, ethyl acetate and methanol-water 8:2). In addition, a cyclohexanic extract was produced from the fermented culture medium of the microorganism 29, isolated from the BIONAT 01. Kefir extracts and their products were evaluated for their antioxidant activity by the DPPH method (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) and antimicrobial activity by the disc diffusion test using: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA-01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA-06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA-138), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-39), *Escherichia coli* (UFPEDA-224), *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71), *Serratia marcescens* (UFPEDA-398) and *Candida albicans* (UFPEDA-1007). Experiments for antibiotic evaluation were made in gelose blocks and cross streaking assay with 25 samples, selected from 49 isolates of BIONAT 01 culture, against *C. albicans*. The extracts obtained from kefir grains, the kefirana and the metabolic fluid were also tested in different cell lines for 24, 48 and 72h being evaluated through the cell viability by [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT). Only brown sugar extract in ethyl acetate, used as control, showed antioxidant activity by DPPH. In the antimicrobial evaluation, the kefir extract of cyclohexane presented activity against the following microorganisms: *C. albicans*, *M. smegmatis* and *E. faecalis*. Subsequently the antibiotic tests indicate that the bacteria n° 29 presented activity against *C. albicans*. Hexanic extracts from bacterial fermented culture n° 29 did not show antimicrobial activity. In the cultures of HeLa cells the compounds tested did not present significant differences when compared to the control for the cell viability test with MTT, the same results were observed in astrocyte primary culture evaluated in 24, 48 and 72h. The results obtained in the present study suggest that kefir and its derivatives do not present a decrease in cell viability of tested cell lines and propose the kefir grains as a promising source of biological activity, until now little explored, as evidenced by the action of its cyclohexanic extract against the related microorganisms.

Keywords: Kefir. Kefirana. Tumoral lines. Astrocytes. *Candida albicans*.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 –	Espectro cromatográfico do extrato de kefir em ciclohexano (KC) através de cromatografia flash.....	26
Tabela 1 –	Avaliação antimicrobiana dos extratos de kefir e açúcar.....	27
Figura 2 –	Avaliação antimicrobiana dos extratos de kefir e açúcar.....	28
Figure 3 –	Revelação microbiológica do extrato de kefir em ciclohexano (CK).....	29
Figura 4 –	Teste em bloco de gelose com espécies isoladas do BIONAT 01.....	30
Figura 5 –	Avaliação pelo ensaio de estrias cruzadas.....	31
Figura 6 –	Cultura primária de astrócitos em filme de kefirana (NH ₄ OH).....	32
Tabela 2 –	Viabilidade de células HeLa tratadas com extratos de kefir e kefirana.....	33
Tabela 3 –	Taxa de inibição do crescimento celular das amostras de extratos de kefir e kefirana em linhagens tumorais.....	33
Figura 7 –	Viabilidade celular de cultura primária de astrócitos corticais após tratamento com extratos de kefir, kefirana e líquido metabólico do kefir.....	34
Tabela 4 –	Mecanismos de ação dos probióticos.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Anti-CT	Anticorpo contra holotoxina do cólera
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAD	Bcl-2-associada a um agonista da morte celular
BAX	Bcl-2 associada à proteína x
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
FOSHU	Alimentos para uso específico de saúde
FTIR	Fourier Transform Infrared
GRAS	Geralmente considerado seguro
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Afinidade
HTLV-1	Vírus linfoatrópico de célula T humana tipo 1
IgA	Imunoglobulina A
IL-10	Interleucina 10
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
MDA	Malonaldeído
PBMCs	Células mononucleares do sangue periférico
PI 3-quinase	fosfatidilinositol 3-quinase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
T4	Tiroxina (ou tetraiodotironina)
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TSH	Hormônio estimulante da tireóide
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
WGO	World Gastroenterology Organisation
WHO	World Health Organisation

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO EXTRATO ORGÂNICO DO GRÃO DE KEFIR (CONSÓRCIO BIONAT 01) E DO SEU EIXO- POLISSACARÍDEO.....	14
2.1	Justificativa e hipótese do presente estudo.....	14
3	OBJETIVOS.....	16
3.1	Objetivo Geral.....	16
3.2	Objetivos Específicos.....	16
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1	Obtenção e Caracterização da Matéria-prima Utilizada nos Experimentos.....	17
4.1.1	Obtenção e Manutenção do Consórcio BIONAT-01.....	17
4.1.2	Extração do Exopolissacarídeo do Consórcio BIONAT-01.....	17
4.1.3	Obtenção dos Extratos do Consórcio BIONAT-01.....	18
4.1.4	Extratos do Microrganismo 29.....	18
4.1.5	Análise Cromatográfica dos Extratos.....	18
4.2	Potencial Antioxidante do Extrato Orgânico e do Polímero Extraídos do Consórcio BIONAT-01.....	19
4.3	Atividade Antimicrobiana.....	19
4.4	Avaliar as Interações entre Células e Extratos ou Polímeros Isolados do Consórcio BIONAT-01.....	22
4.4.1	Procedimentos Éticos.....	22
4.4.2	Produção dos Filmes de Exopolissacarídeo do Consórcio BIONAT-01.....	22
4.4.3	Cultura Primária de Astrócitos Corticais.....	23
4.4.4	Cultura de Linhagens Tumorais.....	23
4.4.5	Imunocitoquímica das Células Neurais.....	23
4.4.6	Ensaio de Viabilidade Celular.....	24
4.4.7	Ensaio de Citotoxicidade, Viabilidade e Apoptose.....	25
4.4.8	Análise Estatística.....	25
5	RESULTADOS.....	26
5.1	Obtenção e Caracterização das Matéria-prima.....	26
5.2	Cromatografia Líquida de Média Pressão.....	26
5.3	Potencial Antioxidante do Extrato Orgânico e do Polímero Extraídos do Consórcio BIONAT-01.....	27
5.4	Atividade Antimicrobiana.....	27
5.4.1	Teste de Difusão em Disco.....	27
5.4.2	Revelação Microbiológica.....	28
5.4.3	Bloco de Gelose.....	30
5.4.4	Estria Cruzada.....	30
5.4.5	Sobrecamada de Ágar.....	31
5.4.6	Análise de Produção de Substância Inibitória.....	31
5.5	Avaliação das Interações entre Células e Extratos ou Polímeros Isolados do Consórcio BIONAT-01.....	32
5.5.1	Produção de Filmes do Exopolissacarídeo.....	32
5.5.2	Análise da Biocompatibilidade do Exopolissacarídeo Como Suporte Para Cultura de Astrócitos.....	32
5.5.3	Viabilidade Celular de Linhagens de Células Tumorais.....	32

5.5.4	Ensaio de Citotoxicidade, Viabilidade e Apoptose.....	34
6	DISCUSSÃO.....	35
7	CONCLUSÕES.....	37
8	PERSPECTIVAS.....	38
9	CARACTERIZAÇÃO E RELEVÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE PROBIÓTICOS: ÊNFASE EM KEFIR E SEU DERIVADO KEFIRANA...	39
9.1	Alimentos Funcionais.....	39
9.2	Probióticos.....	40
9.3	Kefir.....	44
9.3.1	História.....	45
9.3.2	Microbiota.....	47
9.3.3	Composição Bioquímica.....	48
9.3.4	Características Físico-Químicas.....	49
9.4	Exopolissacarídeos.....	50
9.5	Aplicações do Kefir e da Kefirana.....	51
9.6	Aplicações dos Probióticos para a Saúde do Eixo Intestino-Cérebro-Intestino.....	61
	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE.....	73

1. INTRODUÇÃO

Bactérias vivem naturalmente no corpo humano, em uma relação de simbiose. Elas exercem função protetora e imunomoduladora frente a patógenos, enquanto fazem uso de metabólitos derivados do nosso organismo para sua sobrevivência. Nesse contexto, o consumo de alimentos probióticos tem crescido bastante nas últimas décadas, em parte devido ao aumento da preocupação com a saúde. Essa classe de alimentos funcionais, além de possuir valor nutritivo, regula a flora intestinal, de modo a promover o bem-estar, aliviar sintomas e reduzir o risco de doenças (VASCONCELOS et al. 2013).

Doenças imunossupressoras podem alterar esse equilíbrio, fazendo com que alguns micro-organismos se sobressaiam sobre outros e gerando assim um estado patológico. A *Candida albicans* é um dos principais fungos oportunistas, sendo o quarto grupo mais comum em infecções nosocomiais. Das 150 espécies descritas no gênero, pelo menos 20 já foram relacionadas ao desenvolvimento de candidíase (LACAZ et al., 2002).

O kefir é uma bebida probiótica de sabor e aroma característicos, preparada a partir da fermentação de diversos tipos de leite ou de água pelos micro-organismos que constituem seus grãos. Formado por bactérias ácido-láticas e leveduras, este consórcio produz o exopolissacarídeo kefirana, um carboidrato formado por glicose e galactose em proporções similares (BOSCH, et al., 2006; WESCHENFELDER, et al., 2009; BASCHALI, et al., 2017).

Tanto o kefir quanto seu sub-produto, a kefirana, apresentam diversas aplicações biológicas descritas na literatura, dentre elas, podemos destacar: atividade antimicrobiana (KIM et al., 2016), anti-inflamatória (MOREIRA et al., 2008; SCHNEEDORF, 2012), antioxidante (PUNARO et al., 2014), imunomoduladora (VINDEROLA et al., 2006) e antitumoral (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004). Além disso, o kefir também é utilizado na indústria para produção de queijos (DORNELLES, 2007), aditivo alimentar (PIERMARIA et al., 2008), café (RODRIGUES et al., 2016), filmes comestíveis (PIERMARIA et al., 2009), entre outros. A maior parte destes estudos foi realizada utilizando-se extratos do líquido fermentado do kefir, no entanto pouco se sabe sobre a atividade biológica do próprio grão do kefir.

Diante disso, o presente trabalho teve como principal objetivo realizar a caracterização química e a avaliação do potencial biotecnológico do extrato orgânico obtido do grão de kefir (consórcio BIONAT 01, selecionado a partir de doadores do Paraná) e de seus derivados, o líquido fermentado e o carboidrato kefirana, em ensaios antimicrobianos. Além destas, também foram avaliadas a ação antioxidante *in vitro* e a indução de citotoxicidade celular em

quatro linhagens de células tumorais (MCF-7, NCI- H292 e HEP-2) e em cultura primária de astrócitos.

2. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO EXTRATO ORGÂNICO DO GRÃO DE KEFIR (CONSÓRCIO BIONAT 01) E DO SEU EXOPOLISSACARÍDEO

2.1 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE DO PRESENTE ESTUDO

As várias evidências descritas no capítulo 1 indicam o potencial uso de probióticos tais como o kefir para fins biotecnológicos. A vasta gama de ações biológicas do kefir torna-o um alimento funcional com possibilidade de uso em intervenções terapêuticas como atividade antimicrobiana, antitumoral ou mesmo antioxidante. A caracterização e importância relativa de seus componentes é de grande interesse no tratamento de algumas doenças para que possam ser definidas estratégias de intervenção com probióticos. A grande maioria dos trabalhos utilizaram extratos do líquido fermentado do kefir de leite e alguns de água. Do ponto de vista biotecnológico o grão de kefir vem sendo utilizado para a produção de kefirana. No entanto, pouco se conhece sobre o potencial de extratos do grão de kefir, e mais especificamente sobre a sua atividade antimicrobiana. Vale ressaltar que a ingestão do líquido fermentado de kefir inclui também a ingestão de partículas finas do grão, o que potencialmente contribui com os efeitos benéficos deste alimento funcional. Um estudo recente realizado no Laboratório de Biofísica Química da UFPE desenvolveu um filme obtido a partir de polímeros extraídos de grãos de kefir que possuíam atividade antimicrobiana quando incorporados a nanopartículas de prata (ONOFRE, 2015). O mesmo grupo de pesquisa desenvolveu um consórcio microbiano de kefir, especializado em produzir exopolissacarídeos. Este consórcio microbiano foi denominado BIONAT-01 e apresenta um destacado rendimento quando comparado aqueles descritos na literatura (SILVA, 2015). Este trabalho teve como objetivo investigar a potencialidade de extratos orgânicos dos grãos de kefir do consórcio BIONAT 01, caracterizando-os quimicamente e avaliando a sua bioatividade em ensaios antimicrobianos, antioxidantes e citotóxicos utilizando linhagens de células cancerosas. A obtenção de extratos hexânico, de acetato de etila, etanólico permite a obtenção de metabólitos secundários mas excluem a participação de proteínas o que torna a análise mais seletiva quanto à possibilidade de realizar a caracterização dos componentes bioativos.

Desta forma, o presente estudo visa testar a hipótese de que extratos orgânicos dos grãos de kefir (consórcio BIONAT 01) e do seu polímero poderão apresentar uma atividade antimicrobiana com potencialidades terapêuticas. A citotoxicidade destes extratos foi avaliada

em culturas primarias de astrócitos, assim como a biocompatibilidade da kefirana produzida para atuar como suporte para estas células neurais.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial do consórcio de kefir BIONAT 01, bem como seu exopolissacarídeo, para aplicações biotecnológicas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter e caracterizar a matéria-prima utilizada nos experimentos (grãos de kefir e seu polissacarídeo);
- Verificar o potencial antioxidante do extrato orgânico e do polímero extraídos do consórcio BIONAT-01;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos do consórcio BIONAT-01 e de microorganismos isolados deste consórcio;
- Avaliar interações bioquímicas entre células e extratos ou polímeros isolados do consórcio BIONAT-01.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS

4.1.1 Obtenção e Manutenção do consórcio BIONAT-01

Os grãos de kefir BIONAT 01 foram selecionados a partir de consumidores habituais do Estado do Paraná. A cultura foi mantida em recipiente plástico com tampa à temperatura ambiente. Para a adaptação deste consórcio para a produção de polímero foi utilizado uma solução filtrada de água com açúcar mascavo (50%), sendo que a cada dois dias os grãos foram drenados e pesados para acompanhar o crescimento da população, após drenagem a solução foi renovada.

Com a finalidade de preservar a população original utilizada neste estudo amostras deste consórcio foram armazenadas em ultra-freezer a -80°C . Adicionalmente estão sendo realizados estudos paralelos a este, que caracterizaram tanto os micro-organismos cultivados e não-cultivados. Foram obtidas 49 linhagens de micro-organismos (ONOFRE, 2016). Para o presente trabalho foram selecionadas 25 linhagens de forma randômica.

4.1.2 Extração do exopolissacarídeo do consórcio BIONAT-01

Antes da extração do exopolissacarídeo BIONAT-01, os grãos foram lavados com água destilada repetidas vezes, com o intuito de diminuir as impurezas oriundas do açúcar mascavo e realizar um processo de clareamento do kefir.

Após clareados, a extração foi realizada de acordo com o protocolo modificado preconizado por ONOFRE (2011). Para tanto, os grãos de kefir foram triturados e acondicionados em béquer contendo solução de hidróxido de sódio (NaOH) $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ na proporção 1:2 e mantidos sob agitação e aquecimento constantes durante aproximadamente 1 hora. Em seguida foi adicionado o dobro em volume de etanol 96° gelado. O produto foi mantido por 12 h a 4°C , sucedendo-se a centrifugação a 11000 rpm por 10 min. O precipitado foi recolhido e lavado duas vezes com etanol, repetindo-se também a centrifugação. Ao final do procedimento o pH da mistura foi neutralizado com auxílio de solução de ácido clorídrico

(HCl) a $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$. Finalmente, o carboidrato extraído foi dissolvido em água mili-Q até atingir a forma de gel e em seguida submetido à secagem com auxílio de desumidificador.

4.1.3 Obtenção dos extratos do consórcio BIONAT-01

Grãos de kefir drenados foram secos em estufa a 45° C por cerca de 48 h e em seguida triturados em multiprocessador. Os extratos foram obtidos por meio de três extrações sucessivas com intervalos de 48 h cada, sob temperatura ambiente, com os seguintes solventes em grau de polaridade crescente: ciclohexano, acetato de etila e metanol-água (8:2). Após o período de extração, o solvente foi eliminado em evaporador rotativo e os extratos foram colocados em dessecador para eliminação da umidade residual, sendo pesados até atingir peso constante. O mesmo procedimento foi repetido com o açúcar mascavo, cujos extratos foram utilizados como controle para excluir a possibilidade da atividade avaliada nos ensaios ser proveniente de algum composto bioativos presente no mesmo. Por fim, obtiveram-se seis extratos brutos: kefir- ciclohexano (KC), kefir-acetato de etila (KA), kefir metanol-água 8:2 (KM), açúcar ciclohexano (AC), açúcar acetato de etila (AA) e açúcar metanol-água 8:2 (AM).

4.1.4 Extratos do microrganismo 29

O microrganismo 29, um bacilo Gram-positivo aeróbio (possível esporulante) isolado do consórcio BIONAT 01, foi semeado em meio TSA (Trypticase Soy Agar) a 27° C . Em intervalos de 24, 48 e 72 h, foram coletadas suas porções superficiais (uma camada de massa fina e branca, decorrente do metabolismo bacteriano) e a fração sólida de ágar. Esta última foi triturada e, da mesma forma que as demais amostras, foi adicionado ciclohexano para a obtenção dos extratos. Os procedimentos para obtenção dos extratos foram realizados como descrito no tópico anterior. Ao fim do experimento foram obtidos seis extratos hexânicos: fração superficial 24, 48 e 72 h, (S-24), (S-48) e (S-72), respectivamente, e frações ágar 24, 48 e 72 h, (A-24), (A-48) e (A-72), nesta ordem.

4.1.5 Análise cromatográfica dos extratos

Cromatografia em camada delgada (CCD): Os extratos brutos, tanto os derivados de

kefir e açúcar quanto aqueles feitos a partir do fermentado do micro-organismo 29, foram aplicados em placas cromatográficas com revelador UV (Sílicagel GF254, 20x20 cm; 0,2 mm espessura). Como fase móvel foi utilizada a mistura dos solventes tolueno-acetato 7:3. Bandas foram visualizadas em 254 nm e 366 nm.

Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP): O extrato KC foi fracionado de acordo com sua polaridade a partir de um gradiente de solventes com ciclohexano, acetato de etila e metanol, através de um aparelho para cromatografia Flash (Biotage Modelo Isolera One - USA).

42 *Potencial antioxidante do extrato orgânico e do polímero extraídos do consórcio BIONAT-01*

A partir dos extratos de kefir foram preparadas soluções das amostras diluídas em DMSO nas seguintes concentrações: 1000, 500, 250, 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Um controle negativo foi feito pela adição de DMSO e DPPH de forma a apresentar absorvância em 517 nm entre 0,6 e 0,7. Adicionou-se a cada concentração de extrato uma solução de DPPH 100 μM . e 30 minutos depois procedeu-se a leitura no espectrofotômetro a 517nm. A capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Eliminação [DPPH] (\%)} = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Foram realizadas leituras em triplicata e baseado nos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestrante de radicais livres.

43 *Atividade antimicrobiana.*

Teste de Difusão em Disco: A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos foi avaliada contra representantes de bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); Álcool-Ácido resistentes: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71); Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39) e uma levedura: *Candida albicans* (UFPEDA 1007). Todas as linhagens utilizadas possuem importância patogênica para animais e humanos, e foram obtidas da Coleção de Micro-organismos do Departamento de Antibióticos da

Universidade Federal de Pernambuco (DAnt-UFPE). Testes de difusão em disco foram realizados com frações do extrato KC obtidas por cromatografia flash contra *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

O experimento decorreu da seguinte forma: discos de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 10 µL da solução do extrato bruto a 200.000 µg/mL, de modo que cada disco ficou com a concentração de 2.000 µg/disco. A partir das linhagens dos microrganismos teste com 24 horas de cultivo, foram preparadas suspensões padronizadas em solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%, com turvação equivalente ao tubo número 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) para bactérias e 1,0 da escala de McFarland ($3,0 \times 10^8$ UFC/mL) para leveduras. Fez-se uso dos meios de cultura Mueller Hilton e Glicose Extrato de Levedura. Os micro-organismos foram semeados em seus respectivos meios de cultura, com auxílio de *swab* estéril. Os discos foram colocados sobre a superfície do meio semeado com os micro-organismos teste em placas de Petri e os controles positivos utilizados foram cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg) e fluconazol (100 µg). As placas foram incubadas a 35°C, durante um período de 18-24 horas. Após o período de incubação realizou-se a leitura dos resultados pela medição do diâmetro do halo de inibição formado em volta do disco. Estes testes foram realizados em duplicata e os resultados expressos pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição em mm e o cálculo do desvio padrão (BAUER et al., 1966).

Revelação microbiológica: A revelação microbiológica foi realizada utilizando-se as placas de cromatografia descritas no item 5.1.4. As placas cromatográficas foram cobertas com meio Sabourad contendo um inóculo de *C. albicans* (UFPEDA 1007) na concentração de 10^6 UFC/ml e meio Mueller Hilton (M.H.) contendo um inóculo de *E. faecalis* ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL), de acordo com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. Após incubação dos microrganismos por 24 horas foram observados, através da adição de resazurina sobre as placas, halos de inibição que indicaram quais frações continham a presença do bioativo (SOUTO, J. R., 2014). O ensaio foi realizado em duplicata e aplicado nos extratos KC e KA, além das 19 frações derivadas do extrato KC por meio de cromatografia flash e dos extratos da cultura fermentada do micro-organismo 29. Neste último, foram aplicadas 3 concentrações diferentes do inóculo: 0,5/1/1,5 ml de suspensão para cada 20 ml de meio.

Testes de bloco de gelose: Microrganismos do consórcio BIONAT 01 foram isolados para estudos de metagenômica em andamento do nosso grupo de pesquisa e parte destes

isolados foram avaliados em teste de bloco de gelose contra *Candida albicans* (UFPEDA 1007). Foram testados 25 isolados sendo, 1 coco gram-positivo, 2 bacilos gram-negativos, 25 cocos gram-positivos, 18 bacilos gram-positivos e 3 leveduras. Para tanto suspensões padrão foram preparadas a partir de cada isolado em solução salina, com turbidez equivalente ao tubo 0.5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU.mL⁻¹). Os micro-organismos foram então semeados em seus respectivos meios de cultura e incubados a 37°C durante o tempo necessário para seu crescimento. Blocos de ágar contendo o micro-organismo crescido foram cortados de forma asséptica e transferidos para o meio Saboraud semeados com a *C. albicans* (1×10^6 UFC.mL⁻¹). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera microaeróbica. A atividade foi avaliada pela medida dos diâmetros resultantes dos halos de inibição de crescimento (STERN et al., 2006). O experimento foi realizado em triplicata.

Teste de Estria cruzada: Com uma suspensão foi feito um inóculo lateral (estria) do micro-organismo nº 29 sobre a superfície do ágar TSA. Depois foram feitos dois inóculos perpendiculares com a *C. albicans*, mantendo uma distância de aproximadamente 1 cm da bactéria indicadora. O resultado foi observado após incubação a 35°C por 24 h e a atividade antagonista foi verificada pela inibição do crescimento da estria feita com os isolados próximo a estria da *C. albicans* (AMARANTE, 2016).

Teste da Sobrecamada de ágar: O ensaio foi realizado como descrito por Pugsley & Oudega (1987), com modificações de acordo com Gross & Vidaver (1990). Alíquotas de 10 µL de uma cultura crescida por 48 horas dos micro-organismos isolados dos grãos de kefir foram gotejadas em placas contendo meio TSA e em seguida incubadas por 24 horas a 37°C. Para prevenir o posterior crescimento de células, decorrido esse período as placas foram expostas ao vapor de clorofórmio durante 40 minutos. Logo após, foi vertida sobre a placa uma sobrecamada de 5mL de ágar Sabourad semi- sólido (0,75%), contendo 50 µL de uma cultura (10^8 UFC.mL⁻¹) de *C. albicans*.

As placas foram frequentemente verificadas em até 48 h após incubação a 35°C, observando-se a ocorrência de formação de zonas de inibição de crescimento da camada de *C. albicans* ao redor da colônia da bactéria testada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise de produção de substância inibitória: Seguindo metodologia proposta por Santos (2005), uma amostra de 10 mL de uma cultura fresca de 24 horas do micro-organismo 29 foi inoculada em 250 mL de TSB e incubada a 37°C sob agitação. Durante nove intervalos

de tempo sob incubação, 2 mL da cultura foram coletados para a determinação da fase de crescimento e da produção da substância inibidora. Para cada intervalo, 1 mL foi usado para medir a Densidade Óptica a 600 nm e os outros 1 ml foram imediatamente centrifugados (11000 rpm, 2 minutos, 4 °C) para a remoção das células. O sobrenadante recebeu então tratamento térmico em banho-maria a 65° C por 20 minutos para inativação de proteases, tendo sido diluídos serialmente por 2 vezes e utilizadas em dois ensaios distintos.

O teste de difusão em ágar se deu da seguinte maneira: placas contendo ágar Sabourad preparadas antecipadamente foram retiradas da geladeira até atingir a temperatura ambiente. Com um *swab* estéril, o inóculo fúngico de *C. albicans* com turvação 0,5 da escala de MacFarland foi distribuído uniformemente sobre a superfície através da técnica de semeio em tapete. De maneira estéril, foram feitos poços de aproximadamente 12mm de diâmetro no meio e cada poço recebeu 300 µL do sobrenadante em suas diferentes concentrações. Como controle negativo foi utilizada água destilada autoclavada. As placas foram incubadas em estufa a 35° C por 24 horas e o aparecimento de halo de inibição foi medido utilizando régua milimetrada (SILVEIRA et al., 2009). Os testes foram realizados em triplicata.

No segundo experimento, 20 µL de cada diluição foram gotejados em placas contendo meio TSA. Após secas, as placas receberam uma sobrecamada de *C. albicans* e em seguida foram incubadas a 35° C. As placas foram monitoradas por 48 h para análise de formação de halos de inibição em volta do inóculo.

4.4 Avaliar as interações entre células e extratos ou polímeros isolados do consórcio BIONAT-01

4.4.1 Procedimentos éticos

Todos os procedimentos adotados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso de animais da UFPE (protocolo 0002-2015), de acordo com o Colégio Brasileiro de Cuidado Animal o qual segue as orientações do documento “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH, Bethesda, USA).

4.4.2 Produção dos filmes de exopolissacarídeo do consórcio BIONAT-01

Os filmes de exopolissacarídeo foram obtidos pelo sistema de *casting*, que nada mais é

do que a secagem de uma solução do polímero. Como solventes foram utilizados água deionizada, hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de amônia (NH₄OH) e dimetilsulfóxido (DMSO) e como agente plastificante o glicerol. No intuito de corrigir qualquer viés referente à estrutura do filme e seu potencial como suporte para crescimento celular, os mesmos foram aplicados em placas de Petri impróprias para cultivo celular. Antes da aplicação nas culturas, os filmes foram irradiados (25 KGy) no Departamento de Energia Nuclear (DEN-UFPE).

4.4.3 *Cultura primária de astrócitos corticais*

As culturas primárias de astrócitos corticais de ratos Wistar foram obtidas segundo protocolo desenvolvido por Gomes et al. (1999). Resumidamente, animais neonatos P1-P3 (P0=dia do nascimento) foram sacrificados por decapitação e o cérebro mantido em PBS-glicose (tampão salina fosfato + glicose 0,6%). As meninges foram removidas, o córtex cerebral isolado e mecanicamente dissociado. A suspensão foi centrifugada (5 min/1500rpm) e o sedimento ressuspensão em meio DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* com nutriente F-12) suplementado com 33mM glicose, 2mM glutamina, 3mM bicarbonato de sódio, 1.5mg/mL penicilina/estreptomicina e 2.5µg/mL fungizona. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino. Cerca de 7×10^5 células foram plaqueadas em placas de cultura com e sem o exopolissacarídeo e mantidas durante 7-10 dias a 37° C, 5% CO₂ e 85% umidade sendo o meio trocado a cada 2-3 dias.

4.4.4 *Cultura de linhagens tumorais*

As linhagens tumorais utilizadas foram: HeLa (carcinoma de colo uterino humano), MCF-7 (carcinoma de mama humano), NCI-H292 (carcinoma de pulmão humano) e HEP-2 (carcinoma de colo uterino humano), obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10 % de soro fetal bovino (PBS) e 1% de antibióticos, renovado a cada 2 ou 3 dias e mantidas em estufa a 37° C e atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.4.5 *Imunocitoquímica das células neurais*

Para análise imunocitoquímica dos astrócitos corticais, as culturas foram plaqueadas

sobre lamínulas revestidas com 1µg/mL poly-l-lisina (Sigma-Aldrich, USA). Após fixação, as células foram lavadas em tampão fosfato (PB) 0.1M seguido de bloqueio com 3% BSA (Sigma-Aldrich, USA) em PB + 1% Triton X-100 (Riedel de Haen- Germany) por 30 min. Para visualizar os astrócitos, foi usado o anticorpo policlonal contra o filamento intermediário específico de glia GFAP (Sigma) incubado por 18 h. Após lavagens usando PB as culturas foram incubadas em anticorpo secundário biotilado (cabra x camundongo; 1:1000; Jackson, USA) por 1 h, seguido de lavagens e reação com Diaminobenzidina (DAB). As lamínulas contendo as células foram montadas usando 40% glicerol em PBS 0.1 M e examinadas usando um Microscópio Leica, DM 5500-B (lentes objetivas de 20 e 40x) acoplado a uma câmera Leica, DFC 345 FX.

4.4.6 Ensaio de Viabilidade celular

O ensaio consiste em utilizar uma concentração alta da substância em estudo e verificar se há inibição da proliferação celular. As linhagens celulares foram plaqueadas na concentração de 1×10^5 células/mL (2×10^4 células/poço). Culturas primárias de astrócitos corticais foram obtidas após a segunda passagem, feita pelo tratamento com tripsina 0,25 % por 5 min. Os extratos de kefir, seu líquido metabólico e o carboidrato extraído foram previamente dissolvidos em DMSO e diluídos em série no meio RPMI ou DMEM para obtenção da concentração final de 50 µg/mL e em seguida adicionados a placa de 96 poços. Em cultura de células HeLa esta análise também foi realizada em concentrações logarítmicas das amostras. Doxorrubicina foi usada como controle positivo para as linhagens MCF-7, NCI-H292 e HEP-2 na concentração de 5 µg/mL. As placas foram incubadas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C, sendo que as células HeLa foram analisadas em 24 h, as linhagens MCF-7, NCI-H292 e HEP-2 em 72 h e a cultura primária de astrócitos em 24, 48 e 72 h. Em seguida, foram adicionados 25 µL da solução de MTT e as placas foram incubadas por 3h. A absorbância foi avaliada em um leitor de microplacas (BioTek, Winooski, USA) a 595nm após dissolução do precipitado com DMSO puro (COELHO, et al., 2016).

A viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{Absorbância\ da\ amostra}{Absorbância\ do\ controle} \times 100$$

Os extratos foram qualificados da seguinte forma: amostras sem atividade, baixa atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com atividade moderada

(inibição de crescimento celular variando de 50 a 75%) e alta atividade (inibição de crescimento variando de 75 a 100%).

4.4.7 Ensaio de Citotoxicidade, Viabilidade e Apoptose

Com o kit ApoTox-Glo™ Triplex Assay (Promega) foram analisadas viabilidade, citotoxicidade e ativação de caspase em cultura primária de astrócitos. Os extratos de kefir e seu carboidrato isolado previamente dissolvidos em DMSO foram diluídos no meio DMEM a uma concentração final de 50 µg/mL e adicionados em placa de 96 poços. Viabilidade e citotoxicidade foram determinadas utilizando-se 2 marcadores de protease simultaneamente com a adição de um reagente contendo dois substratos: o substrato permeante nas células (GF-AFC Substrate), que mede atividade protease de células vivas e o substrato peptideo fluorogenico (bis-AAF-R110 Substrate), que mede atividade protease de células mortas cuja integridade da membrana foi perdida. Um Segundo reagente contendo o substrato luminogênico DEVD-peptide para caspase-3/7 e *Ultra-Glo™ Recombinant Thermostable Luciferase* foi adicionado. A resposta luminosa medida com um luminômetro se correlaciona com ativação da caspase 3/7 como um indicador de apoptose. A fluorescência foi medida utilizando os comprimentos de onda 400nm para Excitação e 505nm para emissão. Para citotoxicidade a fluorescência foi medida em 485 nm (Excitação) e 520 nm (Emissão).

4.4.8 Análise estatística

Todos os resultados apresentados são expressos como média ± desvio padrão (DP). Para a avaliação dos ensaios de viabilidade foi aplicado o teste ANOVA.

5. RESULTADOS

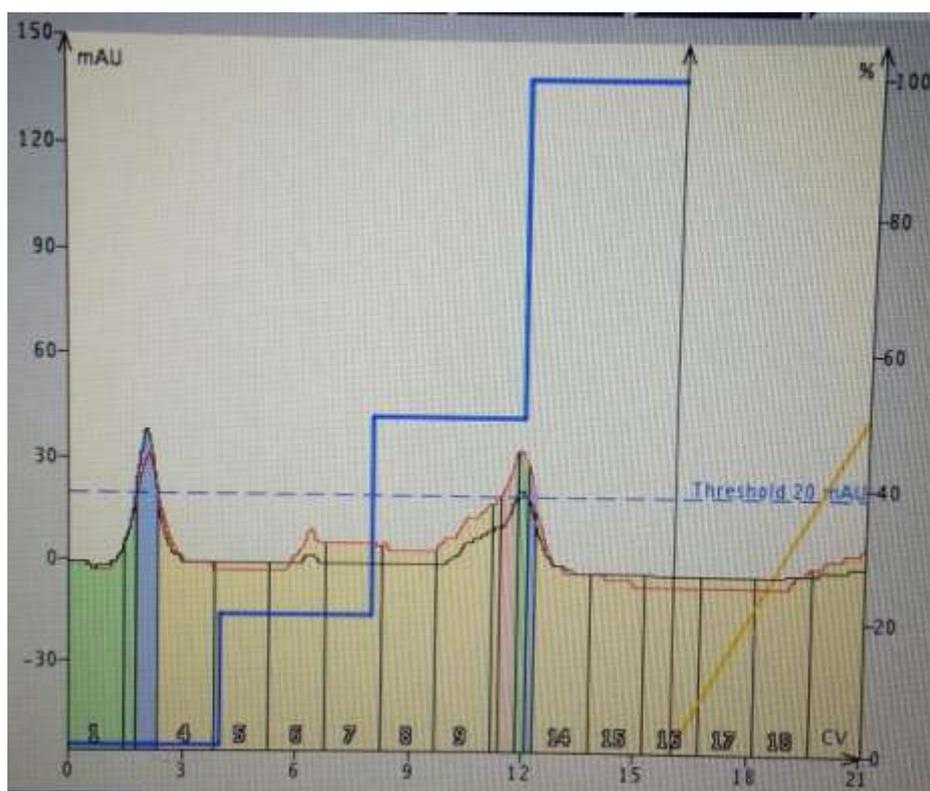
5.1. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIA-PRIMAS

No período observado o consórcio BIONAT-01 se apresentou estável quanto a produção de biomassa e taxas de crescimento. Aproximadamente, o rendimento para a produção do carboidrato foi de 10%.

5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE MÉDIA PRESSÃO

Neste ensaio o extrato de kefir em ciclohexano (KC), que apresentou atividade contra *C. albicans*, foi fracionado em 19 amostras: A1, A2, A3, A4...A19, as quais foram seguidamente submetidas a revelação microbiológica para posterior isolamento do composto antifúngico (Figura 1).

Figura 1: Espectro cromatográfico do extrato de kefir em ciclohexano (KC) através de cromatografia flash



Eixo vertical esquerdo: Absorbância (mAU), eixo vertical direito: Acetato de etila (%), eixo horizontal: Volumes de coluna (VC)

5.3. POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ORGÂNICO E DO POLÍMERO EXTRAÍDOS DO CONSÓRCIO BIONAT-01

Apenas o extrato de açúcar mascavo obtido em acetato de etila apresentou atividade antioxidante, em todas as concentrações testadas.

5.4. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.

5.4.1 Teste de difusão em disco

Dentre os extratos de kefir e açúcar testados contra representantes dos grupos de bactérias gram-positivas, gram-negativas e de leveduras (Tabela 5), alguns destes com potencial patogênico, apenas o extrato KC apresentou atividade inibitória frente aos seguintes micro-organismos: *Micobacterium semegmatis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* (Figura 2 e Tabela 1). Após cerca de 6 meses, o extrato bruto não apresentou mais atividade antimicrobiana.

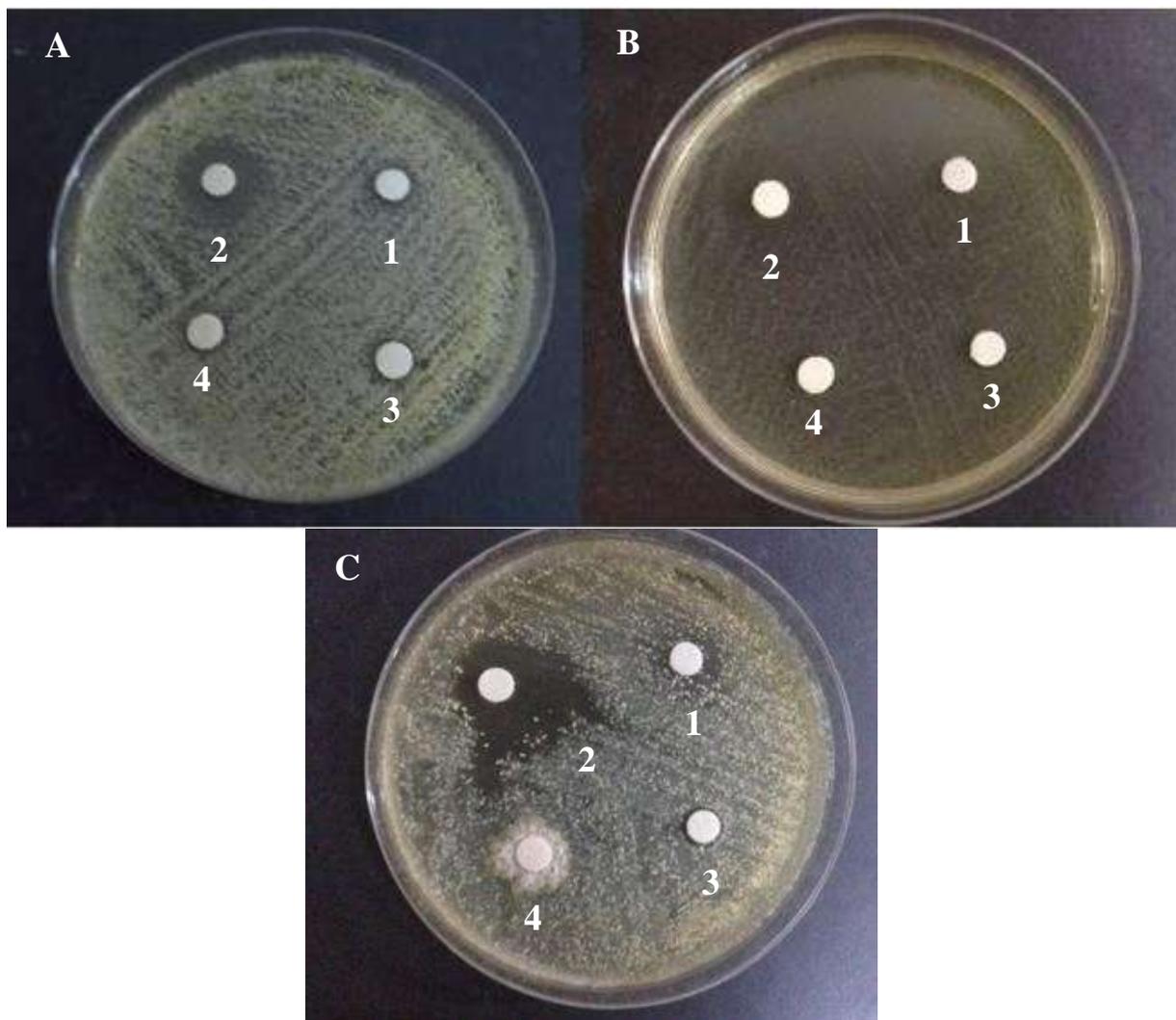
Tabela 1: Avaliação antimicrobiana dos extratos de kefir e açúcar

AMOSTRA	01	16	06	138	224	398	39	71	1007
Ciclohexano (kefir)	X	X	X	13,3 ± 0,5 mm	X	X	X	15 ± 0 mm	13,6 ± 0,5 mm
Ciclohexano (açúcar)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acetato de etila (kefir)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Acetato de etila (açúcar)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Metanol-água 8:2 (kefir)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Metanol-água 8:2 (açúcar)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Kefirana	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Staphylococcus aureus (UFPEDA – 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA-06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16), *Enterococcus faecalis* (UFPEDA-138), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA - 39), *Escherichia coli* (UFPEDA-224) *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71), *Serratia*

marcescens (UFPEDA - 398) e *Candida albicans* (UFPEDA-1007). Os resultados expressos representam a média dos halos de inibição com seu respectivo desvio padrão.

Figura 2: Avaliação antimicrobiana dos extratos de kefir e açúcar



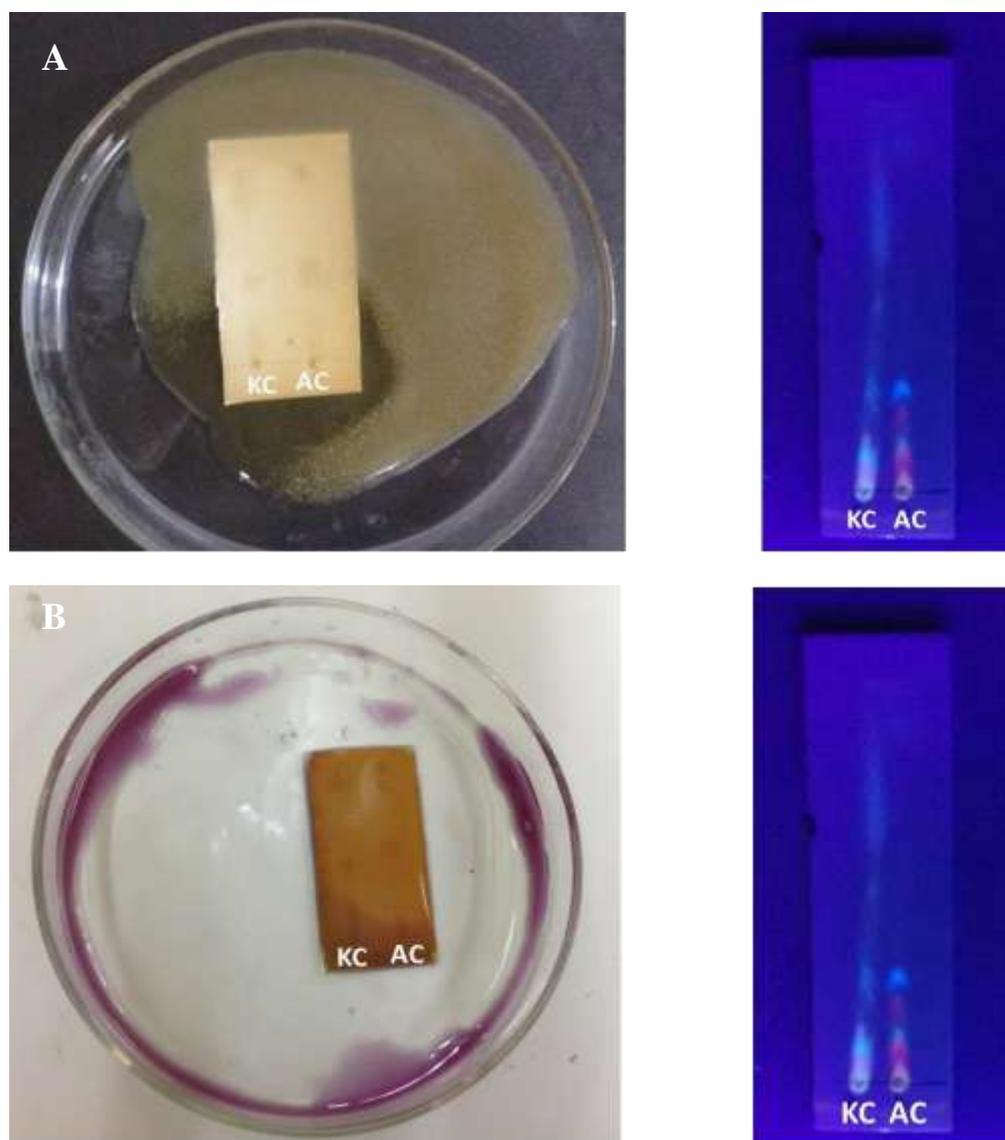
A: *Candida albicans*, **B:** *Enterococcus faecalis*, **C:** *Micobcterium smegmatis*. 1: kefirana, 2: CK, 3: AM, 4: AC.

5.4.2 Revelação Microbiológica

Os ensaios de bioautografia reafirmaram a ação antimicrobiana do extrato KC contra *E. faecalis* e *C. albicans*, apresentando consideráveis halos de inibição. Para o *E. faecalis*, a substância biotiva foi localizada pouco acima do ponto de aplicação, possivelmente

relacionada a bandas claras observadas nesta área da placa. Quanto à *C. albicans*, o composto bioativo foi verificado ainda no ponto de aplicação (Figura 3). Os testes realizados com extratos do micro-organismo nº 29 e as frações do extrato KC, ambos contra *C. albicans*, não mostraram halo de inibição.

Figura 3: Revelação microbiológica do extrato de kefir em ciclohexano (CK)



A= *Candida albicans*; **B=** *Enterococcus faecalis*. KC: Extrato de kefir em ciclo hexano, AC: Extrato de açúcar em ciclo hexano. O solvente de corrida utilizado foi o toluene-acetato de etila 8:2.

5.4.3 Bloco de Gelose

Dentre os 25 microrganismos testados, apenas a espécie nº 29 apresentou ação inibitória frente à *C. albicans* (Figura 4). Trata-se de um bacilo gram-positivo produtor de biofilme, de rápido crescimento e aeróbio restrito.

Figura 4: Teste de bloco de gelose com espécies isoladas do BIONAT-01



5.4.4 Estria cruzada

Os resultados desse experimento confirmam a existência de uma relação de antibiose entre o micro-organismo nº 29 isolado do consórcio BIONAT 01 e a *C. albicans* (Figura 5).

Figura 5: Avaliação pelo ensaio de estrias cruzadas



As setas indicam zonas de inibição.

5.4.5 Sobrecamada de ágar

Não foram visualizados halos de inibição significantes. O tratamento com clorofórmio não impediu o crescimento do micro-organismo nº 29.

5.4.6. Análise de produção de substância inibitória

Tanto no teste de de difusão em ágar quanto na técnica de gotejamento não foram observados halos de inibição devido a proliferação do micro-organismo nº 29. Tanto o a separação por centrifugação e a inativação por aquecimento a 65° C não impediu a proliferação celular do mesmo, este comportamento sugere que se trata de um micr organismo esporulante assemelhando-se a bactérias do gênero *Bacillus*.

5.5 AVALIAÇÃO DAS INTERAÇÕES ENTRE CÉLULAS E EXTRATOS OU POLÍMEROS ISOLADOS DO CONSÓRCIO BIONAT 01

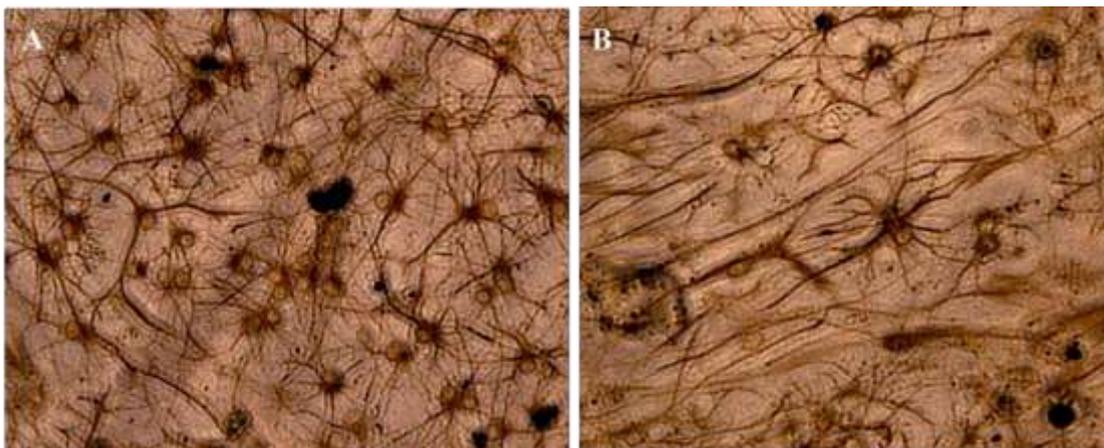
5.5.1 Produção de Filmes do Exopolissacarídeo

Os filmes apresentaram boa elasticidade e transparência. Em alguns experimentos, filmes com hidróxido de sódio alteraram o pH do meio. Filmes à base de DMSO não se mantiveram íntegros até o fim do tratamento das culturas.

5.5.2 Análise da Biocompatibilidade do Exopolissacarídeo Como Suporte Para Cultura de Astrócitos

Astrócitos de cultura primária em filmes de NH_4OH mostraram-se bem desenvolvidos, com diversas ramificações (Figura 6).

Figura 6: Cultura primária de astrócitos em filme de kefirana (NH_4OH)



A= Controle, B= Filme de kefirana (NH_4OH)

5.5.3 Viabilidade Celular de Linhagens de Células Tumorais

As amostras avaliadas não apresentaram citotoxicidade em células HeLa pelo método do MTT, mesmo quando avaliadas serialmente em concentração de log 2 (Tabela 2). Nas linhagens MCF-7, NCI-H292 e HEP-2 não houve citotoxicidade significativa, visto que os extratos foram testados em alta concentração (50 $\mu\text{g/ml}$) e ainda assim apresentaram inibição do crescimento menor que 50% (Tabela 3).

Tabela 2: Viabilidade de células HeLa tratadas com extratos de kefir e kefirana

EXTRATO	VIABILIDADE (%) *
Ciclohexano (kefir)	85
Ciclohexano (açúcar)	79
Acetato de etila (kefir)	99
Acetato de etila (açúcar)	117
Metanol-água 8:2 (kefir)	78
Metanol-água 8:2 (açúcar)	93
Kefirana	83

*Valores expressos em média aritmética.

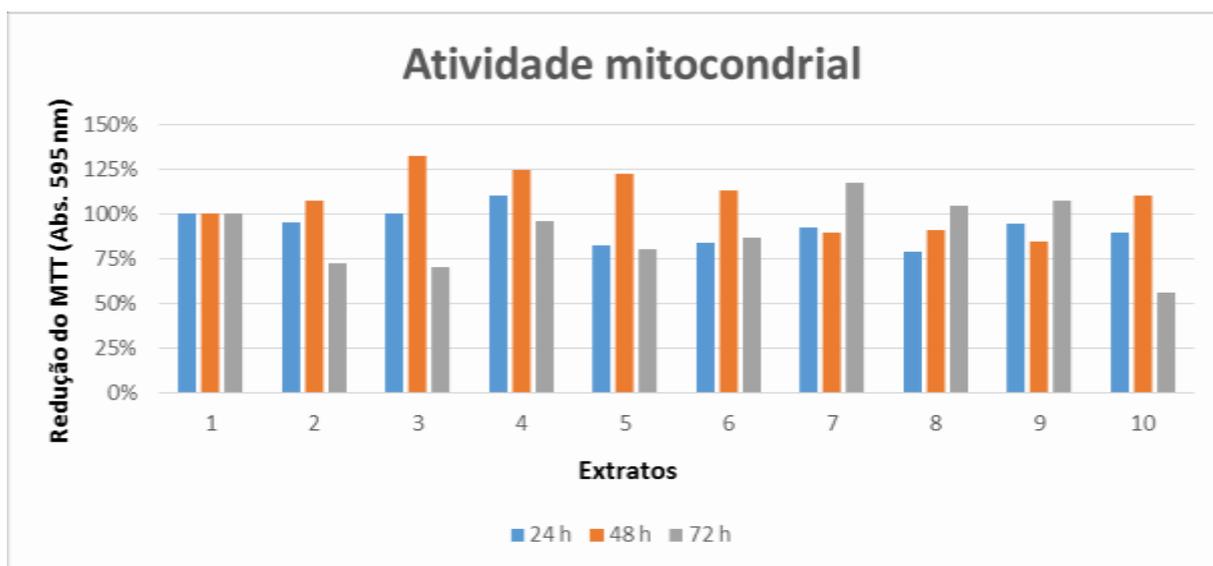
Tabela 3: Taxa de inibição do crescimento celular das amostras de extratos de kefir e kefirana em linhagens tumorais

Amostras	MCF-7 (%)	± (SD)	HEP-2 (%)	± (SD)	NCI-H292 (%)	± (SD)
DOX	82,7	2,5	91,6	0,32	91,9	0,67
EXOPOLISSACARÍDEO	43,5	2,3	21,6	2,8	40,2	1,8
KC	44,3	1,1	26,1	0,40	32,3	4,9
AC	34,6	1,8	19,4	0,12	31,0	1,2
KA	40,2	2,2	26,4	2,8	35,5	3,7
AA	0,0	0,0	21,3	4,3	28,7	7,7
KM ¹	36,8	8,8	26,6	8,4	36,8	3,8
KM ²	0,0	0,0	17,4	3,02	33,1	0,26
AM	38,4	3,7	37,3	2,6	48,4	4,1

¹ Fração sólida, ² Fração líquida. SD: intervalo de confiança, DOX: Doxorrubinina, MCF-7: carcinoma mamário humano, NCI-H292: carcinoma pulmonar humano, HEP-2: carcinoma de colo uterino humano, KC: Extrato de kefir em ciclo hexano, AC: Extrato de açúcar em ciclo hexano, KA: Extrato de kefir em acetato de etila, AA: Extrato de açúcar em acetato de etila, KM: Extrato de kefir metano-água 8:2, AM: Extrato de açúcar metano-água 8:2.

Decorridas 48 h, o extrato de kefir em ciclohexano apresentou um aumento de pouco mais do que 25% na atividade da succinate desidrogenase da cultura primária de astrócitos, sendo que os extratos de açúcar em ciclohexano e kefir em acetato de etila mostraram um desempenho semelhante. Com excessão da kefirana e dos extratos de kefir e açúcar em metanol-água 8:2, que causaram maior atividade mitocondrial em 72 h, todas as amostras analisadas apresentaram maior atividade mitocondrial em 48 h (Figura 7).

Figura 7: Viabilidade celular de cultura primária de astrócitos corticais após tratamento com extratos de kefir, kefirana e líquido metabólico do kefir



1: Meio c/ células, 2: Células c/ DMSO, 3: Kefir ciclohexano 4: Açúcar ciclohexano, 5: Kefir acetato, 6: Açúcar acetato, 7: Kefir metanol-água, 8: Açúcar metanol-água, 9: Kefirana, 10: Líquido metabólico do kefir.

5.5.4 Ensaio de Citotoxicidade, Viabilidade e Apoptose

As amostras testadas mantiveram a viabilidade dos astrócitos em cultura semelhante àquela verificada no controle negativo. Em concordância, o mesmo se deu para o ensaio de citotoxicidade, exceto com o extrato AM, que apresentou uma atividade citotóxica de cerca de 40%, maior que a do controle positivo. Não houve atividade apoptótica significativa.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo testamos a hipótese de que extratos orgânicos obtidos a partir dos grãos do kefir de água (consórcio BIONAT 01) e de seus derivados, o líquido fermentado e o carboidrato kefirana apresentariam atividade antimicrobiana, antioxidante e antitumoral. A opção por utilizar extratos orgânicos foi definida pela possibilidade de se avaliar a atividade dos metabólitos secundários do kefir na ausência de proteínas, presentes na forma liofilizada.

O kefir vem sendo caracterizado como um alimento funcional com ação contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ter efeito sobre alguns fungos (CEVIKBAS et al., 1994; THOREUX & SCHMUCKER, 2001; ANSELMO et al., 2010; PRADO et al., 2016). Há evidências de que alguns de seus compostos bioativos, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos sejam os responsáveis pela morte dos micro-organismos patogênicos, além da redução do pH resultante do processo fermentativo, tornando o meio impróprio para o seu desenvolvimento (PĂUCEAN; SOCACIU, 2008; SILVA et al., 2009; RAIMUNDO, 2013). No entanto, vários estudos apresentam resultados conflitantes quanto ao espectro antimicrobiano contra vários patógenos quando se utiliza kefir de diferentes origens (KIM, et al., 2016).

Utilizando o teste de difusão em disco verificamos que os extratos de kefir e açúcar avaliados frente a representantes dos grupos de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, Álcool-Ácido resistentes e de leveduras, apenas o extrato kefir-ciclohexano (KC) apresentou atividade inibitória frente aos micro-organismos *Mycobacterium semegmatis*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Além disso, também foi verificada a relação de antibiose entre um dos micro-organismos isolados do consórcio BIONAT 01 (nº 29) frente à *C. albicans*.

A atividade do kefir de leite sobre várias espécies de *Candida* foi relatada inicialmente por Cevikbas et al. (1994). Neste trabalho prévio, foi utilizado o líquido filtrado do kefir na ausência do grão *per se* e nenhuma extração orgânica foi realizada. Assim, além das diferenças nas propriedades do kefir de leite e de água e na composição microbiana entre o kefir utilizado por Cevikbas et al., (1994) e o consórcio BIONAT 01, as evidências aqui obtidas sugerem que a ausência de proteínas não interfere neste tipo de atividade antifúngica, o que indica que uma molécula do metabolismo secundário poderia ser responsável pela ação frente ao representante do grupo das leveduras e bactérias Gram-positivas e Álcool-Ácido resistentes. O mesmo argumento vale para a atividade antibacteriana aqui detectada. Ausência de bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobiais, no extrato KC indica que

moléculas apolares de metabólitos secundários são de fato as responsáveis pelas atividades apresentadas neste estudo, contra estes agentes patogênicos. Evidências prévias da literatura indicam que uma das principais vias antimicrobianas do sobrenadante do kefir se dá pela produção de ácidos orgânicos durante a fermentação (GARROTE et al. 2000; GAWARE et al., 2011; KIM, et al., 2016). Wolfe et al. (2013) detectaram a presença de flavonóides no kefir, com ação antioxidante, que poderiam ser responsáveis ou co-responsáveis, pela ação antimicrobiana deste probiótico. Uma avaliação química mais detalhada, associada a um autobiograma, será necessária para investigar que classes de metabólitos secundários estão presentes no KC a partir do grão do kefir BIONAT 01.

A inexistência de atividade antioxidante *in vitro* ou citotóxica em quatro linhagens de células tumorais, indica a presença de compostos de baixo índice de hidroxilação. Observa-se que as extrações com solventes de baixa polaridade, não foi capaz de extrair compostos com ação antiproliferativa e outras que atuam positivamente no equilíbrio redox, sugerindo novamente que os substituintes moleculares apresentam baixo índice de hidroxilação. Atividade antioxidante do kefir de leite vem sendo amplamente investigada e em parte atribuída a peptídeos derivados de caseína que apresentam melhora em sua atividade redutora na presença de lactobacillus presentes no kefir do leite (BOSQUE, 2007; GONZÁLES- OLIVARES et al., 2011). Recentemente a atividade antioxidante da água fermentada pelo kefir na presença de pedaços de maçã foi demonstrada utilizando-se testes *in vitro* (ALSAYADI et al., 2013). De acordo com estes autores, o kefir de água apresentou atividade no teste DPPH (9.88-63.17%) e inibiu a oxidação do ascorbato (6.08-25.57%). Tais efeitos foram discutidos como potencialmente devidos a presença de ácido láctico, bactérias ácidas e fungos. Como este kefir foi produzido em substrato no qual havia fatias de maçã, deve-se considerar a presença de componentes antioxidantes como aqueles citados por Wolfe et al. (2003). As substâncias produzidas pelo consórcio bacteriano das amostras de BIONAT 01, produzidas em água e açúcar mascavo, provavelmente diferem daquelas produtoras dos componentes citados por *Alsayadi* et al., (2013). Assim, os resultados obtidos com os extratos orgânicos do grão de kefir BIONAT 01 não apresentaram atividade antioxidante nos componentes apolares desta amostra. Ressalta-se que as ações benéficas e variadas previamente descritas para o kefir cultivado em diferentes meios, podem ser devidas a um tipo diferente de bactérias e leveduras presentes em seus respectivos consórcios, que podem fornecer uma gama bastante diversificada de princípios ativos, podendo promover ações fisiológicas específicas.

7. CONCLUSÕES

Apenas o extrato de kefir em ciclohexano (CK) apresentou atividade inibitória contra *Cândida albicans*, *Micobacterium smegmatis* e *Enterococcus faecalis*. Ensaio de antibiose também confirmaram a ação antimicrobiana do microrganismo 29, isolado do consórcio BIONAT 01, frente a *C. albicans*. Tanto o kefir quanto seus derivados, o líquido metabólico e o exopolissacarídeo isolado, não demonstraram efeitos citotóxicos frente as linhagens celulares testadas, mantendo a viabilidade celular próxima ao controle em quase todas as amostras testadas. Os extratos de kefir avaliados não apresentaram ação antioxidante no ensaio com DPPH.

8. PERSPECTIVAS

O conhecimento a respeito de compostos e bactérias que apresentem ação inibitória sobre *C. albicans* abre perspectiva para a sua utilização na indústria farmacêutica, tendo em vista o limitado número de medicamentos disponível no mercado para o tratamento da candidíase, além da ocorrência de espécies resistentes. Assim, novos extratos de grãos de kefir serão produzidos com o intuito de isolar o composto com ação antifúngica contra *C. albicans*.

Até o momento, nenhuma ação danosa ou patogênica foi relacionada ao kefir ou seus derivados na bibliografia analisada. Várias tentativas de produção do carboidrato em massa através de linhagens isoladas dos grãos de kefir vêm sendo realizadas há décadas, sendo que até o momento nenhuma obteve sucesso, o que reforça o aspecto simbiótico do consórcio, onde algumas de suas propriedades são alcançadas apenas através da atividade conjunta dos micro-organismos da população.

A ausência de toxicidade do extrato orgânico do grão de kefir em células neurais indica a potencialidade de usar o mesmo em estudos adicionais nestas células. Neste sentido, serão realizados experimentos futuros a fim de corroborar os resultados preliminares até então obtidos em cultura primária de astrócitos. Além disso, ensaios de atividade anti-inflamatória contra dano induzido por LPS serão conduzidos com o intuito de analisar o desempenho dos extratos do grão de kefir e seu carboidrato em células HeLa e cultura primária de astrócitos corticais.

Os experimentos preliminares realizados utilizando o carboidrato extraído do kefir como suporte para astrócitos também deverão ser repetidos para que esta etapa possa ser concluída.

9. CARACTERIZAÇÃO E RELEVÂNCIA BIOTECNOLÓGICA DE PROBIÓTICOS: ÊNFASE EM KEFIR E SEU DERIVADO KEFIRANA

Revisão da literatura a ser submetida em inglês à revista *International Journal of Food Microbiology* (Official journal of the International Committee on Food Microbiology and Hygiene (ICFMH) of the International Union of Microbiological Societies (IUMS))

Elsevier; Fator de impacto = 3.4

Autores: Aline Lima do Nascimento¹, Belmira Lara da Silveira Andrade-da-Costa², Claudia Sampaio de Andrade Lima¹, Ricardo Yara³,

1. Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

2. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

3. Departamento de Engenharia biomédica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Author correspondente

Dr. Ricardo Yara

Departamento de Engenharia Biomédica, Centro de Tecnologia e Geociências Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil CEP 50670-901

Fones: (81) 2126 7325 /

FAX (81) 2126 8200

9.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimento funcional é qualquer componente de um alimento que proporciona benefícios para a saúde além de suas funções nutricionais básicas (BRASIL, 2009), inclusive a prevenção e o tratamento de doenças. Eles podem variar desde nutrientes isolados, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados até alimentos processados e derivados de plantas (ANJO, 2004).

Benefícios fornecidos pelos alimentos funcionais garantem a manutenção da saúde, modulando a fisiologia do organismo e promovendo estimulação do sistema imune, efeito

hipotensivo, hipoglicêmico, hipocolesterolemizante, redução dos riscos de aterosclerose e efeitos anticancerígenos, dentre outras (GOMES, 2002).

Essa categoria de alimento surgiu no Japão, na década de 80, conhecida como Alimentos para Uso Específico de Saúde –*Foods for Specified Health Use* (FOSHU), como resultado de esforços governamentais para desenvolver alimentos que possibilitassem a redução dos gastos com saúde pública, considerando a elevada expectativa de vida naquele país (STRINGHETA, et al., 2007; ARAYA & LUTZ, 2003).

Em 1989 foi introduzido o termo nutracêutico, a fim de diferenciar os alimentos funcionais dos medicamentos (ANJO, 2004). A principal diferença entre esses dois grupos alimentares é que os alimentos funcionais se apresentam na forma de alimento comum e são consumidos como parte de uma dieta normal, já os nutracêuticos podem estar na forma de medicamentos, suplementos dietéticos ou outras formulações (KWAK & JUKES, 2001).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento de sistemas fisiológicos e como antioxidantes (SOUZA, et al., 2003).

Sabe-se que quanto menor for a frequência da ingestão de compostos bioativos provenientes de vegetais maior será o risco de se obter doenças crônicas não transmissíveis, contribuindo na mesma magnitude do consumo excessivo de alimentos calóricos e de gorduras totais e saturadas na dieta. Isso indica que os compostos bioativos, da mesma forma que os demais nutrientes, são essenciais para garantir qualidade de vida e longevidade (BASTOS et al., 2009).

9.2 PROBIÓTICOS

O termo probiótico designa micro-organismos vivos derivados de ingredientes alimentares que tem efeito benéfico à saúde humana. Este conceito surgiu no século XX, quando o ganhador do prêmio nobel Elie Metchnikoff sugeriu a hipótese de que a longevidade e saúde de camponeses búlgaros seria atribuída ao consumo de produtos de leites fermentados por bacilos (*Lactobacillus*) que influenciavam positivamente a microflora do cólon, diminuindo a atividade tóxica microbiana (SANDERS, 1999).

As bactérias probióticas usualmente estudadas incluem membros dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (FAO/WHO, 2006; WGO, 2011), mas o fermento *Saccharomyces cerevisiae* e algumas espécies de *Escherichia coli* e *Bacillus* também são utilizadas como probióticos (WGO, 2011). Até o momento os probióticos aprovados pela ANVISA para a constituição de alimentos são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Enterococcus faecium*. (BRASIL, 2016).

Os probióticos devem aderir à mucosa intestinal e colonizar, mesmo que de forma temporária, o trato gastrointestinal; produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativos no intestino, impedindo ou reduzindo a aderência e a proliferação de patógenos; ser inócuos, manter-se viáveis por longo tempo durante a estocagem e transporte, tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação da bile e das secreções pancreática e intestinal e não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos, assim como resistir a fagócitos e ao oxigênio (COPPOLA & GIL TURNES, 2004).

Bactérias ácido-láticas, entre as quais se encontra o gênero *Lactobacillus*, são utilizadas para a conservação de alimentos por fermentação há milhares de anos e podem exercer uma função dupla, atuando como agentes fermentadores dos alimentos e gerando efeitos benéficos à saúde (WGO, 2011). Os probióticos também têm sido empregados na medicina humana para prevenção e tratamento de doenças, na regulação da microbiota intestinal e em distúrbios do metabolismo gastrointestinal (COPPOLA & GIL TURNES, 2004), como imunomoduladores (YAO, et al., 2009; KALLIOMAKI, et al., 2010), na inibição de enzimas pró-carcinogênicas (KUMAR, et al., 2010), como imunoestimuladores de células CD4 em pacientes infectados pelo vírus HIV (TROIS, et al., 2008) e infecções do trato urinário e respiratório (KAUR, et al., 2009). Além disso, pesquisas sugerem que os probióticos tem efeito benéfico aliviando sintomas associados ao envelhecimento, fadiga, autismo, e reduzindo os riscos de osteoporose, obesidade e diabetes tipo 2 (CENCIC & CHINGWARU, 2010). Em medicina veterinária, além dessas aplicações, podem também ser usados como promotores de crescimento, tornando-se uma alternativa aos antibióticos, cujo uso indiscriminado pode selecionar cepas resistentes (COPPOLA & GIL TURNES, 2004).

Para tanto, os probióticos apresentam diversos mecanismos de ação no organismo, um deles é a exclusão competitiva, na qual eles competem com os patógenos por sítios de fixação e

nutrientes, impedindo sua ação transitoriamente. Ainda, a exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada e de elevadas doses dos probióticos para manifestar seus efeitos. Os probióticos podem também afetar patógenos através da síntese de bacteriocinas, de ácidos orgânicos voláteis e de peróxido de hidrogênio, ou atuar sobre o metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo e liberando enzimas como a lactase (COPPOLA & GIL TURNES, 2004).

A administração de *Lactobacillus casei* foi relacionada com a indução de uma resposta antitumoral mediada por células T e a ativação de macrófagos (KATO et al., 1988) e, assim como a supressão da formação de tumores de cólon em camundongos (KATO et al., 1994) e a inibição de metástases pulmonares (CHEN et al., 2007). Bactérias do gênero *Bacillus* também podem estimular a resposta imune e ser utilizadas como imunomoduladores. Em ensaio *in vivo*, *Bacillus firmus* aumentou a resistência contra infecção por *Listeria monocytogenes* em camundongos (COPPOLA & GIL TURNES, 2004).

Este efeito imunomodulador está relacionado à capacidade dos micro-organismos do probiótico de interagirem com as placas de Peyer e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA e a migração de células T do intestino. Pesquisas também têm demonstrado que os probióticos favorecem a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, sugerindo uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002).

A tabela a seguir apresenta uma síntese dos possíveis mecanismos de ação dos probióticos:

Tabela 4: Mecanismos de ação dos probióticos

AÇÃO	POSSÍVEIS CAUSAS E MECANISMOS
Resistência a patógenos entéricos	Exclusão competitiva Síntese de bacteriocinas, ácidos orgânicos voláteis e de H ₂ O ₂ Redução de amônia no organismo Liberação de enzimas (ex. lactase) Secreção de mediadores do sistema imune Resistência à colonização Alterção das condições intestinais (pH*, ácidos graxos) Alteração do sítio de ligação das toxinas

	<p>Influência na população da flora intestinal</p> <p>Aderência à mucosa intestinal, interferindo na aderência dos patógenos</p> <p>Aumento da produção de mucina, interferindo na ligação do patógeno ao epitélio intestinal</p>
Câncer	<p>Inibição de enzimas pró-carcinogênicas</p> <p>Neutralização de efeitos mutagênicos e genotóxicos no cólon e outros órgãos</p> <p>Resposta imune</p> <p>Influência na concentração de sais biliares secundária</p>
Imunomodulação	<p>Estimulação de células B produtoras de IgA e a migração de células T</p> <p>Ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune</p> <p>Fortalecimento da defesa não específica contra infecções e tumores</p> <p>Efeito adjuvante em resposta imune antígeno-específica</p>
Digestão da lactose	<p>Alguns probióticos possuem níveis reduzidos de lactose e maior disponibilidade de lactase quando comparados a outras classes de alimentos</p>
Aumento do crescimento bacteriano no intestino delgado	<p>Diminuição de metabólitos tóxicos</p>
Alergia	<p>Prevenção da translocação do antígeno na corrente sanguínea</p>
Doenças cardiovasculares	<p>Assimilação do colesterol pela célula bacteriana</p> <p>Produção de inibidores da síntese de colesterol</p> <p>Precipitação do colesterol como sais biliares desconjugados</p> <p>Efeito antioxidante</p> <p>Ação de peptidases na produção de tripeptídeos derivados da proteína do leite que inibem a enzima conversora de angiotensina I</p> <p>Componentes da parede celular agem como inibidores da enzima conversora de angiotensina</p>

Infecção urogenital	Adesão as células do trato vaginal e urinário
	Resistência à colonização Inibição da produção de H ₂ O ₂ e biossurfactantes
Infecção causada por <i>Helicobacter pylori</i>	Produção de inibidores de <i>H. pylori</i> (ex.: ácido láctico)
Encefalopatia hepática	Inibição da produção de urease pela flora intestinal
Melhor digestibilidade	Degradação parcial das proteínas, lipídeos e carboidratos
Melhor valor nutritivo	Tem em sua constituição vitaminas do complexo B e alguns aminoácidos essenciais como metionina, lisina e triptofano

*Distúrbios como diarreia, colite mucosa e ulcerosa, diverticulite e colite antibiótica são controlados pela acidez (MORAES & COLLA, 2006)

Fonte: Adaptado de Sanders (1999) e Moraes & Colla (2006)

A quantidade de probiótico necessária para beneficiar a saúde não é clara. Alguns autores defendem que os benefícios à saúde somente seriam alcançados com dosagens diárias de 10⁹ UFC/dia. Em concordância, a ANVISA recomenda uma dose diária de 10⁸ ou 10⁹ UFC (RAIMUNDO, 2013). Em doenças crônicas ou imunológicas os efeitos dos probióticos dependem também da duração do tratamento e de interações entre os respectivos microrganismos e o sistema imune intestinal. Para avaliar a eficácia de um probiótico faz-se necessária a identificação de grupos alvo específicos de indivíduos com maior suscetibilidade ao potencial efeito probiótico tendo em vista as diferenças fisiológicas inerentes ao gênero, idade, estilo de vida, entre outros aspectos (CENCIC & CHINGWARU, 2010).

9.3 KEFIR

Kefir é uma bebida fermentada, ligeiramente ácida e espumosa, de fácil preparo e economicamente acessível, originada da ação da microbiota natural presente nos grãos (WESCHENFELDER, et al., 2009). Trata-se de um consórcio microbiano composto essencialmente por bactérias (em torno de 83-90% ácido lácticas e ácido acéticas) e leveduras (cerca de 10-17%) em um sistema simbiótico (BOSCH, et al., 2006; WESCHENFELDER, et al., 2009; BASCHALI, et al., 2017) envolvido por uma matriz de polissacarídeos insolúveis secretados por alguns desses micro-organismos.

Os grãos podem ser cultivados nos mais variados tipos de meio como leite de diferentes espécies, soro de queijo, leite de soja, de arroz, de coco, sucos de frutas, solução aquosa de

sacarose, de melão, de cacau, entre outros, adquirindo uma coloração referente ao substrato utilizado. Um dos tipos de grãos mais comuns é o cultivado em água com açúcar mascavo (sacarose), também chamado kefir d'água (MAGALHÃES et al., 2011; PUERARI; MAGALHÃES; SCHWAN, 2012).

Durante a fermentação os grãos multiplicam-se e aumentam de volume, passando suas propriedades às gerações seguintes de novos grãos e dispersando os micro-organismos no líquido de cultivo. Após o terceiro ou quarto dia de fermentação no leite sem que haja a renovação do substrato os grãos perdem a capacidade de se multiplicar e os micro-organismos do consórcio morrem (WESCHENFELDER et al., 2009).

Tradicionalmente, os grãos de kefir são adicionados ao leite (ou outro substrato de interesse) e deixados a temperatura ambiente para fermentação por 18–24 h. Após esse período os grãos são removidos e podem ser usados para um novo ciclo de fermentação. O líquido fermentado está pronto para consumo (BASCHALI et al., 2017).

A partir do kefir de leite pode-se obter o leban e o soro de kefir. O leban é a fase sólida, obtida da filtração do kefir de leite. É um produto leve e altamente digerível, de textura pastosa que pode ser consumido puro ou usado em formulações substituindo o *cream chesse* ou queijo *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 pela indústria alimentícia (WESCHENFELDER et al., 2009).

Não obstante, o kefir é bastante explorado industrialmente em determinadas regiões, especialmente no leste europeu. Na Rússia, por exemplo, o Kefir de leite bovino é fabricado por inúmeras indústrias lácteas como a Danone (“Activia Kefir” e “Danone Kefir”), a Samaralacto (“Bio Balance”, “Prostokvashino” e “Dr. Brandt”), a Ufamolagroprom (Veselyi molochnik) e a Lianozovo (“Domik v derevne”) (ENIKKEEV, 2012) Além disso, alguns trabalhos estudam a produção de kefir a partir de produtos e subprodutos da indústria alimentícia (KUO e LIN, 1999).

9.3.1 História

Conhecido como kefir ou kefyry na Ásia Central e Oriente Médio, ou ainda como kiaphur, kefer, knapon, kepi ou kippi na região Cáucaso-Balcãs, é uma das mais antigas

bebidas fermentadas à base de leite (PRADO, 2014; SETYOWATI & SETYANI, 2016). A palavra kefir tem origem na palavra turca “keyif”, que significa “bons sentimentos”, descrevendo a sensação experimentada quando consumido (BASCHALI et al., 2017).

Não há registros da data ou ano em que o kefir foi feito pela primeira vez, mas uma das crenças é de que ele tenha surgido na região dos Himalaias no Tibet, no século XIV (CERFF, 2002). Contudo, a teoria mais aceita é de que sua origem remonte a mais de 2.000 anos a. C nas montanhas da região do Cáucaso, que atualmente compreende os territórios da Geórgia, Armênia, Azerbaijão e parte da Rússia (BARAN, 2002; MICHELI et al., 1999). As tribos muçulmanas desta região consideravam os grãos de kefir um presente de Alá e mantinham como tradição a passagem desses grãos apenas aos familiares próximos. A saúde e longevidade desses povos foram atribuídas ao consumo freqüente da bebida, o que despertou o interesse de médicos russos pelo produto no fim do século XIX (SANTOS, 2008; SCHNEEDORF, 2012).

Outra explicação para a ocorrência dos grãos é a de que, durante o contínuo uso do mesmo recipiente para armazenar leite, suas paredes foram cobertas por colônias de microrganismos com aparência semelhante ao arroz cozido, que subsequentemente foram chamadas de grãos de kefir. A função e valor desses grãos formados por acidente foi aparentemente percebida e desde então a produção do kefir ocorreu continuamente em muitas casas de famílias. A bebida foi originalmente preparada em vasos de barro, baldes de madeira, ou, mais frequentemente, em sacos de couro de cabra ou pele de ovelha (BASCHALI et al., 2017).

Na antiga União Soviética o kefir contava como 70% da quantidade total de leite fermentado consumido (CHEN et al., 2007), sendo que no final do século XIX a bebida começou a popularizar-se fora da Rússia, através de seu emprego em sanatórios, no tratamento de tuberculose e problemas gastrointestinais (SCHNEEDORF, 2012; PRADO et al., 2013).

Por sua vez, os grãos de kefir cultivados em água com açúcar (kefir de água, kefir de açúcar, tibicos ou tibi) também não possuem uma origem bem estabelecida, todavia a ideia de existirem múltiplas origens parece ser a mais plausível. Uma das hipóteses é de que esses grãos tenham surgido no México, retirados inicialmente da seiva de folhas de *Opuntia*, um gênero de cactos muito comum na região. Este tipo de kefir apresenta uma prevalência de bactérias ácido-láticas nos grãos (mais de 31±8%), enquanto leveduras são encontradas principalmente na suspensão (mais de 63±6%) (SCHNEEDORF, 2012; MARSH, A. J et al.,

2014).

9.3.2 Microbiota

A composição microbiana dos grãos de kefir é variável, sofre ndo influência da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato usado para proliferação dos grãos e das técnicas de manipulação (CARBALLO et al., 2006; WESCHENFELDER et al., 2009; RAIMUNDO, 2013). A produção industrial do Kefir é um processo muito complexo devido à dificuldade de se manter a estabilidade da população microbiana nos grãos ao longo do tempo (CARBALLO et al., 2006; PAIVA, 2013). Além do mais, tem sido verificado que culturas isoladas de micro-organismos de grãos de kefir não crescem em leite ou tem uma atividade bioquímica menor, dificultando ainda mais o estudo de sua população microbiana (FARNWORTH, 2005; MAALOUF et al., 2011; CHENEEDORF, 2012).

As bactérias que constituem o grão de kefir pertencem aos gêneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Acetobacter*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. *Lactobacillus* é o gênero dominante nos grãos enquanto *Lactococcus* e *Leuconostoc* são prevalentes no leite do kefir. Muitas das bactérias ácido lácticas nos grãos, como *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei*, *Pediococcus dextrinicus*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, entre outras, são conhecidas por suas propriedades probióticas (PAIVA, 2013; BASCHALI et al., 2017).

Quanto às leveduras, diferentes espécies têm sido associadas à fermentação natural do kefir de água: representantes dos gêneros *Saccharomyces*, *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Zygorulaspora* e *Candida*, além de *Dekkera spp.* (*D. anomola*, *D. bruxellensis*), *Hanseniaspora spp.* (*H. valbyensis*, *H. vineae*), *Lachancea fermentati*, sub-espécies de *Zygosaccharomyces* (*Z. lentus*, *Z. florentina*) e sub-espécies de *Meyerozyma* (BASCHALI et al., 2017).

Diferentes grupos de leveduras e bactérias tem sido identificados em amostras de kefir de diferentes regiões através de métodos moleculares ou cultura-dependentes. No entanto, o kefir é capaz de alterar sua razão bactérias/leveduras, assim como suas linhagens microbianas em função do tempo, condições experimentais, temperatura e micro-organismos vizinhos, no interior do grão. Apesar desta diversidade, alguns micro-organismos são prevalentemente comuns, tais como os gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Kluyveromyces* e *Acetobacter*, assim como também foram identificados alguns micro-organismos raros, como os gêneros *Chryseomonas* e *Kloeckera* (SCHENEEDORF, 2012).

9.3.3 Composição Bioquímica

A dupla fermentação no leite por bactérias e leveduras resulta na produção de um alimento rico em ácido lático, acético, fólico e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitaminas do complexo B [B₁, B₁₂, biotina, niacina (B₃) e piridoxina (B₆)], vitamina K, cálcio, manganês, aminoácidos e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares (HERTZLER et al., 2003). Nesse contexto, é necessário lembrar que os diferentes substratos utilizados podem acarretar em significativas diferenças na constituição bioquímica de cada kefir (SARKAR, 2007; RAIMUNDO, 2013).

No processo de fermentação o conteúdo de dióxido de carbono (CO₂) aumenta à medida em que o pH diminui, atingindo seu platô após 48 h (BASCHALI et al, 2017). Por sua vez, o ácido lático formado a partir da fermentação da lactose coagula o leite e age como conservante natural, evitando a contaminação do kefir por micro-organismos patógenos, este combina-se também com o cálcio e o ferro, facilitando a absorção desses elementos. Sua produção é fortemente proporcional à temperatura de incubação e à concentração do inóculo (CERFF, 2002), podendo alcançar valores entre 0,6 e 1 ml a cada 100 ml do produto final (BASCHALI et al, 2017).

As concentrações de vitaminas e aminoácidos aumentam durante a fermentação via enriquecimento metabólico. Tem sido proposto a produção de piridoxina, vitamina B₁₂, ácido fólico e biotina por micro-organismos do kefir depende da composição microbiana do consórcio e do tipo de leite utilizado, sendo que a incorporação de linhagens de *Propionibacterium freudenreichii* na microbiota do kefir pode enriquecer essa produção (BASCHALI et al, 2017).

O sabor e aroma únicos de cada tipo de kefir são resultado da atividade metabólica dos micro-organismos que compõem os grãos, destacando a fermentação láctica e outros tipos de fermentação com menores proporções, como a fermentação alcoólica. Desta forma, além dos nutrientes citados anteriormente a bebida pronta para o consumo possui também ácido fórmico, succínico, propiônico, orótico, cítrico, pirúvico, úrico, butírico isobutírico, capróico, caprílico, láurico e hipúrico, diferentes aldeídos como acetaldeído e propionaldeído, traços de álcool isoamílico e acetona (PAIVA, 2013; RAIMUNDO, 2013; VIANA, 2015).

Existem diferentes faixas de teores alcoólicos encontrados na literatura. Foram encontrados teores variáveis entre 0,03 a 1,8 g, a cada 100 g da bebida fermentada com os grãos de kefir no leite. O máximo conteúdo de álcool reportado foi de 38 g por litro da bebida,

o que equivale a um teor aproximado de 5% de etanol, semelhante ao encontrado na cerveja. Esse nível de etanol, porém, só foi alcançado após 7 a 10 dias de fermentação contínua da bebida. O teor alcoólico também varia com a temperatura de fermentação, podendo reduzir-se a quase um terço em 4 °C, quando comparado a 30 °C (VIANA, 2015).

A bebida possui ainda alta digestibilidade, que é comparada à natureza da coalhada, cujas proteínas sofreram desnaturação em vários níveis durante a fermentação, obtendo assim um alimento com partículas finamente divididas e facilmente penetradas pelos sucos gástricos (WESCHENFELDER et al., 2009; RAIMUNDO, 2013; VIANA, 2015).

Em pesquisa realizada com amostras de kefir de diferentes produtores foram encontradas concentrações entre 2,4 a 35,2 mg/l de aminas totais, com predominância da tiramina. Estas aminas são produzidas por bactérias ácido lácticas e podem apresentar atividade tóxica, porém, no estudo realizado por FONDÉN et al. (2006) as amostras de kefir analisadas não apresentaram concentrações tóxicas destes compostos (BASCHALI et al., 2017).

9.3.4 Características Físico-Químicas

Os grãos de kefir têm aspecto gelatinoso e irregular (SCHNEEDORF, 2012), com formato semelhante a flores de couve-flor, tamanhos que variam entre 0,5 e 3,5 cm de diâmetro e volume entre 0,5 e 20 mL por grão (CEVIKBAS et al., 1994; (WESCHENFELDER et al., 2009), de modo que novos grãos se originam exclusivamente da multiplicação ou repartição de grãos pré-existent (PRADO et al., 2013). Sua estrutura é considerada um biofilme (WANG et al., 2012).

A matriz do kefir é composta primariamente por proteínas (13%), debris celulares e polissacarídeos (24%) (RAIMUNDO, 2013). À essa estrutura é atribuída uma função protetora em relação as bactérias e leveduras presentes no consórcio, lhes conferindo uma resistência diferente ao estresse físico e químico quando comparadas a linhagens livres em solução. Schneedorf & Anfiteatro (2004) testaram a resistência da colônia de kefir contra três fatores adversos: exposição a radiação UV, administração de antibióticos (penicilina G, nistadina e estreptomina) e tratamento com gás (oxigênio e ozônio). Mesmo esses fatores sendo capazes de reduzir seu crescimento, nenhuma delas foi capaz de romper a estrutura do grão completamente ou afetar a capacidade de produção de biomassa, permitindo uma recuperação próxima do normal após a exposição. Em outro experimento os mesmos autores mostram que os grãos também foram capazes de crescer em solução de KCl a concentrações maiores do que 5 % e a temperaturas menores do que 4 °C.

Trata-se de uma bebida levemente ácida, cujo pH varia em torno de 4,2 e 5,5, de acordo com o tempo de fermentação (PRADO et al., 2013; RAIMUNDO, 2013). Os grãos de kefir podem ser ativados e cultivados por repetidas inoculações em meio fresco. Esse método permite um aumento da biomassa de 5% a 7% ao dia, devido ao crescimento dos microorganismos e à biossíntese dos componentes. A combinação de diferentes fatores pode influenciar nesse processo, tais como: renovação do substrato em intervalos regulares, temperatura de cultivo, lavagem dos grãos e presença de nutrientes em concentrações essenciais no meio de crescimento (CHEN et al., 2009; MACHADO et al., 2012; WANG et al., 2012).

Algumas diferenças podem ser apontadas entre os grãos de kefir de água e de leite, uma vez que os grãos cultivados em água com sacarose, na presença ou não de frutas (geralmente figo e limão), são partículas translúcidas e sua cor varia dependendo do tipo de açúcar utilizado, enquanto os grãos cultivados em leite são opacos e geralmente brancos. Alguns pesquisadores relatam a presença de uma matriz branca sobre a superfície dos grãos de kefir, provavelmente referente ao estágio assexuado do ciclo de vida da levedura *Geotrichum candidum*. Essa espécie de bolor surge ocasionalmente e não parece afetar o desempenho da colônia (CERFF, 2002).

9.4 EXOPOLISSACARÍDEOS

Exopolissacarídeos são polímeros extracelulares constituídos de centenas ou milhares de resíduos de monossacarídeos que podem ser produzidos por bactérias, leveduras, fungos e algas e proporcionam aos organismos produtores proteção contra ambientes adversos. Os principais biopolímeros utilizados são os de plantas (pectina, amido), de algas (alginato, carragenina) e os microbianos (dextranos, gomas xantana, gelana, curdlana) (VUYST & DEGEEST, 1999; WANG et al., 2008).

A kefirana (*kefirana* ou *kefirano*) foi reconhecida pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos como um produto Geralmente Considerado Seguro (GRAS) (ELSAYED et al., 2016). Ela possui 21 unidades de repetição hexassacarídica contendo 3 resíduos de D-glicopiranosose e 3 de D-galactopiranosose (KOOIMAN, 1968; MAEDA et al., 2004; SERAFINI et al., 2014). Além disso, o kefir de água possui uma matriz exopolissacarídica constituída principalmente por dextrano, um homopolissacarídeo bem menos complexo que a kefirana, contendo apenas resíduos de D-glicose. Seus principais

produtores são *L. brevis* e *L. hilgardii* (HORISBERGER, 1969; WALDHERR et al., 2010). Descrito pela primeira vez por Kooiman em 1968, o expolissacarídeo kefirana tem vários representantes do gênero *Lactobacillus* indicados como seus produtores, tais como *L. kefir* (antes conhecido por *L. brevis*), *L. parakefiri*, *L. kefiranofaciens* sub-espécies *kefiranofaciens* e *kefirgranum*, dentre outros (BARAN, 2002; MICHELI et al., 1999; TADA et al., 2007).

O polímero de kefirana é bastante resistente à hidrólise e forma géis em soluções aquosas contendo etanol (MOREIRA et al., 2008). Além da função protetora, a kefirana é uma matriz de sustentação e coesão para os diversos componentes microbiológicos dos grãos de kefir (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004; RAIMUNDO, 2013). Pode ser usada como substrato fermentável para outros micro-organismos no kefir de leite, interferindo assim na dinâmica populacional do consórcio. Além disso, a matriz de kefirana mostrou modular a expressão de genes PRL2010, assim como de partículas sortase-dependentes, que já foram previamente descritas por desempenhar um papel central na via de interação com o hospedeiro (SERAFINI et al., 2014).

Alguns poucos artigos relatam a ocorrência de um oligossacarídeo isolado da fração aquosa do kefir de água, denominado carboidrato do kefir de água, uma variação da kefirana do leite. Soluções deste carboidrato preparadas a 0,1 % apresentaram um rendimento médio de 1,1 g/kg⁻¹ de grãos secos, viscosidade intrínseca de 0,297±0,03 dL/g⁻¹, densidade relativa de 1,044 g/mL⁻¹ e condutividade elétrica de 2,46 μS/cm⁻¹. Análises por espectroscopia de infra-vermelho (FTIR) propõem que este carboidrato possui uma natureza polihidroxilada, com características de compostos alifáticos. Métodos de cromatografia gasosa em camada delgada sugerem que os resíduos monossacarídicos do carboidrato de kefir de água são compostos por glicose (40 %), raminose (24 %), galactose (10 %) e arabinose (26 %). Através de análise por Cromatografia Líquida de Alta Afinidade (HPLC), foi determinado um peso molecular de 3534 Da, sugerindo uma estrutura oligossacarídica de dez monômeros (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004).

9.5 APLICAÇÕES DO KEFIR E DA KEFIRANA

Os grãos de kefir fazem parte de uma cultura milenar sendo encontrados em quase todas as partes do mundo: na China e no Tibete são usados como fermento natural para a produção de bebidas lácteas carbonatadas (PRADO, 2014); na Rússia o kefir tem sido rotineiramente administrado para o tratamento de úlceras peptídicas (BASCHALI et al., 2017) e no Nordeste

do Brasil a organização comunitária da Pastoral da Criança distribui grãos de kefir para mães com crianças que sofrem de doenças gastrointestinais (KIM, et al., 2016).

Um dos primeiros registros literários do seu emprego terapêutico data do início da década de 1970, quando o pesquisador russo Batinkov sugeriu o emprego da bebida probiótica para o tratamento de úlceras pépticas e duodenais. A partir de então, passaram a surgir diversos trabalhos sobre a utilização do kefir no tratamento de doenças pancreáticas, pneumonia, bronquite e tuberculose, entre outras doenças (OTLES & CAGINDI, 2003).

- *Ação anti-inflamatória*

O kefir parece exercer efeito benéfico na resposta à inflamação aguda, possivelmente estimulando a participação de mediadores de prostaglandinas, em maior proporção do que apenas histamina e serotonina. Em experimento *in vivo*, suspensões orais de kefir administradas trinta minutos antes do estímulo inflamatório resultaram em uma taxa de inibição de edema de 62%, contraposta a uma inibição de 40% exercida pelos grãos mecanicamente desintegrados (SCHENEEDORF, 2012). Resultados semelhantes foram obtidos em modelo inflamatório utilizando a fração isolada de carboidrato testada contra carragenina (30,4% de inibição) e dextrano (54,8%) (MOREIRA et al., 2008) O caráter anti-inflamatório do kefir também foi evidenciado em ensaios realizados com ratos asmáticos (VIANA, 2015).

Ensaio anti-granuloma conduzido com kefir de leite e de água indicam que o tratamento oral com os dois tipos de suspensão tem valores similares de inibição (41±3% para o kefir de água e 44±6% para o kefir de leite), enquanto a kefirana isolada do kefir de água apresentou menor desempenho (34±2 %) (SCHENEEDORF, 2012).

Em grãos de kefir modificados, a ação anti-inflamatória foi avaliada por modelo de edema em patas de ratos, mostrando-se maior do que a atividade de grãos nativos. Estes grãos modificados foram obtidos através de um processo artificial de internalização dos grãos pela incorporação de bactérias de interesse. A modificação dos grãos se deu a partir de uma mistura de 10 tipos de *Lactobacillus* e *S. cerevisiae* (SCHENEEDORF, 2012).

Ensaio *in vivo* também foram realizados em outros mamíferos. Cães diagnosticados com balanopostite, uma inflamação comum na mucosa que reveste a glândula peniana e o prepúcio, apresentaram maior remissão dos sintomas (62,5%) quando comparados ao grupo controle (37,5%) após 3 dias de tratamento com uma pomada a base de kefir a uma concentração de 70% (as análises foram feitas passados 25 dias de experimento). Além disso,

a pomada de kefir apresentou efeito frente ao gênero *Staphylococcus* em maior grau do que o controle (nitrofurazona a 0,2%), diminuindo sua frequência em 57% e ainda assim preservando a microbiota natural do animal (SCHENEEDORF, 2012).

Com base em ensaios anti-inflamatórios e de disfunção tireoidiana induzida pelo inseticida organofosforado clorpirifós, Rasipin e colaboradores (2016) sugerem que a via anti-inflamatória do kefir se dê pela diminuição dos níveis séricos de TNF- α com tendências à diminuição dos níveis séricos de T4, além da produção de IL-10 por bactérias ácido lácticas. Outros estudos indicam que as propriedades anti-inflamatórias da fração isolada de kefir de água ocorram devido a sua interferência em vias do ácido araquidônico e do receptor de serotonina (MOREIRA et al., 2008).

Quanto à kefirana, sua atividade anti-inflamatória foi reportada por Elsayed e colaboradores (2016). Extratos do exopolissacarídeo liofilizado obtido da fermentação de grãos de kefir tibetano apresentaram função anti-angiogênica, comportando-se de forma semelhante ao VEGF. Com ação inibitória da hialuronidase, o polissacarídeo liofilizado foi comprovadamente seguro no que diz respeito à atividade citotóxica, mostrando-se um composto promissor para a utilização em diferentes formulações e produtos (PRADO et al., 2016).

- *Ação na redução do colesterol*

Após administração de uma dieta à base de leite de soja, kefir de leite ou kefir de soja em hamsters por um período de 8 semanas, pesquisadores observaram uma drástica redução dos níveis séricos de triacilgliceróis, das concentrações de colesterol no fígado e, principalmente, da fração não HDL nos animais que receberam kefir (RAIMUNDO, 2013; BASCHALI et al., 2017). Em ensaio realizado com ratos hipercolesterolêmicos, a administração deste probiótico também causou a redução dos níveis de triacilgliceróis, VLDL e LDL e o aumento dos níveis de HDL (BASCHALI et al., 2017) Resultados similares foram obtidos com leite fermentado de grãos de kefir modificados, os quais foram descritos anteriormente (SCHENEEDORF, 2012).

Coelhos que receberam grãos de kefir in natura apresentaram significativa diminuição do crescimento quando comparados ao grupo controle. Houve um considerável aumento na fração total de colesterol devido ao aumento de HDL no soro, com significativa redução do índice de Castelli (razão LDL/HDL) no grupo que recebeu kefir. O efeito hipocolesterolêmico do kefir também foi observado em ensaios realizados com frangos (SCHENEEDORF, 2012),

bem como seu efeito estabilizador da hipertensão (ELSAYED et al., 2016).

A kefirana também foi associado à prevenção de aterosclerose em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol e tem comprovada ação na diminuição dos níveis de triacilgliceróis e colesterol (ELSAYED et al., 2016; PAIVA, I. M., 2013). No entanto, um ensaio clínico realizado com homens levemente hipercolesterolêmicos que receberam kefir não apresentou resultados na redução das concentrações de lipídeos no plasma (BASCHALI et al., 2017).

- *Ação na obesidade e diabetes*

Estudos *in vitro* têm mostrado que o kefir pode agir como regulador da obesidade, inibindo a diferenciação de adipócitos e estimulando o aumento da proteólise intra-gástrica (SINTSOVA, 1991). Em estudo usando camundongos obesos geneticamente modificados, os resultados sugerem que a administração oral do kefir pode estar associada à suspensão da lipogênese, e dessa forma exercer efeito protetor contra patologias relacionadas ao aumento de gordura no fígado pelo consumo excessivo de álcool (CHEN et al., 2014).

Além disso, quando administrado em ratos diabéticos, o kefir causa a diminuição do estresse oxidativo e aumenta a função renal, uma das principais complicações associadas a esta doença (PUNARO et al., 2014). Também foi comprovado que a introdução do kefir na dieta apresenta relação direta com a redução do índice glicêmico (URDANETA et al., 2007; PRADO et al., 2016).

Frações de kefir solúveis em água e em clorofórmio/metanol foram usadas para avaliar seu efeito na captação de glicose de células de miotubos L6. Como resultados, temos que a fração aquosa aumentou a captação de glicose na presença ou ausência de insulina, além de reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). O agente ativo presente no extrato foi resistente à autoclave e estável em valores de pH entre 4 e 10, apresentando baixo peso molecular e carga aniônica. A ação da fração aquosa do kefir foi inibida na presença de wortmanina, um inibidor de fosfatidilinositol 3-quinase (PI 3-quinase). Considerando esses resultados, é possível que a fração aquosa do kefir ative a PI 3-quinase ou outra molécula reguladora da via de sinalização da insulina, revelando assim um potencial uso terapêutico para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (TERUYA et al., 2002).

- *Ações antioxidante, radioprotetora e neuroprotetora*

A capacidade antioxidante atribuída a produtos de leites fermentados já é bastante conhecida, sendo relacionada, entre outros compostos, a isoflavonóides presentes em sua constituição (PATRICK; KALIDAS, 2005). Neste contexto, o kefir e seu principal polissacarídeo, a kefirana, tem sido estudados por suas propriedades antioxidantes (ELSAYED et al., 2016; BASCHALI et al., 2017; TERUYA et al., 2002; ZHINA *et al.*, 2015; LUANG-IN. & DEESEENTHUM 2016). Em estudos *in vitro* com células de cólon humano, Baschali et al. (2017) constataram o potencial antioxidante do kefir, sugerindo sua utilização para a prevenção de danos ao DNA.

O extrato aquoso de kefir suprimiu alterações morfológicas causadas pela radiação UV em culturas de melanoma humano (HMV-1 e SK-MEL) e de fibroblasto humano normal (TIG-1). Quando adicionado às células HMV-1 após irradiação UVC, o extrato de kefir causou significativa redução nas concentrações de ROS, induziu a síntese de DNA não programada e suprimiu o efeito apoptótico da irradiação. O extrato de kefir também exibiu forte atividade de reparo dos dímeros de timina, podendo ser comparado ao metilmetanosulfonato, conhecido por sua atividade de reparo por excisão de nucleotídeos. Os fatores presentes no extrato do kefir que lhe conferem esta capacidade mostraram-se estáveis ao calor, com moléculas de peso molecular menor do que 5000 Da. Os mesmo resultados foram obtidos com o pré-tratamento das células HMV-1 antes da exposição à irradiação UVC, sugerindo a aplicação do kefir para proteção de danos causados pela radiação UV (NAGIRA et al., 2002). Teruya et al. (2013) também demonstraram o efeito radioprotetor do kefir nas formas de suspensão e liofilizado nos órgãos reprodutores masculinos e na mucosa do intestino delgado, com significante taxa de regeneração das criptas intestinais quando administrado com bastante antecedência ao insulto.

Mustafa Guven (2015) propõe a atuação do kefir como agente neuroprotetor. Sua pesquisa sugere que a administração profilática do consórcio pode preservar ou reduzir danos na isquemia e reperfusão da medula espinhal, tendo sua ação neuroprotetora e antioxidante comprovadas por meio de parâmetros bioquímicos e histopatológicos. Em outro estudo usando modelo de isquemia/reperfusão, foi encontrado que o kefir reduz os níveis teciduais de malonaldeído (MDA), aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e os níveis de glutathione e diminui os níveis séricos de uréia, creatinina e TNF- α significativamente (YENER et al., 2015).

Alguns autores associam a função antioxidante do kefir, bem como sua função anti-hipertensiva, antitrombótica, opióide e portadora de peptídeos menores do que 14,4 kDa, encontrados em sua fração protéica e derivados de casomorfinas de alfa e beta caseína (BOSQUE, 2007; GONZÁLES-OLIVARES et al., 2011).

- *Ação cicatrizante*

O kefir também possui propriedades cicatrizantes, verificadas com o uso de uma pomada à base de kefir e kefirana em ratos albinos com ferida dorsal infectada por *Staphylococcus aureus*. Passados sete dias de tratamento, a cicatrização foi observada de maneira eficaz nos animais tratados com a formulação de kefir (70%), com rápida redução do diâmetro da ferida. Amostras de pele dos animais tratados com o gel apresentaram uma boa granulação do epitélio e áreas de neovascularização, evidenciando o processo de cura e cicatrização (PRADO et al., 2013; VIANA, 2015).

Em estudo similar, feridas inoculadas por *Proteus mirabilis* foram tratadas com creme de kefir previamente mantido a 55 °C por 18 h, apresentando uma regressão lesional semelhante ao grupo positivo (tratado com um creme de cloranfenicol associado à colagenase) e ao grupo que não recebeu tratamento. O grupo tratado com grãos de kefir autoclavados revelou uma significativa diminuição da área lesionada. (SCHNEEDORF, 2012). O efeito cicatrizante do kefir também foi relatado por Moreira et al. (2008), fazendo uso de um creme a base do carboidrato extraído do kefir de água.

- *Atividade antimicrobiana*

De modo geral, o kefir parece atuar sobre a microbiota intestinal propiciando o estabelecimento de bactérias benéficas e eliminando as patogênicas; na melhoria da digestibilidade alimentar, por meio da atividade enzimática de suas diferentes linhagens microbianas e na mediação de efeitos imunomoduladores e protetores, por intermédio da secreção de metabólitos (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004; RAIMUNDO, 2013; BASCHALI et al., 2017). Uma das principais vias antimicrobianas do sobrenadante do kefir se dá pela produção de ácidos orgânicos durante a fermentação (GARROTE et al., 2000; GAWARE et al., 2011; KIM et al., 2016).

O kefir tem ação contra uma variedade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ter efeito sobre alguns fungos (CEVIKBAS et al., 1994; THOREUX &

SCHMUCKER, 2001; PRADO et al., 2016). Há evidências de que alguns de seus compostos inibitórios, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos sejam os responsáveis pela morte dos micro-organismos patogênicos (RAIMUNDO, 2013).

Diversos estudos têm demonstrado a ação inibitória do kefir frente a patógenos bacterianos transmitidos por alimentos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (RODRIGUES et al., 2005; WESCHENFELDER et al., 2009). Ainda assim, muitos deles apresentam resultados conflitantes quanto ao espectro antimicrobiano contra vários patógenos usando kefir de diferentes origens (KIM, et al., 2016). Tanto o kefir quanto o soro de kefir apresentaram capacidade de inibição e inativação sobre o inóculo bacteriano de *Escherichia coli* O-157 enterohemorrágica, aumentando o número de bactérias ácido lácticas e bífidas, nativas do trato gastrointestinal (WESCHENFELDER et al., 2009). Não obstante, amostras de kefir filtrado estimuladas por *S. aureus* e incubadas por 20 dias suprimiram o crescimento da mesma linhagem de *S. aureus*, sugerindo um potencial epigenético ou adaptativo para secreção de bacteriocinas contra *S. aureus*. (SCHENEEDORF, 2012)

Nesse contexto, a administração do kefir em modelos animais foi associada a um significativo aumento do número de bactérias ácido lácticas e à redução do número de enterobactérias e *Clostridium* (BASCHALI et al., 2017). A ação preventiva do kefir frente à infecção por *Salmonella typhimurium* (RAIMUNDO, 2013) e à colonização por *Campylobacter jejuni* em galinhas (KIM, et al., 2016) também foram comprovadas.

O primeiro estudo *in vitro* sobre as propriedades antimicrobianas de diferentes linhagens de *Lactobacillus* spp. isoladas do kefir foi realizado em 2003. As melhores propriedades probióticas foram observadas em *Lactobacillus acidophilus* CYC 10051 e *Lactobacillus kefirifaciens* CYC 10058 (SANTOS et al., 2003). Em testes de antibiose *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir apresentaram atividade antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipos Typhimurium e Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, além daquela exercida pela redução do pH. A atividade antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* não é mantida quando se utiliza o sobrenadante da cultura (DIAS, 2011).

A kefirana também apresenta atividade antimicrobiana e antifúngica (RODRIGUES et al., 2005; ELSAYED et al., 2016; BASCHALI et al., 2017). Recentemente, seu efeito protetor foi comprovado em estudo conduzido em ratos através de irradiação para formação de úlcera gástricas (ELSAIED et al., 2016). Além disso, extratos de leveduras adicionados a culturas de *L. kefirifaciens* tem a capacidade de potencializar a produção de kefirana

(SCHENEEDORF, 2012).

Na presença de concentrações crescentes de kefirana (300 a 1000 mg/L) os efeitos nocivos do *Bacillus cereus* B10502 em cultura de enterócitos humanos foram significativamente reduzidos. Além disso, a kefirana foi relacionada a uma maior atividade desidrogenase da mitocôndria durante ensaios de citotoxicidade e parece exercer um efeito protetor em testes de hemólise, apoptose e necrose. No entanto, tais resultados parecem ser específicos para a linhagem testada. (MEDRANO et al., 2008).

A atividade antibiótica do kefir de água e de seu respectivo carboidrato isolado foi testada pelo método de difusão em disco e por ensaios contra *Staphylococcus pyogenes*, *Staphylococcus salivarius*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *C. albicans*. Decorridas 24 h, propriedades bacteriostáticas foram encontradas frente a todos os micro-organismos testados, porém não houve atividade bacteriocida para *L. monocytogenes* após 48 h, sugerindo uma proteção relativa do kefir quanto a essa bactéria (SCHENEEDORF, 2012).

Microrganismos presentes nos grãos de kefir possuem atividade β -galactosidase, tornando o kefir tão efetivo quanto o iogurte no combate à intolerância à lactose. Ele contém menos lactose do que o leite e sua ingestão melhora a digestão do carboidrato e reduz a flatulência em até 71% dos casos (LOPITZ-OTSOA et al., 2006; SARKAR, 2007). Além da melhoria no metabolismo de carboidratos, o consumo da bebida também está associado a um aumento na proteólise digestória (VASS; SZAKALY; SCHIMIDT, 1984). Sua eficácia também foi avaliada no tratamento de bronquite, tuberculose, pneumonia (ORMISSON; SOO, 1976), úlceras peptídicas e duodenais (CEVIKBAS et al., 1994) e na infecção por *Helicobacter pylori* (ZUBILLAGA et al., 2001; RAIMUNDO, 2013).

Quando associado a *Lactobacillus acidophilus*, o kefir auxilia na recuperação da microbiota intestinal de pacientes submetidos a antibioticoterapia (SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004; RAIMUNDO, 2013). O consórcio também foi testado para o tratamento de crianças com desordens do trato biliar associadas a doenças pancreáticas e infecções intestinais agudas, apresentando efeitos benéficos (CEVIKBAS et al., 1994).

Em trabalho realizado por Dias (2011), leites contaminados com *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* e *enteritidis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* foram adicionados de grãos de kefir. *Salmonella typhimurium* e *enteritidis* sobreviveram por 24 horas no kefir em fermentação, enquanto *E. coli* O157:H7, *S. aureus* e *L. monocytogenes* foram recuperados até 72 horas após o início da fermentação. As bactérias

patogênicas estudadas sobreviveram por tempo superior àquele normalmente utilizado para a fermentação do kefir preparado artesanalmente, representando perigo potencial para o consumo humano.

- *Ação imunomoduladora*

Os produtos finais da fermentação do kefir, nomeadamente os peptídeos derivados da proteólise da caseína do leite, tem sido associados à sua ação imunomoduladora no intestino e à estimulação do sistema imune em camundongos (BASCHALI et al., 2017). Tanto o kefir quanto a esfingomielina isolada de seus lipídeos são reportados como agentes imunomoduladores em estudos *in vitro* e *in vivo* (THOREUX & SCHMUCKER, 2001).

A kefirana ainda suprime a ativação de mastócitos induzidos por antígeno (FURUNO & NAKANISHI, 2012) e possui efeito na imunidade da mucosa do trato gastrointestinal (MEDRANO et al., 2011; PAIVA, 2013; ELSAYED et al., 2016; BASCHALI et al., 2017).

De acordo com Thoreux & Schmucker (2001), a administração oral de kefir melhora a resposta imune específica da mucosa intestinal contra a holotoxina do cólera em ratos jovens, mas não em ratos senescentes. O grupo de ratos jovens alimentados com kefir apresentou maiores concentrações do anticorpo anti-CT IgA em comparação ao controle de mesma idade (+86%). Resultados semelhantes foram obtidos em cultura de linfócitos isolados das placas de Peyer da lâmina própria intestinal (+180%). Em outro experimento conduzido em ratos Wistar que receberam a suspensão de kefir de água durante 7 dias, observou-se uma diminuição do recrutamento de neutrófilos (30 ± 3 %), da produção de peróxido estimulada por ésteres de forbol (32 ± 3 %) e da atividade mieloperoxidase (26 ± 1 %) nestes animais, provavelmente através de vias antioxidantes.

- *Ação antitumoral*

O kefir e sua fração livre de células são capazes de modular o sistema imune, prevenindo diversos tipos de câncer. Este consórcio foi capaz de inibir a proliferação e induzir a apoptose em culturas de linfócitos T malignos HTLV-1-negativos e de células leucêmicas, desencadeando processos de apoptose e necrose em células de leucemia mielóide aguda (linhagem KG-1) e diminuindo a proliferação de linhagens celulares de eritroleucemia, sem efeitos significantes nas células monocleares do sangue periférico (JALALI et al., 2016). Sua atividade antitumoral também foi relatada pela inibição do crescimento de ascite de Erlich

(SCHNEEDORF & ANFITEATRO, 2004).

Após seis dias de cultura, extratos de leite fermentado de kefir suprimiram o crescimento da linhagem celular MCF-7 de câncer de pulmão, de maneira dose-dependente, apresentando uma taxa de inibição de 29% da proliferação a uma concentração de até 0,63%, enquanto extratos de iogurte apresentaram seu efeito antiproliferativo apenas em doses a partir de 2,5%. Em contrapartida, em células do epitélio mamário humano não foram verificados efeitos antitumorais decorrentes do kefir, enquanto extratos de iogurte mostraram efeitos antiproliferativos em doses de 5 e 10 % (CHEN et al., 2007).

Estudos sugerem que a atividade antimutagênica do kefir de leite pode ser justificada, em parte, pela liberação de peptídeos de proteínas lácteas durante a fermentação (RAIMUNDO, 2013). Além disso, o kefir atua como regulador anti-apoptótico e pró-apoptótico. A via pró-apoptótica reduz os níveis das proteínas Bax, Bad, citocromo C e caspase-3 e diminui as concentrações da citocina pró-inflamatória TNF- α . Já seu mecanismo pró-apoptótico se dá pela ativação da Akt/proteína quinase β pelo *Lactobacillus rhamnosus* GG do kefir. A apoptose aumenta de forma proporcional à concentração do kefir, induzindo a super-expressão de Bax, reprimindo a Bcl-2 e aumentando a expressão de p53, independentemente da expressão de p21 (RASIPIN & SUHARTONO, 2016).

A kefirana também possui atividade antitumoral, visto que inibiu até 59% do crescimento de tumores de camundongos inoculados com suspensão de carcinoma de Ehrlich (ZUBILLAGA et al., 2001; RAIMUNDO, 2013; PAIVA, 2013; CEVIKBAS et al., 1994; BASCHALI et al., 2017). Além de seu efeito imunoprotetor, o exopolissacarídeo do kefir também foi capaz de inibir carcinoma pulmonar de Lewis e carcinoma de mama (ELSAYED et al., 2016).

A kefirana produzida por *Lactobacillus kefiranofaciens* mostrou uma significativa ação antiproliferativa em culturas de células de carcinoma cervical humano (HeLa) e células de hepatocarcinoma humano (HepG2), cujos resultados foram dose-dependentes e específicos para células de origem humana. Doses orais de 100 ou 500 mg/kg de kefirana administradas em camundongos transplantados com tumores sólidos de carcinoma de E-ascites causaram uma significativa redução no tamanho do tumor, além de ativar a atividade imunossupressora do baço (CHEN et al., 2007). Por fim, a kefirana não induziu efeitos tóxicos em embriões do peixe *zebrafish*, mesmo em concentrações subletais (ELSAYED et al., 2016).

- *Aplicações biotecnológicas do kefir e kefirana*

Diversos trabalhos têm mostrado que a kefirana é uma molécula com grande potencial

tecnológico e de promoção da saúde. Ela apresenta melhor capacidade de emulsificação do que a goma xantana (WANG et al., 2008), além de formar filmes com comportamento pseudoplástico de alta elasticidade e resistência à tração (PIERMARIA et al., 2009). Muitos pesquisadores procuram métodos de otimizar sua produção para uso como suporte para crescimento celular, apresentando propriedades promissoras para aplicação na regeneração de tecidos (MONTESANTO, et al., 2016).

A utilização de revestimentos feitos a partir de grãos de kefir em associação a uma temperatura de 5 °C tem sido proposta como uma eficiente alternativa para a conservação e redução do processo de deterioração de mirtilos orgânicos, sem alterar a composição química e nutricional da fruta (STÜLP et al., 2014). Também foi estudada a produção de metabólitos secundários de leveduras isoladas de kefir de *muzzarella* de búfala produzida no sul da Itália (DIMITRELLOU et al., 2007).

Viana (2015) produziu com sucesso um vinagre de maçã a base de grãos de kefir, o qual apresentou bom rendimento durante a acetificação (79%), atingindo o padrão necessário para a legislação Brasileira aceitá-lo como vinagre (4,0% de ácido acético), além de uma boa aceitação pela análise sensorial. Os grânulos do kefir também foram utilizados na produção de biomassa, para ser empregada como fermento de panificação (DIMITRELLOU et al., 2007) e para a produção de aguardente de cana através de sua fermentação alcoólica, utilizando caldo de cana como substrato (DORNELLES, 2007).

Não obstante, kefir e kefirana, principalmente derivados do leite, têm sido usados na Biotecnologia para o desenvolvimento de produtos comerciais práticos, tais como: iniciador de cultura pela imobilização da caseína na produção de queijos (DIMITRELLOU et al., 2009), aditivo de qualidade alimentar de géis de leite para a fermentação de produtos (PIERMARIA et al., 2008), fermentação alcoólica de soro em escala industrial (KOUTINAS et al., 2007), banhos de fermentação alcoólica (ZAJSEK et al., 2010), exploração de resíduos da indústria cítrica (PLESSAS et al., 2008), para o desenvolvimento de filmes comestíveis (PIERMARIA et al., 2009) e para a produção de café (RODRIGUES, et al., 2016) entre muitos outros.

9.6 APLICAÇÕES DOS PROBIÓTICOS PARA A SAÚDE DO EIXO INTESTINO-CÉREBRO-INTESTINO

A relevância de estudos com probióticos vem sendo indicada pelo papel que estes

podem exercer sobre a manutenção de uma flora intestinal saudável com repercussões sobre a homeostase de vários órgãos e sistemas. Sabe-se que a flora intestinal afeta não somente a motilidade, permeabilidade intestinal, produção e absorção de nutrientes. Tais bactérias podem afetar nosso peso e a distribuição de gordura no corpo, memória, percepção da dor, imunidade e os efeitos fisiológicos do estresse (SANZ & MOYA-PÉREZ, 2015). Os microrganismos intestinais também influenciam a produção e o metabolismo de neurotransmissores. Por exemplo, *Lactobacilli spp.* aumentam a atividade das enzimas que atuam sobre o triptofano, que é um precursor da serotonina. Em ratos nascidos com tratamentos digestivos estéreis, a norepinefrina e o precursor de serotonina 5-HT foram significativamente mais baixos do que nos animais do grupo controle (REIGSTAD, 2015). Outros exemplos são: *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* participam da síntese de GABA; *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.*, e *Saccharomyces spp.* produzem norepinefrina; *Candida spp.*, *Streptococcus spp.*, (REIGSTAD, 2015) *Escherichia spp.* e *Enterococcus spp.* produzem serotonina e *Bacillus spp.* produzem dopamina. Alguns estudos têm sugerido que os micróbios gastrointestinais podem desempenhar um papel no desenvolvimento da esclerose múltipla e autismo (CARABOTTI et al., 2015).

Algumas cepas probióticas podem modular o humor. *Bacillus longum* teve um efeito anti-ansiedade em ratos com colite leve, enquanto que *Bacillus infantis* teve efeitos anti-depressivos e normalizou os níveis de triptofano em ratos (TRISHA et al., 2016). *Lactobacillus rhamnosus* administrado a ratos saudáveis reduziu o aumento da corticosterona induzida pelo estresse e o comportamento relacionado à ansiedade e à depressão. As alterações nos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA) estão associadas à ansiedade e depressão e *L. rhamnosus* mudou a expressão do receptor de GABA em certas áreas do cérebro. O comportamento motor também é influenciado pela flora intestinal. Os camundongos isentos de germes que foram colonizados com bactérias intestinais de sua própria espécie tiveram um comportamento exploratório semelhante ao dos seus congêneres. No entanto, quando colonizados com bactérias de outra espécie, seu comportamento foi semelhante ao dos doadores. A flora microbiana intestinal também pode produzir metabólitos que possuem propriedades neuroativas. Por exemplo, ao digerirem fibras, eles produzem ácidos graxos de cadeia curta, que afetam o sistema nervoso. Além disso, os probióticos podem aumentar o ácido docosahexaenóico (DHA) e as concentrações de ácido araquidônico no cérebro. Estes ácidos graxos afetam o neurodesenvolvimento e a neurogênese, e suas concentrações no cérebro influenciam a ansiedade, depressão, o aprendizado, memória dentre outras funções (CRYAN & DINAN, 2012). Evidências em humanos têm demonstrado que

probióticos podem reduzir a ansiedade, a resposta ao estresse e melhorar o humor em indivíduos com síndrome da fadiga crônica Graham et al. (2015).

Assim, a busca por probióticos que se adequem a diferentes fins terapêuticos é um desafio para o futuro (EAMONN et al., 2015). Há perspectiva de que os mesmos possam ser usados como veículos para liberação de moléculas terapêuticas para o intestino. Neste sentido já foi demonstrado que probióticos podem ser geneticamente modificados para liberar interleucina-10, uma molécula protetora da mucosa intestinal (BRAAT et al., 2006).

REFERÊNCIAS

- ALSAYADI, M. M. S.; AL, J. Y.; BELARBI, M.; SABRI, F. Z. Antioxidant potency of water kefir. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, v. 2, n. 6, p. 2444-2447, 2013.
- AMARANTE, D. O. Viabilidade de agentes bacterianos como probiótico no cultivo do camarão marinho *Litopenaeus vannamei*. 54 f. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Engenharia de Pesca e Recursos Pesqueiros. Ceará, 2016.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vasculare Brasileiro*, v. 3, n 2, p. 145-154, 2004.
- ARAYA, H.; LUTZ, M. R. Alimentos funcionales y saludables. *Revista chilena de nutrición*, v. 30, n. 1, p. 8-14, 2003.
- BARAN, Z. The Caucasus: Ten years after independence. *The Washington Quarterly*, v. 25, n. 1, p. 221-234, 2002.
- BASCHALI, A.; TSAKALIDOU, E.; KYRIACOU, A.; KARAVASILOGLOU, N.; MATALAS1, A. L. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutrition Research Reviews*, p. 1-24, 2017.
- BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismo de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 53, n. 5, p. 646-656, 2009.
- BERCIK, P.; COLLINS, S. M.; VERDU, E. F. Microbes and gut-brain axis. *Neurogastroenterol Motility*, v. 24, n. 5, p. 405-13, 2012.
- BIENENSTOCK, J. COLLINS, S. 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: psycho-neuroimmunology and the intestinal microbiota: clinical observations and basic mechanisms. *Clinical & Experimental Immunology*, v. 160, n.1, p. 85-91, 2010.
- BOSCH, A.; GOLOWCZYC, M. A.; ABRAHAM, A. G.; GARROTE, G. L.; DE ANTONI, G. L.; YANTORNO, O. Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy. *International Journal of Food Microbiology*, v.111, n.3, p.280-287, 2006.
- BRAAT, H.; ROTTIERS, P.; HOMMES, D. W.; HUYGHEBAERT, N.; REMAUT, E.; REMON, J. P.; VAN DEVENTER, S. J; NEIRYNCK, S; PEPPELENBOSCH, M. P.; STEIDLER, L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, v. 4, p. 754-759, 2006.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Probióticos, 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoestecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU&p_p_col_id=column2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_FXrpx9q7FbU_groupId=219201&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_urlTitle=probioticos&_101_INS>

TANCE_FXrpx9qY7FbU_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_assetEntryId=2864062&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_type=content>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2017.

BRASIL, Biblioteca Virtual em Saúde do Ministério da Saúde. Alimentos funcionais, 2009. Disponível em: <http://bvsm.sau.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html>. Acesso em: 16 de fevereiro de 2017.

BORRE, Y. E.; MOLONEY, R. D.; CLARKE, G.; DINAN, T. G.; CRYAN, J. F. The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 817, p. 373-403, 2014.

CARBALLO, J.; FONTÁN, M. C. G.; MARTÍNEZ, S.; FRANCO, I. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial -starter culture. *International Dairy Journal*, v. 16, n. 7, p. 762-767, 2006.

CENCIC, A. & CHINGWARU, W. The Role of Functional Foods, Nutraceuticals, and Food Supplements in Intestinal Health. *Nutrients*, v. 2, n. 6, p. 611-625, 2010.

CERFF, J. Optimisation of kefir biomass and metabolite production in conjunction with sensory evaluation. 2002. 136 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Ciência dos Alimentos da Faculdade de Agricultura e Ciências Florestais, Universidade de Stellenbosch. África do Sul, 2002.

CEVIKBAS, A.; YEMNI, E.; EZZEDENN, F. W.; YARDIMICI, T. Antitumoural, Antibacterial and Antifungal Activities of Kefir and Kefir Grain. *Phytotherapy research*, v. 8, p. 78-82, 1994.

CHEN, C.; CHAN, H. M; KUBOW, S. Kefir extracts suppress *in vitro* proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells but not normal mammary epithelial cells. *Journal of Medicinal Food*, v. 10, n. 3, p. 416-422, 2007.

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

CHEN, H. L; TUNG, Y. T.; TSAI, C. L.; LAI, C. W.; LAI, Z. L.; TSAI, H. C.; LIN, Y. L.; WANG, C. H.; CHEN, C. M. Kefir improves fatty liver syndrome by inhibiting the lipogenesis pathway in leptin-deficient ob/ob knockout mice. *J Obes*, v. 38, n. 9, p. 1172-1179, 2014.

CHEN, Z.; SHI, J.; YANG, X.; NAN, B.; LIU, Y.; WANG, Z. Chemical and physical characteristics and antioxidant activities of the exopolysaccharide produce by tibetan kefir grains during milk fermentation. *International Dairy Journal*, n. 43, p. 15-21, 2015.

COPPOLA, M. M & TURNES, C. G. Probióticos e resposta imune. *Ciência Rural*, v. 34, n. 4, p. 1297-1303, 2004.

CRYAN, J. F. & O'MAHONY, S. M. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motility*, v. 23, n. 3, p. 187-92, 2011.

CRYAN, J. F. & DINAN, T. G. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut

microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 13, n. 10, p.701-712, 2012.

CROSS, M. L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *Federation of European Microbiological, Society Immunology and Medical Microbiology*, v. 34, n. 4, p. 245-253, 2002.

DIAS, P. A. Atividade Antimicrobiana de Microrganismos Presentes em Grãos de Kefir. 44 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

DIMITRELLOU, D.; KOURKOUTAS, Y.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Whey-cheese production using freeze-dried kefir culture as a starter. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 4, p. 1170-1183, 2007.

DIMITRELLOU, D.; KOURKOUTAS, Y.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M. Thermally-dried immobilized kefir on casein as starter culture in dried whey cheese production. *Food Microbiology*, v. 26, n. 8, p. 809-820, 2009.

DORNELLES, A. S. Produção de cachaça com grânulos de kefir. 72 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2007.

ELSAYED, E. A.; FAROOQ, M.; DAILIN, D.; EL-ENSHASY, H. A.; OTHMAN, N. Z.; MALEK, R.; DANIAL, E.; WADAAN, M. In vitro and in vivo biological screening of kefir polysaccharide produced by *Lactobacillus kefirianofaciens*. *Biomedical Research*, v. 28, n. 2, 2017.

ENIKEEV, R. Development of a new method for determination of exopolysaccharide quantity in fermented milk products and its application in technology of Kefir production. *Food Chemistry*, v. 134, n. 4, p. 2437-2441, 2012.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Consulta de Expertos FAO/OMS sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, incluida la Leche en Polvo con Bacterias Vivas del Ácido Láctico, 1-4 de octubre de 2001.

FONDÉN, R.; LEPORANTA, K. & SVENSSON, U. Nordic/Scandinavian fermented milk products. In: *Fermented Milks*, 1 ed., p. 156-173, Oxford: Blackwell Science Ltd, 2006.

FORSYTHE, P.; SUDO, N.; DINAN, T.; TAYLOR, V. H.; BIENENSTOCK, J. Mood and gut feelings. *Brain, Behavior, and Immunity*, v. 24, n. 1, p. 9-16, 2010.

FURUNO, T. & NAKANISHI, M. Kefiran Suppresses Antigen-Induced Mast Cell Activation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 35, n. 2, p. 178-183, 2012.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; ANTONI, G. L. Inhibitory Power of Kefir: The Role of Organic Acids. *Journal of Food Protection*, v. 63, p. 364-369, 2000.

GOMES, G. B. Alimentos funcionais e doença aterosclerótica: qualidade em alimentação. *Revista de Nutrição*, v. 4, n. 13, p. 16-17, 2002.

GRAHAM, A. W. R.; CHARLES, L. R.; CHRISTOPHER, A. L. Microbiota, Immunoregulatory Old Friends and Psychiatric Disorders. In: *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease*. Springer: New York, v. 817, p 319-356, 2014.

GROSS, D. C. & VIDAVER, A. K. Bacteriocins. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K.; SANDS, D. C. (Ed.), *Methods in Phytobacteriology*, Budapeste: Akademiai Kiado, p. 245-249, 1990.

HERTZLER, R. S. & CLANCY, S. M. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic Association*, v 103, n 5, p. 582-587, 2003.

HORISBERGER, M. Structure of the dextran of the Tibi Grain. *Carbohydrate Research*, v. 10, p. 379-385, 1969.

JALALI, F.; SHARIFI1, M.; SALEHI, R. Kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia. *Medical Oncology*, v. 33, n. 7, p. 2-9, 2016.

JENKINS, T. A.; NGUYEN, J. C. D.; POLGLAZE, K. E.; BERTRAND, P. P. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients*, v. 8, n. 1, p. 56, 2016.

LUANG-IN, V. & DEESEENTHUM, S. Exopolysaccharide-producing isolates from thai milk kefir and their antioxidante activities. *LWT - Food Science and Technology*, 2016.

KALLIOMAKI, M.; ANTOINE, J. M.; HERZ, U.; RIJKERS, G. T.; WELLS, J. M.; ERCENIER, A. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of allergic diseases by probiotics. *Journal of Nutrition*, v. 140, n. 2, p. 7135-7215, 2010.

KATO, I.; YOKOKURA, T.; MUTAI, M. Correlation between increase in Ia-bearing macrophages and induction of T cell dependent antitumor activity by *Lactobacillus casei* in mice. *Cancer Immunology Immunotherapy*, v. 26, n. 3, p. 215-221, 1988.

KATO, I.; ENDO, K.; YOKOKURA, T. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *International Journal of Immunopharmacology*, v.16, n.1, p.29-36, 1994.

KAUR, I. P.; KUHAD, A.; GARG, A.; CHOPRA, K. Probiotics: delineation of prophylactic and therapeutic benefits. *Journal of Medicinal Food*, v. 12, n. 2, p. 219-235, 2009.

KIM, D. H.; JEONG, D.; KIM, H.; KANG, I. B.; CHON, J. W.; SONG, K. Y.; SEO, K. H. Antimicrobial Activity of Kefir against Various Food Pathogens and Spoilage Bacteria. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, v. 36, n. 6, p. 787-790, 2016.

KOOIMAN, P. The chemical structure of kefirán, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *Carbohydrate Research*, v. 7, n. 2, p. 200-211, 1968.

- KOUTINAS, A. A.; ATHANASIADIS, I.; BEKATOROU, A.; PSARIANOS, A.; KANELLAKI, M.; AGOURIDIS, N.; BLEKAS, G. Kefir-yeast technology: Industrial scale-up of alcoholic fermentation of whey, promoted by raisin extracts, using kefir-yeast granular biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 5, p. 576-582, 2007.
- KUMAR, M.; KUMAR, A.; NAGPAL, R.; MOHANIA, D.; BEHARE, P.; VERMA, V.; KUMAR, P.; PODDAR, D.; AGGARWAL, P. K.; HENRY, C. J.; JAIN, S.; YADAV, H. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 61, n. 5, p. 473-496, 2010.
- KUO, C. Y. & LIN, C. W. Taiwanese kefir grains: their growth, microbial and chemical composition of fermented milk. *Australian Journal of Dairy Technology*, v. 54, p. 19-23, 1999.
- KWAK, N. & JUKES, D. J. Functional foods Part 2: the impact on current regulatory terminology. *Food Control*, v. 12, p. 109-117, 2001.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: a symbiotic easts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 23, p. 67-74, 2006.
- MAALOUF, K.; BAYDOUN, E.; RIZK, S. Kefir induces cell-cycle arrest and apoptosis in HTLV-1-negative malignant T-lymphocytes. *Cancer Management and Research*, v. 3, p. 39-47, 2011.
- MACHADO, B. A. S.; REIS, J. H. O; PIRES, E. A.; SANTOS, F. L. Mapeamento tecnológico de patentes de Kefir. *Cadernos de Prospecção*, v. 5, n. 2, p. 86-97, 2012.
- MAEDA, H.; ZHU, X.; SUZUKI, S.; SUZUKI, K.; KITAMURA, S. Structural characterization and biological activities of an exopolysaccharide Kefiran produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* WT-2B(T). *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 52, n. 17, p. 5533-5538, 2004.
- MAGALHÃES, K. T.; PEREIRA, G. V. M.; CAMPOS, C. R.; DRAGONE, G.; SCHWAN, R. F. Brazilian Kefir: structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 42, p. 693-702, 2011.
- MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends Food Sci Technol*, v. 38, n. 2, p. 113-124, 2014.
- MEDRANO, M.; PÉREZ, P. F.; ABRAHAM, A. G. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *International Journal of Food Microbiology*, v. 122, p. 1-7, 2008.
- MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide Kefiran. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 53, n. 1, p. 69-74, dez 1999.
- MONTESANTO, S.; CALÒB, G.; CRUCIATAC, M.; SETTANNIC, L.; BRUCATOA, V. B.; CARRUBBAA, V. L. Optimization of environmental conditions for kefirana production by Kefir grain as scaffold for tissue engineering. *Chemical engineering transactions*, v. 49,

2016.

MORAES F. P. & COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MOREIRA, M. E. C.; DOS SANTOS, M. H.; ZOLINI, G. P. P.; WOUTERS, A. T. B.; CARVALHO, J. C. T.; SCHNEEDORF, J. M. Anti-Inflammatory and Cicatrizing Activities of a Carbohydrate Fraction Isolated from Sugary Kefir. *Journal of Medicinal Food*, v. 11, n. 2, p. 356-361, 2008.

GUVEN, M.; AKMAN, T.; YENER, A. U.; SEHITOGLU, M.H.; YUKSEL, Y.; COSAR, M. The Neuroprotective Effect of Kefir on Spinal Cord Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, v. 57, n. 5, p. 335-341, 2015.

NAGIRA, T.; NARISAWA, J.; TERUYA, K.; KATAKURA, Y.; SHIM, S.; KUSUMOTO, K.; TOKUMARU, S.; TOKUMARU, K.; BARNES, D. W.; SHIRAHATA, S. Suppression of UVC-induced cell damage and enhancement of DNA repair by the fermented milk, Kefir. *Cytotechnology*, v. 40, p. 125–137, 2002.

ONOFRE, N. A. Desenvolvimento e caracterização de filmes poliméricos a partir de ágar, agarose e kefirana com incorporação de nanopartículas de prata. 2014. 112 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

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.

PATRICK, M. C. & KALIDAS, S. Phenolic antioxidant mobilization during yogurt production from soymilk using Kefir cultures. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 5, p. 1791-1797, 2005.

PAIVA, I. M. Caracterização estrutural e avaliação da capacidade imunomodulatória de exopolissacarídeos produzidos por lactobacilos isolados de kefir. 2013. 99 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.

PIERMARIA, J.; DELACANAL, M.; ABRAHAM, A. Gelling properties of kefirana, a food-grade polysaccharide obtained from kefir grain. *Food Hydrocolloids*, v. 22, n.8, p.1520-1527, 2008.

PIERMARIA, J. A.; PINOTTI, A.; GARCIA, M. A.; ABRAHAM, A. G. Films based on kefirana, an exopolysaccharide obtained from kefir grain: Development and characterization. *Food Hydrocolloids*, v. 23, n. 3, p. 684-690, 2009.

PLAZAS, D. C. S. Efeito dos extratos de *Spirulina maxima* e kefir no cultivo de folículos pré-antrais de suíno. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

PLESSAS, S.; KOLLOPOULOS, D.; KOURKOUTAS, Y.; PSARIANOS, C.; ALEXOPOULOS, A.; MARCHANT, R.; BANAT, I. M.; KOUTINAS, A. A. Upgrading of discarded oranges through fermentation using kefir in food industry. *Food Chemistry*, v. 106, n. 1, p. 40-49, 2008.

PRADO, M. R. M. Produção de composto bioativo a base de polissacarídeo e proteína com atividades angiogênica e anti-inflamatória utilizando cultura mista de bactérias e leveduras do kefir tibetano em soro de leite. 123 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocesso e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná. Paraná, 2014.

PRADO, M. R. M.; BOLLER, C.; ZIBETTI, R. G. M.; SOUZA, D.; PEDROSO, L. L.; SOCCOL, C. R. Anti-inflammatory and angiogenic activity of polysaccharide extract obtained from Tibetan kefir. *Microvascular Research*, v. 108, p. 29-33, 2016.

PUERARI, C.; MAGALHÃES, K. T.; SCHWAN, R. F. New cocoa pulp-based Kefir beverages: Microbiological, chemical composition and sensory analysis. *Food Research International*, v. 48, n. 2, p. 634-640, 2012.

PUNARO, G. R.; MACIEL, F. R.; RODRIGUES, A. M.; ROGERO, M. M.; BOGSAN, C.S.; OLIVEIRA, M. N.; IHARA, S. S.; ARAUJO, S. R.; SANCHES, T. R.; ANDRADE, L. C.; HIGA, E. M. Kefir administration reduced progression of renal injury in STZ-diabetic rats by lowering oxidative stress. *Nitric Oxide*, v. 37, p. 53-60, 2014.

RAIMUNDO, I. C. Caracterização microbiológica e avaliação de propriedades imunomodulatória e inibitória do kefir sobre *Salmonella tiphimurium*. 95 f. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos alimentos da Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2013.

RASIPIN, R.; DHARMANA, E.; HADISAPUTRO, S.; SUHARTONO, S. The effects of kefir on the inflammatory status and thyroid function (experimental study on wistar rats after exposed to chlorpyrifos). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, v. 9, n. 5, p. 165-171, 2016.

REIGSTAD, C. S.; SALMONSON, C. E.; RAINEY, J. F.; SZURSZEWski, J. H.; LINDEN, D. R.; SONNENBURG, J. L.; FARRUGIA, G.; KASHYAP, P. C. Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells. *The FASEB Journal*, v. 29, n. 4, p. 1395-1403, 2015.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 25, p. 404-408, 2005.

RODRIGUES, F. C.; SOUZA, M. H.; SILVA, I. S.; BARBOSA, M. C.; BELIZÁRIO, R. M.; CABRAL, R. M. S.; RIBEIRO, D. F. Desenvolvimento e avaliação sensorial de kefir de café. In: II Seminário Científico da FACIG - Jornada de Iniciação Científica da FACIG, Munhaçu-Minas Gerais, 2016.

SANDERS, M. E. Probiotics. *Food technology*, v. 53, n.11, 1999.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M; MARQUINA, D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 26, p. 434-437, 2003.

SANTOS, L. C. Produção de bacteriocinas por endófitos de citros e caracterização da endoficina L de *Curtobacterium flaccumfaciens* endofítico. 137 f. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

Piracicaba, 2005.

SANTOS, J. P. V. Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas. 88 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2008.

SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Food Journal*, v. 109, n. 4, p. 280-290, 2007.

SCHNEEDORF, J. M. Kefir d'Aqua and Its Probiotic Properties. In.: Probiotic in Animals. Ed. online InTech., p. 53-76, 2002.

SCHNEEDORF, J. M.; ANFITEATRO, D. O Kefir e inflamação. In: CARVALHO, J. C. T. (Org.). *Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo: Tecmedd, v. 1, p. 459-486, 2004.

SERAFINI, F.; TURRONI, F.; RUAS-MADIEDO, P.; LUGLI, G. A.; MILANI, C.; DURANTI, S.; ZAMBONI, N.; BOTTACINI, F.; VAN SINDEREN, D.; MARGOLLES, A.; VENTURA, M. Kefir fermented milk and kefiran promote growth of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 and modulate its gene expression. *International Journal of Food Microbiology*, v. 178, p. 50-59, 2014.

SETYOWATI, H. & SETYANI, W. Kefir: a new role as nutraceuticals. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, v. 7, n. 5, p. 200-209, 2016.

SINTSOVA, N. V. Changes in intragastric proteolytic activity in patients with obesity and possibilities of its dietetic correction. *Ter Arkh Journal*, v. 63, n. 2, p. 47-51, 1991.

SOUTO, J. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos e frações de espécies de *Piper* (Piperaceae) por bioautografia. Trabalho apresentado ao curso de Farmácia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba como parte dos requisitos para a obtenção do título de farmacêutico. João Pessoa, 2014.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*, v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

STERN, N. J.; SVETICH, E. A.; ERUSLANOV, B. V.; PERELYGIN, V. V.; MITSEVICH, D. V.; MITSEVICH, I. P. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and Purification of its Bacteriocin, Which is Inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the Chicken Gastrointestinal System. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 9, p. 3111-3116, 2006.

STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, T. T.; GOMES, R. C.; AMARA, M. P. H.; CARVALHO, A. F.; VILELA, M. A. P. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmêuticas*, São Paulo, v. 43, n. 2, p. 181-194, 2007.

TADA, S.; KATAKURA, Y.; NINOMIYA, K.; SHIOYA, S. Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefirianofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, n. 6, p. 557-562, 2007.

TERUYA, K.; MYOJIN-MAEKAWA, Y.; SHIMAMOTO, F.; WATANABE, H.;

NAKAMICHI, N.; TOKUMARU, K.; TOKUMARU, S.; SHIRAHATA, S. Protective Effects of the Fermented Milk Kefir on X-Ray Irradiation-Induced Intestinal Damage in B6C3F1 Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 36, n. 3, p. 352–359, 2013.

TERUYA, K.; YAMASHITA, M.; TOMINAGA, R.; NAGIRA, T.; SHIM, S.; KATAKURA, Y.; TOKUMARU, S.; TOKUMARU, K.; BARNES, D.; SHIRAHATA, S. Fermented milk, Kefram-Kefir enhances glucose uptake into insulin-responsive muscle cells. *Cytotechnology*, v. 40, p. 107-116, 2002.

THOREUX, K. & SCHMUCKER, D. L. Kefir Milk Enhances Intestinal Immunity in Young but Not Old Rats. *The journal of nutrition*, v. 131, p. 807–812, 2001.

TROIS, L.; CARDOSO, E. M.; MIURA, E. Use of probiotics in HIV-infected children: a randomized double-blind controlled study. *Journal of Tropical Pediatrics*, v. 54, n.1, p. 19-24, 2008.

URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal beneficial effects of kefir-supplemented diet in rats. *Nutrition Research*, v. 27, p. 653-658, 2007.

VASS, A.; SZAKALY, S.; SCHIMIDT, P. Experimental study of the nutritional biological characters of fermented milks. *Acta Medical*, v. 41, n. 2/3, p. 157-161, 1984.

VIANA, R. O. Elaboração de vinagre de maçã (*Malus spp.*) empregando os grãos de kefir como inóculo. 106 f. Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. Lavras, 2015.

VINDEROLA, C. G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; PERDIGÓN, G.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. *Journal of Dairy Research*, v. 72, n. 2, p. 195-202, 2005.

VUYST, L. D. & DEGEEST, B. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, v. 23, n. 2, p. 153-177, 1999.

WANG, Y.; AHMED, Z.; FENG, W.; LI, C.; SONG, S. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus Kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet Kefir. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, n. 3, p. 283-288, 2008.

WANG, S. Y.; CHEN, K. N.; LO, Y. M.; CHIANG, M. L.; CHEN, H. C.; LIUA, J. R.; CHEN, M. J. Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 274-285, 2012.

WALDHERR, F. W.; DOLL, V. M.; MEISSNER, D.; VOGEL, R. F. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved in granule formation of water Kefir. *Food microbiology*, v. 27, n. 5, p. 672-678, 2010.

WEI-SHENG, H.; YEN-PO, C.; MING-JU, C. The Antiallergic Effect of Kefir *Lactobacilli*. *Journal of Food Science*, v. 75, n. 8, p. H244–H253, 2010.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Atividade anti-*Escherichia coli* em kefir e soro de kefir tradicionais. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*,

v. 64, n. 367/368, p. 48-55, 2009.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 3, p. 609–614, 2003.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION (WGO), Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia - Probióticos e prebióticos, 2011.

YAO, T. C.; CHANG, C. J.; HSU, Y. H.; HUANG, J. L. Probiotics for allergic diseases: Realities and myths. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 21, n. 6, p. 900-919, 2009.

YENER, A. U.; SEHITOGLU, M. H.; OZKAN, M. T. A.; BEKLER, A.; EKIN, A.; COKKALENDER, O.; DENIZ, M.; SACAR, M.; KARACA, T.; OZCAN, S.; KURT, T. Effects of kefir on ischemia-reperfusion injury. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 19, p. 887-896, 2015.

ZAJSEK, K. & GORSEK, A. Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. *Food and Bioprocess Processing*, v. 88, n.1, p. 55-60, 2010.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutrition Research*, v. 21, p. 569-579, 2001.

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2124 8040 / 2124 8311
Fax: (55 81) 2124 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 16 de dezembro de 2015.

Ofício nº 134/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Belmira Lara da Silveira Andrade da Costa**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco
Processo CEUA 0002-2015

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Estudo da biocompatibilidade do polímero de kefirana como substrato para células neurais e do kefir em modelos de neuroinflamação *in vitro***".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB/UFPE; Animais: ratos Wistar; Sexo: machos e fêmeas; Idade: neonatos (entre 0 e 3 dias de nascidos) e progenitores (90-100 dias); Peso: 7-9g (neonatos), ~250g (fêmeas progenitoras) e ~320g (machos progenitores); Número total de animais previsto no protocolo: 10 machos progenitores, 20 fêmeas progenitoras e 100 neonatos, totalizando 130 ratos.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584