

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS À DIGESTÃO EM PRODUTO DESIDRATADO A BASE DE KEFIR

Gabrielle Maria Oliveira Tunes (IT) e Isabela Rosier Olimpio Pereira (Orientador)

Apoio: CNPq

RESUMO

Kefir é um alimento probiótico de baixo custo. Os probióticos promovem o equilíbrio da microbiota intestinal e contribuem para a saúde geral, no entanto, ao serem consumidos, devem se apresentar viáveis e resistirem à passagem no trato gastrointestinal para promoverem seus benefícios no intestino. Este projeto avaliou a viabilidade de microrganismos probióticos em produto derivado do kefir desidratado puro ou com uso de microencapsulantes (goma acácia e pectina - GA+PEC), sob condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Resultados: A sobrevivência de bactérias lácticas foi satisfatória para as amostras em pó (com o uso de cápsula gastro-resistente) e para o leite fermentado proveniente da reinoculação da amostra GA+Pec (sem uso de cápsula gastro-resistente); Leveduras foram viáveis na simulação da digestão gastro-intestinal completa (sem cápsula gastro-resistente) apenas para a amostra pó puro. Os resultados das análises de Metagenômica de bactérias mostraram que a espécie mais abundante encontrada no kefir líquido, nos pós puro e GA+Pec foi *Lactobacillus Kefiranofaciens*; as espécies predominantes no reinoculado refletem às sobreviventes ao processo de secagem e que foram resistentes à simulação da digestão. Os resultados da Metagenômica de Fungos mostraram que a espécie mais abundante encontrada no kefir líquido, nos pós puro e GA+Pec e seus respectivos reinoculados foi *Kazachstania Kazachstania_unispora*, indicando provável sobrevivência dessa espécie ao processo de secagem. As espécies predominantes identificadas nos reinoculados e que foram resistentes à simulação da digestão foram *Kazachstania Kazachstania_unispora*, *Saccharomyces Saccharomyces_cerevisiae*, *Microidium Microidium_phyllanthi*, *Malassezia Malassezia_restricta*, *Saccharomyces Saccharomyces_cariocanus*. De modo geral, não foi encontrado benefício do uso de microencapsulantes (GA+Pec).

Palavras-chave: Kefir, probiótico, microrganismo, digestão.

ABSTRACT

Kefir is a low cost probiotic food. Probiotics promote the balance of the intestinal microbiota and contribute to general health, however, when consumed, they must be viable and resist passage in the gastrointestinal tract to promote their benefits in the intestine. This project evaluated the viability of probiotic microorganisms in a product derived from pure dehydrated kefir or with the use of microencapsulants (acacia gum and pectin - GA+PEC), under simulated gastrointestinal conditions *in vitro*. Results: The survival of lactic acid bacteria was satisfactory for powder samples (using a gastro-resistant capsule) and for fermented milk from the reinoculation of the GA+Pec sample (without using a gastro-resistant capsule); Yeasts were viable in the simulation of complete gastro-intestinal digestion (without gastro-resistant capsule) only for the pure powder sample. The results of the Metagenomics analysis of bacteria showed that the most abundant species found in liquid kefir, in pure powders and GA+Pec was *Lactobacillus Kefiranofaciens*; the predominant species in the reinoculate reflect those surviving the drying process and that were resistant to the simulation of digestion. The results of Fungi Metagenomics showed that the most abundant species found in liquid kefir, in pure powders and GA+Pec and their respective reinoculated was *Kazachstania Kazachstania_unispora*, indicating probable survival of this species to the drying process. The predominant species identified in the reinoculated and which were resistant to simulation of digestion were *Kazachstania Kazachstania_unispora*, *Saccharomyces Saccharomyces_cerevisiae*, *Microidium Microidium_phyllanthi*, *Malassezia Malassezia_restricta*, *Saccharomyces Saccharomyces_cariocanus*. In general, no benefit was found from the use of microencapsulants (GA+Pec).

Keywords: Kefir, probiotic, microorganism, digestion.

A qualidade dos produtos alimentícios e a sua influência sobre a nutrição e a saúde humana vêm conquistando lugar de destaque nos meios científicos. Isto se deve ao grande número de produtos existentes e a uma tendência atual quanto ao consumo de produtos naturais. Dentre esses produtos destacam-se os leites fermentados, que são resultantes da fermentação microbiológica do leite (WESCHENFELDER, 2009).

O kefir é um alimento fermentado, originado das montanhas do Cáucaso, resultante da dupla fermentação do leite pelos grãos de kefir, sendo estes grãos uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas (WESCHENFELDER, 2009). O termo deriva do turco *keif* que significa “bem-estar” ou “bem viver” (KEMP, 1984).

A composição microbiológica e química indica que o kefir é um produto com características probióticas, ou seja, possui em sua composição microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo que o consome (FARNWORTH, 2005; VINDEROLA et al., 2005).

Diversos benefícios são atribuídos ao consumo de kefir, tais como melhora da digestão e tolerância à lactose, inibição do crescimento de tumores e de microrganismos patogênicos, regularização do trânsito intestinal, redução de colesterol, inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e modulação do sistema imune, incluindo alívio de alergia e asma (GOLOWCZYC et al., 2011; ROSA et al., 2017; BOURRIE; WILLING; COTTER, 2016).

A conservação dos microrganismos em estado seco é uma maneira atraente de preservar sua viabilidade para inclusão em um produto probiótico. Os pós secos de kefir podem ser transportados a um baixo custo e podem ser armazenados de forma estável por períodos prolongados (GOLOWCZYC et al., 2010). Os microrganismos devem permanecer viáveis e em número elevado (acima de 10^6 UFC/g) durante o processamento e armazenamento do alimento para que os efeitos benéficos sejam obtidos (ANAL; SINGH, 2007).

A encapsulação de microrganismos probióticos vem sendo utilizada para aumentar a sobrevivência das bactérias no alimento e durante a passagem pelo trato digestivo. Contudo, é importante que as características sensoriais do produto não sejam prejudicadas (MORENO; KUNIGK, 2011).

Bactérias *Bifidumbacterium longum* existentes em probióticos encapsuladas por goma arábica demonstraram uma maior sobrevivência ao suco gástrico pH 2,0 e à bile. A pectina, no entanto, pode ser usada como agente microencapsulante por possuir propriedade gelificante. O conjugado pectina/caseína na produção de microcápsulas é eficiente na proteção de algumas espécies do pH gástrico (PAULO; ASSIS; SANTOS, 2009).

Partindo destas informações científicas, o produto a ser caracterizado neste projeto (kefir desidratado) foi seco em spray dryer e os microrganismos microencapsulados na própria matriz caseína/proteínas do soro de leite/kefiran (fibra produzida pelos microrganismos do kefir) do leite fermentado (processo sigiloso a ser patenteado e ainda não publicado), obtendo microcápsulas já analisadas por microscopia eletrônica de varredura, contendo bactérias probióticas de diferentes espécies.

1.1 Objetivos Geral e Específicos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo deste projeto é avaliar a viabilidade de microrganismos probióticos em produto desidratado derivado do kefir, sob condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, avaliando sua sobrevivência após contato com suco gástrico e bile, garantindo assim, sua eficácia no intestino.

1.1.2 Objetivos específicos

Tendo como amostra um produto derivado de kefir desidratado por spray dryer, pretendeu-se:

- a) Avaliar por meio de análises microbiológicas e de metagenômica, as espécies de microrganismos sobreviventes ao processo de secagem;
- b) Avaliar a sobrevivência de microrganismos probióticos à simulação da digestão gástrica e intestinal.

2 Problema

A preservação de microrganismos por diferentes métodos de secagem tem sido utilizada há décadas (MORGAN et al., 2006). A desidratação de kefir reduz os custos de armazenamento, aumenta o prazo de validade e facilita a comercialização e utilização do produto. A liofilização, em particular, é o método preferido para conservação de microrganismos, mas é um processo muito caro, o que eleva o custo ao consumidor (ORDÓÑEZ et al., 2005). Entretanto, na indústria de laticínios é muito utilizado o uso de spray dryer para a produção de ingredientes lácteos com custos de processamento comercialmente viáveis, apresentando custo de evaporação dez vezes menor ao processo de liofilização (SCHUCK, 2013).

Alternativamente, a secagem por spray dryer pode ser utilizada para esta finalidade, porém possui um alto índice de perda de viabilidade dos microrganismos devido às condições de temperatura e pressão osmótica durante o processo (MENEZES et al., 2013).

3 Proposta de Solução

A demanda por alimentos que promovam saúde e bem-estar vem aumentando. Os alimentos com propriedades funcionais têm atraído atenção dos consumidores e da indústria alimentícia Cabral (2014), dentre esses alimentos, ressaltam-se os probióticos, que possuem efeitos positivos sobre a composição da microbiota intestinal e saúde geral (MARTINS et al., 2013).

O kefir, produzido por alguns *Lactobacillus* isolados de grãos de kefir, possui diversos efeitos benéficos como a modulação da resposta imune na mucosa intestinal Medrano et al. (2011) e nas vias aéreas Kwon (2008), ação anti-inflamatória Furuno; Nakanishi (2012) e antioxidante Uchida et al. (2010).

Sendo assim, pretende-se desenvolver um produto probiótico de baixo custo, com maior qualidade, por oferecer um grande número de espécies presentes em conjunto, favorecendo assim, a sobrevivência gastro-intestinal, mantendo dessa forma, os microrganismos viáveis quando consumido, permanecendo vivo após contato com suco gástrico e bile, a fim de exercer seus benefícios no intestino.

4 Referencial Teórico

O kefir tornou-se popular em vários países, como, Rússia, Canadá, Alemanha, Suécia e Romênia, sendo produzido para fins comerciais e consumido em quantidades apreciáveis. No entanto, a cultura da produção em larga escala ainda não é difundida em boa parte do mundo, sendo confeccionado de forma artesanal e para consumo próprio, inclusive no Brasil (PRADO et al., 2013; ROSA et al., 2017).

Os grãos de kefir são descritos como uma associação simbiótica de leveduras, bactérias ácido-láticas e bactérias ácido-acéticas envoltas por uma matriz de polissacarídeos referidos como kefiran. É um alimento rico em ácido láctico, acético e glicônico, álcool etílico, gás carbônico, vitamina B12 e polissacarídeos que conferem ao produto características sensoriais singulares. O ácido láctico formado a partir da fermentação da lactose age como conservante natural, tornando o kefir um produto biologicamente seguro (WESCHENFELDER, 2009).

O kefir possui baixo custo e grande viabilidade econômica. É bastante conhecido em grupos fechados, por famílias que mantêm a cultura de seu cultivo e por alguns profissionais da área de saúde, mas ainda assim, poucas pessoas o conhecem, não sabem de suas diversas propriedades e utilizações para a saúde, como cultivá-lo e como adquiri-lo (MAGALHÃES et al., 2010). Quando pronto para consumo é rico em vitaminas, o teor vitamínico depende da qualidade do leite utilizado, dos microrganismos presentes nos grãos e da forma de preparo. O kefir apresenta vitaminas B1, B2, B5, C, A e K e caroteno em sua composição (ROSA et al., 2017).

Os grãos de kefir multiplicam-se conforme vão sendo cultivados, resultando inicialmente no aumento de tamanho e, posteriormente em subdivisões de novos grãos que mantêm o mesmo equilíbrio microbiológico contido nos grãos de origem (FARNWORTH, 2005).

A lactose do leite é degradada a ácido durante o processo de fermentação, o que causa redução do pH e aumento da consistência. A fermentação ocorre em temperaturas que variam de 8 a 25 °C, em recipiente parcialmente fechado, em um tempo entre 10 a 40 horas. No entanto, o tempo de incubação mais comum é de 24 horas. Cerca de 30% da lactose do leite é hidrolisada pela enzima β -galactosidase, transformando a lactose em glicose e galactose. Além disso, bactérias presentes no kefir convertem glicose em ácido láctico. Sendo assim, o kefir é uma boa opção para indivíduos intolerantes à lactose (ROSA et al., 2017).

É crescente o número de consumidores que procuram uma alimentação adequada, visando uma associação de saúde e bem-estar, buscando uma maior longevidade. Com o conhecimento dos benefícios causados por microrganismos probióticos, aumentou-se o interesse dos consumidores por produtos com essas características (MORENO; KUNIGK,

2011).

O termo probiótico é reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (WHO – World Health Organization) e pela FAO (Food and Agriculture Organization) (MORAIS; JACOB, 2006). No Brasil, de acordo com a RDC nº 241 de 2018, a ANVISA define probiótico como “Microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades adequadas, confere um benefício à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2018).

Os microrganismos para serem considerados probióticos devem ser reconhecidos internacionalmente, resistir à passagem no trato gastrointestinal para seguirem até o intestino e promoverem seus benefícios (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003; ZUCCOTTI et al., 2008).

Para que isso aconteça devem tolerar o baixo pH do suco gástrico, resistir à ação da bile e das secreções pancreáticas e intestinais, aderirem ao muco ou epitélio intestinal e ter viabilidade até o consumo final, não transportar genes transmissores de resistência a antibióticos e possuir propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas, além de comprovação *in vivo* e *in vitro* por doses reconhecidas (COPPOLA; TURNES, 2006).

Quando os microrganismos alcançam o intestino, são capazes de permanecerem ali durante um curto período de tempo, em estado não proliferativo. O primeiro passo para a colonização é a adesão à mucosa intestinal, a maioria dos autores a considera como um pré-requisito para exercer efeitos benéficos no hospedeiro, tal como a exclusão competitiva de bactérias enteropatogênicas ou imunomodulação (LEITE, 2012).

Considerando que a sobrevivência ao processo digestivo:

- é etapa fundamental para ação probiótica de um microrganismo;
- além de uma exigência da ANVISA para comprovação de ação probiótica de um produto;
- e que o processo de microencapsulação por spray dryer pode proteger os microrganismos das condições gástricas;

O presente projeto avaliou a sobrevivência de microrganismos ao processo de digestão de um produto em pó, que pode ser utilizado como suplemento ou ingrediente para o preparo de alimentos e bebidas.

5 Avaliação de Desempenho

5.1 Metodologia Experimental

5.1.1 Amostras utilizadas

O presente projeto de iniciação tecnológica faz parte de um projeto maior, “Desenvolvimento de Produto a Base de Kefir Desidratado por Spray Dryer”, que foi financiado pelo programa PIPE fase 1 da FAPESP (Processo 2018/00374-1). As amostras de Kefir (pó puro, pó GA+PEC, reinoculado puro, reinoculado GA+PEC) utilizadas neste projeto foram desenvolvidas e fornecidas pela empresa Tekóporã Alimentos e Probióticos Ltda., vinculada a este projeto.

5.1.2 Avaliação da sobrevivência de microrganismos frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

As amostras utilizadas neste experimento foram selecionadas de acordo com as possibilidades de uso dos produtos gerados:

- a) Produtos que passariam pela digestão gastro-intestinal completa após a ingestão: pós como suplementos acondicionados em comprimidos ou cápsulas comuns, ou em pó para reconstituição em água, ou ainda como cultura iniciadora, em que o consumidor iria ingerir o produto reinoculado;
- b) Produtos que traspassariam à etapa de digestão gástrica: pós como suplemento com uso de cápsula gastro-resistente.

Utilizou-se o procedimento realizado por Santos e Saad (2016) com modificações. Foram adicionados 100 μ L (kefir líquido e pós puro e GA+Pec reinoculados) ou 100 mg (pós puro e GA+Pec) de amostra em um tubo falcon de 15 mL estéril contendo 4 mL de solução de NaCl 0,85%. O pH foi ajustado para a faixa de 2,0 a 2,5. Posteriormente, adicionou-se ao tubo, 500 μ L de solução de pepsina 3% (m/v, Pepsin from porcine gastric mucosa Sigma-Aldrich-P7000) e 50 μ L de solução de lipase 0,013% (m/v, Amano Lipase G from *Penicillium camemberti*, Sigma-Aldrich-534838), de modo a obter concentrações de 3,0 g/L e 1,30 mg/L, respectivamente. Os tubos foram colocados em uma incubadora shaker orbital (Tecnal TE-420) a 37 °C, com agitação a 150 rpm durante 2 horas para simular os movimentos peristálticos (fase gástrica). Após as 2 horas de incubação, os tubos foram retirados do shaker e colhida as alíquotas para plaqueamento do T2 (fase gástrica).

Em seguida, o pH da amostra foi ajustado entre 4,5 e 5,5 utilizando-se uma solução alcalina, produzida a partir de 75mL de NaOH 1M, 7g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio monobásico) e água destilada q.s.p. 500mL. Foram adicionados ao falcon 500 μ L de bile 6% (m/v, Bile bovine, Sigma-Aldrich-B3883,) e 0,01g de pancreatina (Pancreatin from porcine pancreas, Sigma-Aldrich P3292) para atingirem as concentrações de 5 g/L e 1,6 g/L, respectivamente, após completar-se o volume para 6 mL com solução de NaCl 0,85%. As amostras foram novamente incubadas a 37 °C por 2 horas, sob agitação, para a simulação da fase entérica I. Após mais 2 horas de incubação, os tubos foram retirados do shaker e colhida as alíquotas para fazer o plaqueamento do T4.

Em seguida, para a última etapa, ajustou-se o pH da amostra entre 6,5 e 7,5 utilizando-se a mesma solução alcalina. Adicionou-se ao tubo, mais 1090 μ L de bile 6% (m/v) para que as concentrações de bile e pancreatina atingissem 7,95 g/L e 0,79 g/L, respectivamente após completar-se o volume para 12 mL com solução de NaCl 0,85%. As amostras foram levadas ao shaker por 2 horas a 37 °C, sob agitação, finalizando-se a simulação da fase entérica II e completando-se as 6 horas de ensaio. Finalizada as 6 horas de ensaio, foram retiradas as

alíquotas das amostras dos tubos para plaqueamento do T6.

Adicionalmente, para as amostras em pó, o procedimento foi realizado com amostra adicionada após a fase gástrica, após a neutralização do pH, simulando o uso do pó como suplemento adicionado em uma cápsula gastro-resistente. Nesta situação, O T2 foi considerado igual ao T0.

Para a análise microbiológica, as alíquotas foram plaqueadas em diluição seriada em meios MRS, YGC E M17. As soluções utilizadas foram esterilizadas em autoclave e as sensíveis ao calor passaram por membrana filtrante 0,22 µm.

O T0 foi determinado pela contagem microbiológica inicial das amostras não-submetidas ao ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada amostra mais um ensaio em branco como controle de contaminação. Utilizou-se um tubo adicional para aferição do pH e determinação dos volumes de HCl 1M ou solução alcalina necessários para as etapas de ajuste de pH (realizadas fora do fluxo laminar).

OBS: Inicialmente estava previsto que este ensaio seria realizado com meios de cultura seletivos para as espécies mais abundantes determinadas por metagenômica. Porém, devido à quarentena por conta da pandemia e fechamento do laboratório onde as análises seriam realizadas, não foi possível a realização da metagenômica antes do ensaio de digestão, pois não havia tempo hábil para isso. Então, decidiu-se realizar as mesmas análises microbiológicas que foram realizadas nas amostras iniciais (BAL, lactococos e leveduras). Adicionalmente, os sistemas de digestão (conteúdo dos tubos após a finalização do ensaio de digestão) foram reservados para determinação das espécies sobreviventes por metagenômica.

5.1.3 Identificação das espécies de microrganismos presentes

5.1.3.1 Extração do Material Genético do Microbioma do Kefir e Preparo para Metagenômica

As amostras de kefir líquido (antes da secagem) foram extraídas diretamente. Já as amostras de kefir em pó foram reinoculadas em leite desnatado em pó reconstituído para crescimento das células viáveis. Desse modo, a proporção de células eventualmente mortas durante o processo de secagem seria insignificante, prevalecendo o DNA das células que sobreviveram ao processo de secagem. Essa análise irá possibilitar uma avaliação qualitativa e semi-quantitativa das bactérias que sobrevivem ao processo de secagem.

De modo semelhante, os sistemas de digestão (conteúdo dos tubos após a finalização do ensaio de digestão dos pós puro e GA+Pec “com cápsula” e dos pós puro e GA+Pec reinoculados) foram centrifugados a 2.152g/10 minutos (CR22G, Himac) e após o precipitado ser lavado 2 vezes com 2 mL de solução salina estéril, foram reinoculados em 3 ml de leite desnatado 8% previamente autoclavado e incubado a 30°C por 48h para aumento da contagem das células sobreviventes ao processo de digestão. Essas amostras foram utilizadas para extração de DNA e submetidas à análise por metagenômica para determinação das espécies

sobreviventes ao processo de digestão *in vitro*.

Não foi possível a realização da metagenômica nas amostras provenientes da simulação da digestão gastrointestinal completa (sem cápsula) *in vitro* das amostras de kefir em pó porque ultrapassava o número de amostras possíveis em uma placa. Optou-se pela exclusão dessas amostras por terem sido as que levaram a uma maior perda de bactérias lácticas totais na análise microbiológica (figuras 2 e 3).

A extração de DNA foi realizada utilizando-se DNeasy® mericon Food Kit (Qiagen). Foram utilizados 1 mL das amostras líquidas (kefir líquido, reinoculado e sistema de digestão) e 0,1 g das amostras em pó (kefir em pó). Para as amostras líquidas, inicialmente foi realizada uma centrifugação a 4.440 x g por 10 minutos (Centrifuge 5418, Eppendorf; CR22G, Himac) com descarte do sobrenadante e subsequente ressuspensão do precipitado em 600 µL de tampão de lise (Food Lysis Buffer do kit DNeasy® mericon Food Kit - Qiagen). Já o material em pó foi diretamente ressuspendido no tampão de lise.

Antes de ser iniciada a extração seguindo-se as orientações apresentadas pelo o fabricante do Kit, as amostras passaram por uma etapa prévia de tratamento enzimático com lisozima (50 mg/mL, Sigma-Aldrich) e mutanolisina (50 U/mL, Sigma-Aldrich) seguindo o protocolo modificado de Marsh et al. (2013) e Melkonian et al. (2019). Após a adição das enzimas no material, as amostras permaneceram incubadas em banho seco à 37°C por 30 minutos com agitação breve a cada 5 minutos. Após o tratamento prévio, seguiu-se as etapas de extração conforme as instruções do fabricante. Houve apenas uma alteração de equipamento durante o processo de extração, ao invés do uso do thermomixer como pré-determinado no manual do fabricante, foi utilizando banho seco, mantendo a temperatura de 60°C com agitação de 5 segundos a cada 2 minutos a 1.000 rpm utilizando-se vórtex.

Após o fim do processo de extração, as amostras foram submetidas a espectrofotometria no equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) a fim de se obter a concentração de material genético de cada amostra. As amostras foram mantidas entre -2 a -6°C até serem transportadas a empresa Gentros Biotecnologia Ltda., Paulínea-SP, para serem submetidas ao sequenciamento de nova geração (NGS) através do sequenciador MiniSeq-Illumina.

5.1.3.2 Metagenômica

O DNA extraído foi enviado para a empresa Gentros Pesquisa e Desenvolvimento Ltda onde foram realizadas as seguintes atividades:

- Quantificação do DNA recebido por fluorimetria;
- Confecção das bibliotecas e sequenciamento de nova geração (NGS) em plataforma Illumina;
- Mini-Seq (100K), Corrida Paired End 150bp (2x150bp);
- Análise de Bioinformática.

5.1.3.3 Seleção das espécies sobreviventes mais abundantes

Foi realizada a seleção das 10 espécies mais abundantes de bactérias e fungos,

considerando o somatório das leituras do conjunto de todas as amostras dos grupos G1 a G5 que estavam presentes nos reinoculados do pó puro e GA+Pec (indicando resistência a secagem) e que deram leitura em pelo menos um dos testes de digestão *in vitro* (indicando resistência à digestão). Espécies que, por exemplo, eram abundantes no kefir líquido, mas tiveram leitura “zero” nos reinoculados puro e GA+Pec e/ou em todos os testes de digestão, foram excluídas desta seleção. Foi realizada a comparação do logaritmo de base 10 das leituras das amostras de cada grupo para as 10 espécies selecionadas por análise estatística.

5.2 Resultados Experimentais e Análise

5.2.1 Avaliação da sobrevivência de microrganismos frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

As figuras de 1 a 3 e 9 a 10 mostram o perfil de sobrevivência à simulação da digestão gastrointestinal *in vitro* das diferentes amostras avaliadas por métodos dependentes de cultivo para BAL, lactococos e leveduras. Observa-se na figura 1 que o kefir líquido fermentado pelos grãos (avaliado como referência para comparação) sofre uma redução significativa da contagem de microrganismos avaliados pelos 3 meios de cultura ao longo da simulação do processo de digestão, porém mantém-se uma contagem final de aproximadamente Log=6 UFC/mL tanto para bactérias lácticas como leveduras.

Ao se fazer a simulação da digestão utilizando-se as amostras em pó puro (figura 2) e GA+Pec (figura 3), observa-se uma queda brusca da contagem de bactérias lácticas totais já ao final da fase gástrica, evidenciada pelos meios MRS e M17, para ambas as amostras. Em contraponto, observa-se também um aumento da contagem de leveduras entre os tempos 2 e 4 horas, favorecida pelo pH ácido gástrico, que mantém uma contagem final aproximada de Log=2 UFC/g para a amostra pó puro, mas zero ao final do experimento para a amostra GA+Pec, que parece não favorecer a sobrevivência destes microrganismos. O pH ótimo para atividade de leveduras está entre 4,5 e 5,0, porém algumas cepas são resistentes ao pH 2,0 por produzir substâncias tamponantes (SANT’ANA, 2009). Esta recuperação da viabilidade de leveduras durante a digestão ácida, indica que, embora a contagem por métodos dependentes de cultivo fosse zero no produto inicial, é possível que ainda haja um número pequeno de células vivas que não passíveis de contagem por estes métodos.

Dados semelhantes foram encontrados por Cassanego et al. (2018), que isolou 19 cepas entre *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniospora uvarum* and *Kazachstania unispora* de amostras de kefir no Rio Grande do Sul. Das 19 cepas, 15 foram resistentes à digestão gástrica, mas não resistiram à digestão intestinal, *in vitro*.

Em um estudo de Arslan et al. (2015), foram encontrados resultados diferentes: *S. boulardii* foi microencapsulado com goma acácia e seco por spray com sobrevivência mínima de 84%. A sobrevivência em um teste de solução gástrica simulada em diferentes níveis de pH e durações mostrou que a goma arábica é o melhor material de parede, seguida pela gelatina e proteína de ervilha. As microcápsulas produzidas na temperatura de secagem mais elevada (125°C) apresentaram maior resistência à solução gástrica do que as da temperatura de

secagem mais baixa (80°C). Além disso, a sobrevivência diminuiu com o aumento do tempo de exposição à solução gástrica simulada.

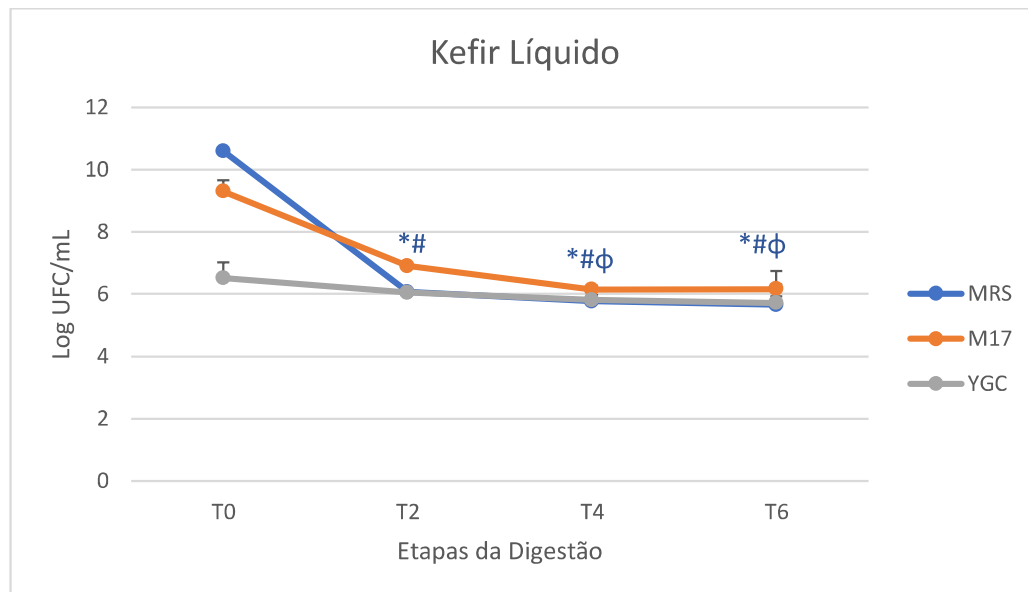


Figura 1 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir líquido fermentado à partir do leite em pó reconstituído à 8% à simulação da digestão gastro-intestinal avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

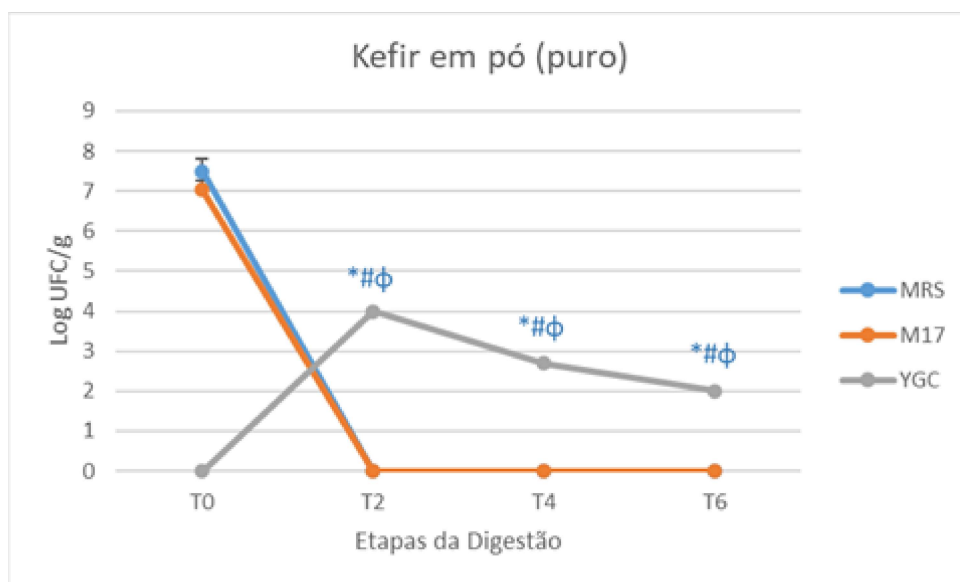


Figura 2 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó puro (sem uso de microencapsulantes) à simulação da digestão gastro-intestinal avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

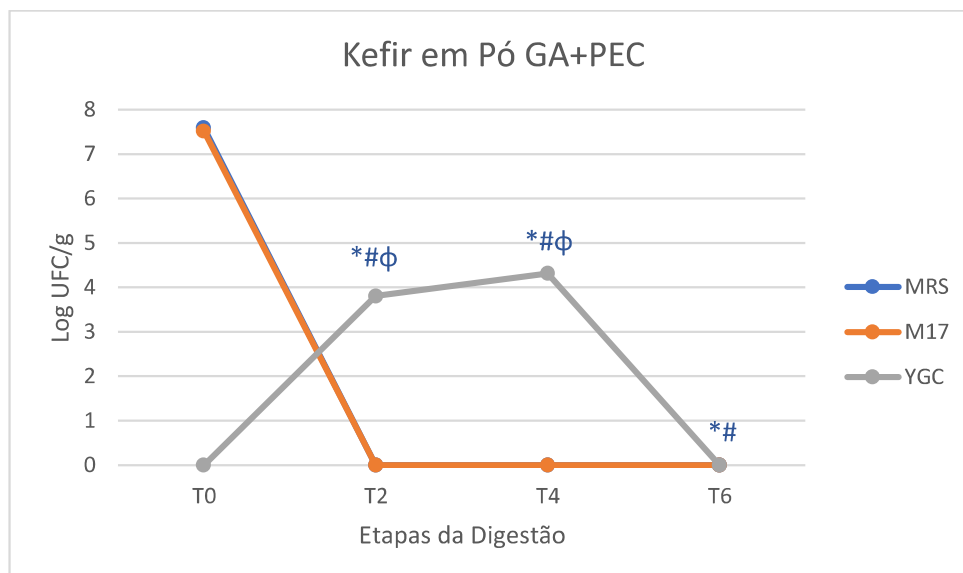


Figura 3 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó GA+PEC à simulação da digestão gastro-intestinal avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

As figuras 4 e 5 mostram a simulação do uso de cápsula gastro-resistente para as amostras puro e GA+Pec. Nesta situação a contagem de bactérias lácticas totais e lactococos no final do experimento se mantém em aproximadamente $\text{Log}=4$ para ambas as amostras, mas a sobrevivência de leveduras não foi favorecida sem a passagem pelo pH ácido da etapa gástrica. As figuras 6 a 8 mostram que no caso de utilização de cápsula gastro-resistente, não há vantagem do uso dos microencapsulantes testados.

Já os gráficos 9 e 10 mostram a simulação da digestão gastrointestinal dos produtos reinoculados, considerando a hipótese de ser usado como cultura iniciadora. Não foi observada sobrevivência de microrganismos na simulação da digestão do produto reinoculado a partir do pó puro (figura 9). Em contrapartida, nesta situação parece que a microencapsulação do pó GA+Pec antes da reinoculação favoreceu a sobrevivência apenas de bactérias lácticas ao final do experimento.

A sobrevivência é essencial para bactérias que se destinam a povoar o intestino humano: esta é uma das questões mais importantes ao obter benefícios para a saúde com probióticos. Diferente do que foi encontrado no presente estudo, Huang et al. (2017) observou melhora da viabilidade das bactérias tratadas com GA em 100 vezes em relação ao controle após exposição por 120 min ao suco gástrico suíno a 37°C . Entretanto, os resultados de ensaios *in vitro* simples não podem ser extrapolados diretamente para organismos vivos. É problemático realizar vários testes de digestão no contexto de estudos em animais e humanos desafiadores éticos e técnicos. Os novos modelos dinâmicos gastrointestinais agora disponíveis, que podem refletir melhor os complexos sistemas digestivos dos organismos vivos, agora precisam ser aplicados para testar o comportamento durante a digestão e a eficiência da entrega de produtos probióticos. (Huang et al., 2017).

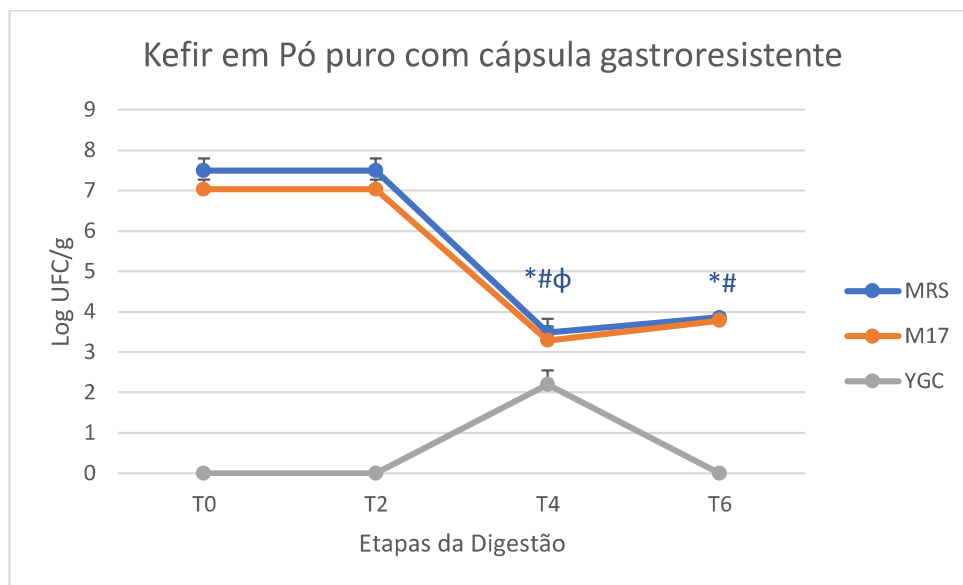


Figura 4 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó puro (sem uso de microencapsulantes) à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastroresistente avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

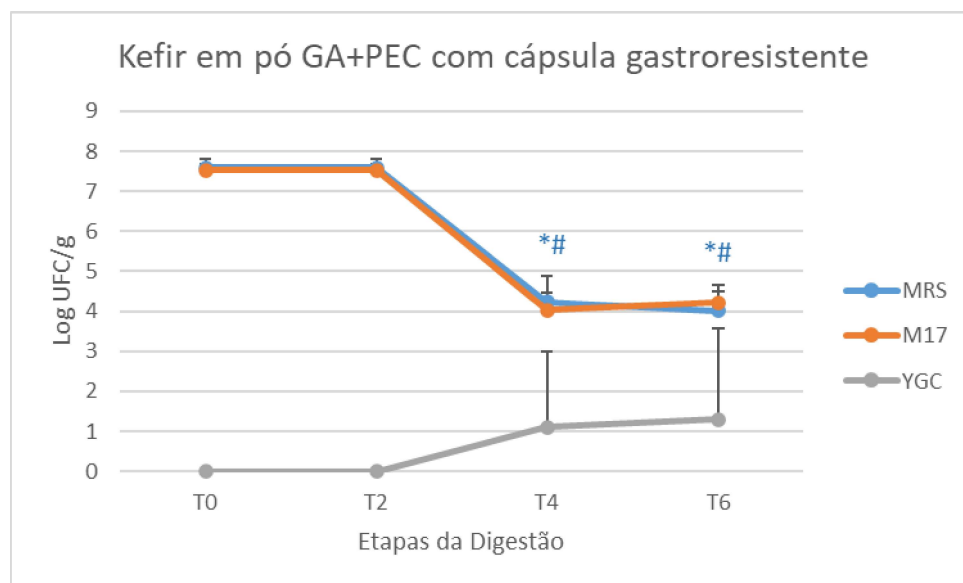


Figura 5 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó GA+PEC à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastro-resistente avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

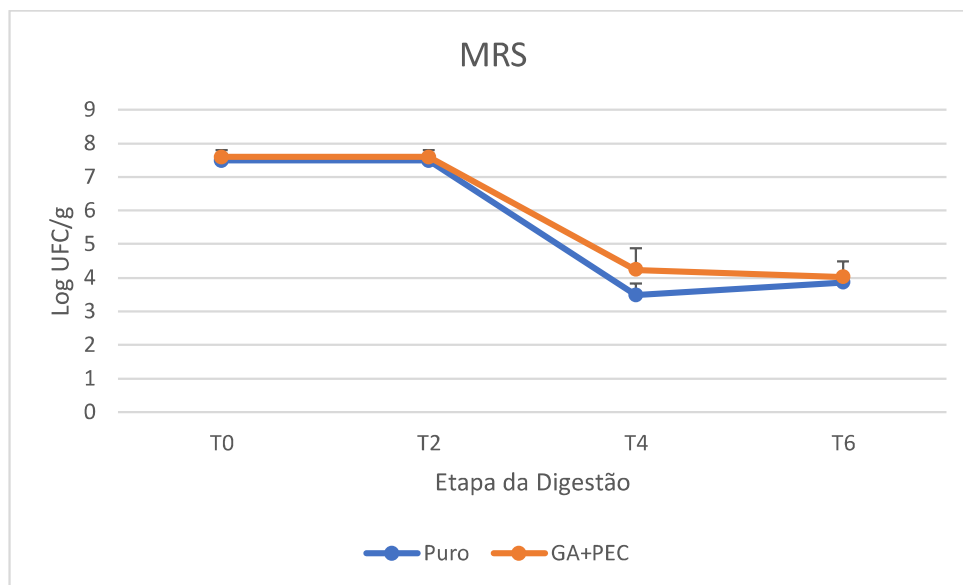


Figura 6 – Comparação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó puro com GA+PEC à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastro-resistente avaliada por crescimento dependente de cultivo no meio de cultura MRS (BAL), * $p < 0,05$ para a comparação da contagem microbiana nas etapas T0, T2, T4 e T6 entre pó puro e GA+PEC.

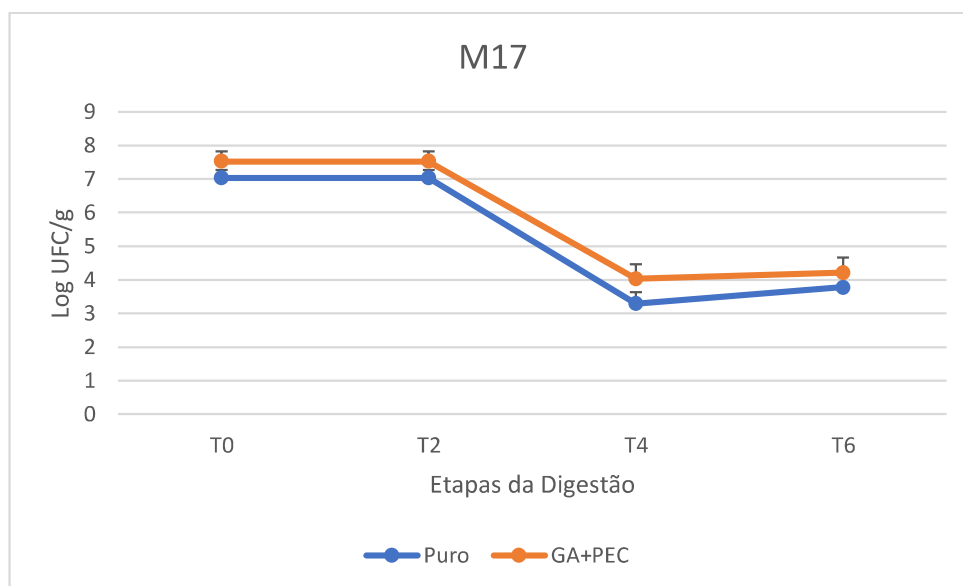


Figura 7 – Comparação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó puro com GA+PEC à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastro-resistente avaliada por crescimento dependente de cultivo no meio de cultura M17 (Lactococos), * $p < 0,05$ para a comparação da contagem microbiana nas etapas T0, T2, T4 e T6 entre pó puro e GA+PEC.

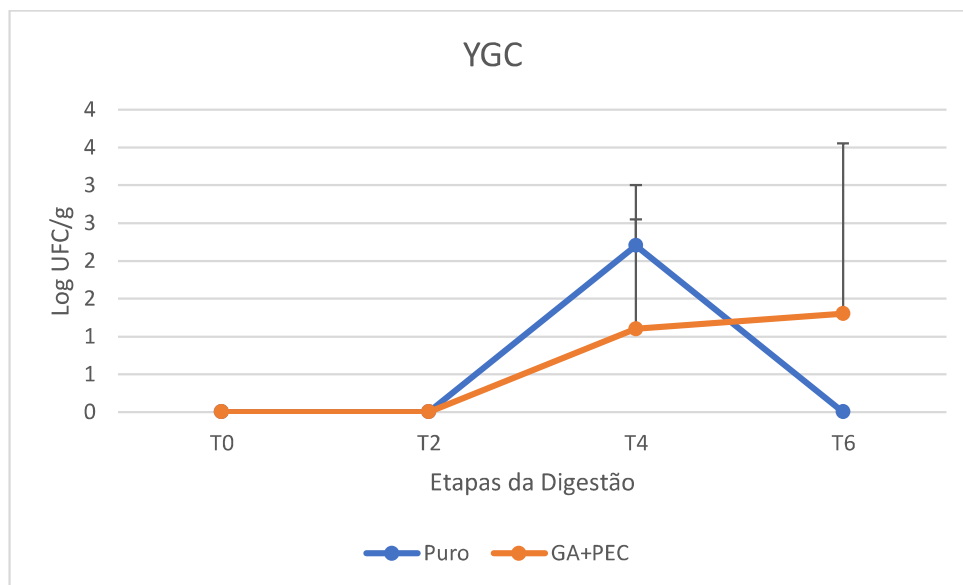


Figura 8 – Comparação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó puro com GA+PEC à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastro-resistente avaliada por crescimento dependente de cultivo no meio de cultura YGC (Leveduras), * $p < 0,05$ para a comparação da contagem microbiana nas etapas T0, T2, T4 e T6 entre pó puro e GA+PEC.

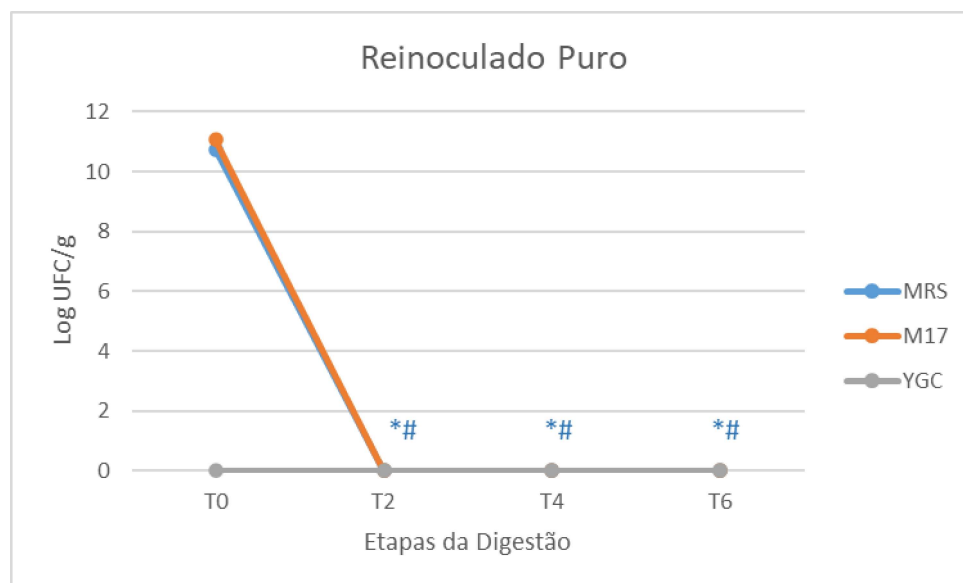


Figura 9 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó puro reinoculado à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastroresistente avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

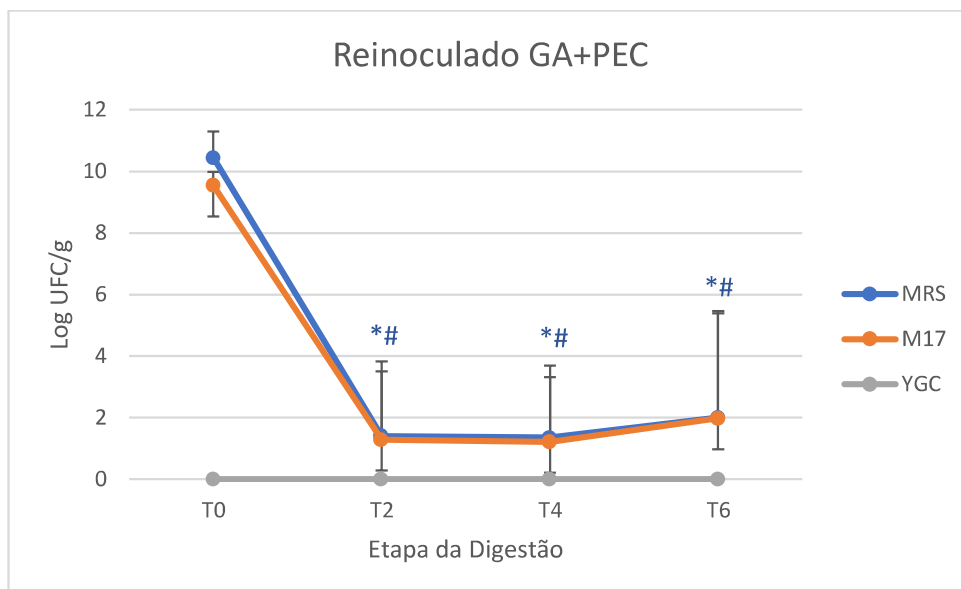
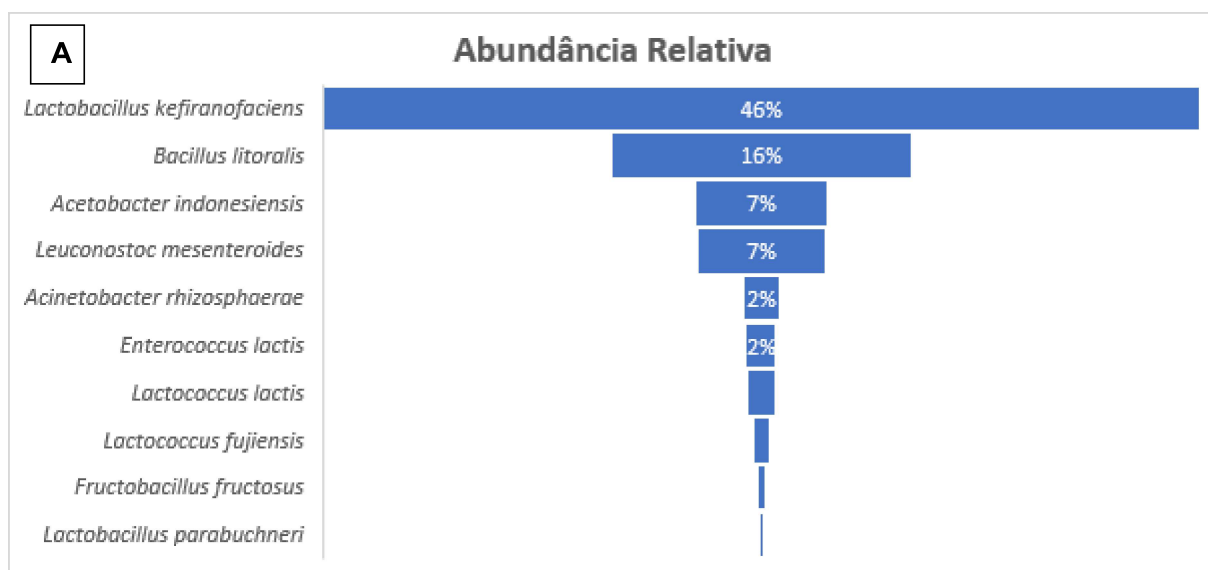


Figura 10 – Avaliação da resistência dos microrganismos presentes no kefir em pó GA+PEC reinoculado à simulação da digestão intestinal simulando a utilização de cápsula gastroresistente avaliada por crescimento dependente de cultivo em meios de cultura MRS (BAL), M17 (Lactococos) e YGC (leveduras). $p < 0,05$, *MRS (BAL), #M17 (Lactococos) e ϕ YGC (leveduras) para a comparação da contagem microbiana nas etapas T2, T4 e T6 em relação a T0.

5.2.2 Análise comparativa das populações das espécies sobreviventes mais abundantes

A figuras 11 mostra a seleção das 10 espécies mais abundantes de bactérias (A) e fungos (B) que estavam presentes nas amostras de kefir em pó utilizadas.



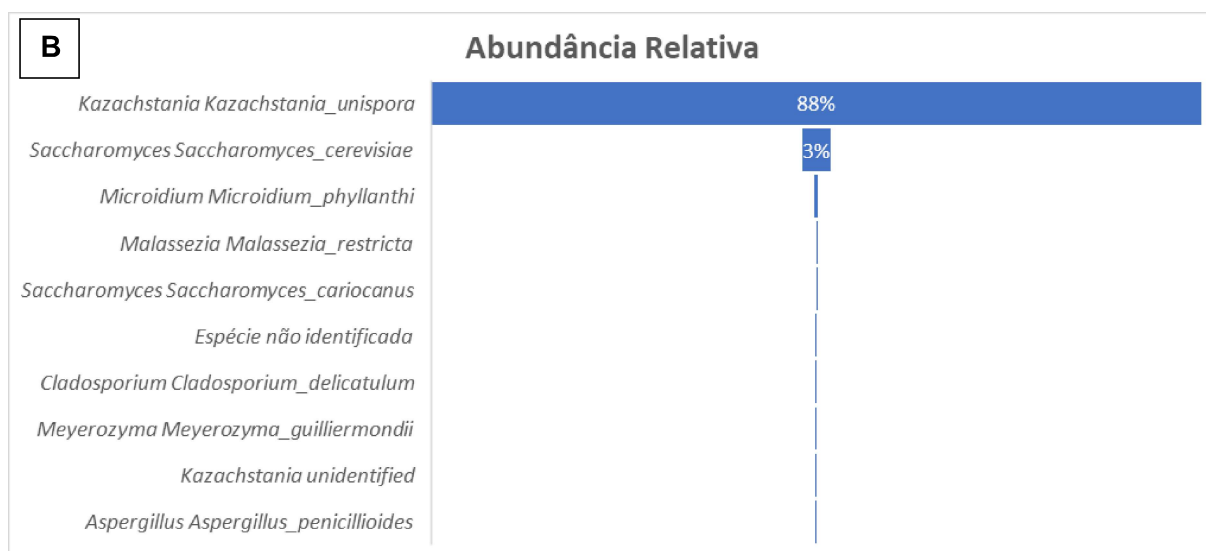


Figura 11 - 10 espécies sobreviventes mais abundantes de bactérias (A) e fungos (B), considerando o somatório das leituras do conjunto de todas as amostras dos grupos G1 a G5 que estavam presentes nos reinoculados do pó puro e GA+Pec (indicando resistência a secagem) e que deram leitura em pelo menos um dos testes de digestão *in vitro* (indicando resistência à digestão).

As espécies predominantes entre as que se mostraram resistentes foram *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Kazachstania Kazachstania_unispora*, para bactérias e fungos, respectivamente (figuras 11).

5.2.2.1 Bactérias

a. Efeito da simulação da digestão *in vitro* na sobrevivência das espécies de bactérias

O produto em pó sem adição de microencapsulantes foi resistente à simulação da digestão para *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Fructobacillus fructosus* e *Lactobacillus parabuchneri*, enquanto o com microencapsulantes foi resistente apenas para *Lactobacillus kefiranofaciens*. O produto reinoculado a partir do pó puro apresentou sobrevivência para *Bacillus litoralis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus fujiensis* e *Fructobacillus fructosus*. Para o reinoculado GA+Pec, apenas *Enterococcus lactis* mostrou sobrevivência à simulação da digestão.

b. Efeito do uso da combinação de goma acácia+pectina como microencapsulantes nas diferentes etapas do processo sobre as espécies de bactérias.

Não houve diferença estatística dentro dos grupos sem e com adição de microencapsulantes nas espécies avaliadas que trouxesse vantagem ao seu uso.

O quadro 1 traz um resumo, em relação às amostras produzidas sem microencapsulantes, da sobrevivência das 10 espécies selecionadas ao processo de secagem (dada pela abundância no reinoculado) e aos processos de simulação da digestão do pó e do reinoculado. Observa-se que *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Leuconostoc mesenteroides*,

Fructobacillus fructosus e *Lactobacillus parabuchneri* são as espécies mais resistentes dentre as 10 mais abundantes no produto em pó, considerando a simulação da digestão com uso de cápsula gastro-resistente (sem a fase gástrica). Já para o produto reinoculado, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus fijiensis* e *Fructobacillus fructosus* se mostraram mais resistentes considerando a digestão gastrointestinal completa. *Bacillus litoralis* e *Enterococcus lactis*, apesar de terem tido boa sobrevivência a partir do produto reinoculado parecem ser provenientes do leite em pó e não do kefir. As características mais importantes destas espécies serão descritas a seguir.

Quadro 1 – Resumo da Sobrevivência das bactérias à secagem e aos sistemas de digestão em relação aos produtos que lhes deram origem. As espécies originárias do kefir líquido que sobreviveram ao processo de secagem e a algum dos testes de digestão realizados foram destacadas em negrito.

Kefir Puro	Secagem	Digestão	Digestão
Sobrevivência	Pó x Reinoculado	Pó	Reinoculado
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	Sim	Sim	Não
<i>Bacillus litoralis</i>	-	Não	Sim
<i>Acetobacter indonesiensis</i>	Sim	Não	Não
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Acinetobacter rhizosphaerae</i>	-	Não	Não
<i>Enterococcus lactis</i>	-	Não	Sim
<i>Lactococcus lactis</i>	Sim	Não	Sim
<i>Lactococcus fijiensis</i>	Sim	Não	Sim
<i>Fructobacillus fructosus</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	Sim	Sim	Não

Algumas cepas de *Lactobacillus kefiranofaciens* tem sido estudadas como alternativa para exploração no desenvolvimento de novos alimentos funcionais. XL10 foi isolado dos grãos de kefir tibetano e a função probiótica da cepa foi estudada. Observou-se que XL10 pode sobreviver à incubação de 3 h a pH 3,5. Após administração oral contínua de XL10 por 2 semanas, a família Bifidobacteriaceae aumentou, acompanhada por um declínio observável nos filos Proteobacteria nos camundongos testados. *Butyrivibrio* e *Pseudobutyrvibrio*, reconhecidas como bactérias produtoras de ácido butírico, também puderam ser detectados após 2 semanas. A cepa aderiu com sucesso à mucosa e colonizou o íleo dos ratos. (XING et al., 2017) *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 apresentou diferentes efeitos benéficos, incluindo atividade anti-colítica (WANG et al., 2015).

Bacillus litoralis apesar de não ser derivada do kefir, mostrou-se resistente à digestão gastrointestinal do produto reinoculado. Yoon e Oh (2005) isolaram a cepa SW-211T de uma planície de maré perto da praia de Daepo no Mar Amarelo na Coreia. Não foram encontrados na literatura científica possíveis impactos desta espécie à saúde (NCBI, 2021). *Bacillus litoralis* M3 pode ter aplicação como biofertilizante e na agricultura. Produz oligossacarídeos de alginato

como produto de fermentação. (WANG et al., 2016)

O gênero *Leuconostoc* é homofermentador, fermenta açúcar liberando apenas um subproduto, o ácido lático. A espécie *L. mesenteroides* produz uma proteína conhecida como bacteriocina, que impede o crescimento de outras espécies bacterianas que podem ser patogênicas. *Leuconostoc mesenteroides* tem boas propriedades de adesão, atividade β -galactosidase e viabilidade na estocagem de leite fermentado, possui atividade anti-*Listeria* e já foi descrita sobrevivência em condições do trato gastro-intestinal (PAULA et al., 2015).

O gênero *Lactococcus* (*L. lactis*) é vital na fabricação de queijos, principalmente na acidificação por meio da fermentação da lactose. Como resultado dessa acidificação, a adaptação e a replicação de microrganismos patogênicos são atenuadas. Além disso, o gênero *Lactococcus* é capaz de proteólise (ISSA; TAHERGORABI, 2019). Algumas cepas de *Lactococcus Lactis* produzem um peptídeo chamado nisina que possui ação conservante. Já foi descrita resistência gastro-intestinal e adesão a células intestinais humanas Caco-2 para esta espécie. É encontrada na mucosa vaginal e tem sido estudada sua capacidade de proteção a infecções vaginais (NAMI et al., 2014).

Lactococcus fujiensis foram identificadas pela primeira vez em folhas de couve chinesa. (CAI et al., 2011) Já *Fructobacillus fructosus* e *Lactobacillus parabuchneri* compõem juntas um produto cosmético para cuidados com a pele com registro de patente nos EUA (FRITZMEIER; LEWANDOWSKI, 2017).

A bactéria frutofílica *Fructobacillus fructosus* foi isolada do néctar da flor *Butea monosperma*. Patil et al. (2020) avaliaram seu potencial como ingrediente funcional para as indústrias alimentícia e farmacêutica por suas características probióticas: resistência em ambiente ácido/suco gástrico, capacidade de auto-agregação mesmo na presença de enzimas hidrolíticas, co-agregação com bactérias patogênicas, propriedades de hidrofobicidade e nenhuma atividade hemolítica. Sakandar et al. (2019) sugere seu uso como potencial para fermentação de cereais para melhorar as síndromes do intestino irritável mediadas pela frutose.

5.2.2.2 Fungos

Não foram encontradas leveduras por meios dependentes de cultivo nas amostras utilizadas para a análise da metagenômica de pós (amostras congeladas por 9 meses) e seus respectivos reinoculados. Métodos independentes de cultivo como a análise por metagenômica, permite a detecção de espécies não cultiváveis Rosa et al. (2017), desse modo, é possível que as espécies encontradas em maior abundância estejam viáveis. A maioria das espécies manteve proporção estável no produto em pó ou reinoculado em relação ao kefir líquido, exceto para *Saccharomyces Saccharomyces_cerevisae*, que teve a proporção aumentada nos pós e nos reinoculados, *Meyerozyma Meyerozyma_guilliermondii* que teve aumento da proporção apenas no pó puro e uma espécie não identificada que teve sua proporção reduzida na amostra pó GA+Pec em relação ao líquido.

De modo semelhante, a maioria das espécies manteve proporção estável na

comparação entre as amostras de pós e reinoculados, exceto para *Meyerozyma guilliermondii* que teve sua proporção significativamente reduzida na amostra reinoculada em relação ao pó puro, indicando provável menor viabilidade. O produto em pó sem adição de microencapsulantes manteve a proporção de leituras nas amostras dos sistemas de digestão, exceto para *Meyerozyma guilliermondii*. Já *Kazachstania unidentified*, *Aspergillus Aspergillus_penicillioides* mostraram maior resistência à simulação da digestão gastrointestinal nas amostras de reinoculado com o pó GA+Pec.

O quadro 2 traz um resumo em relação às amostras produzidas sem microencapsulantes, da sobrevivência das 10 espécies de fungos selecionadas, ao processo de secagem (dada pela abundância no reinoculado) e aos processos de simulação da digestão do pó e do reinoculado. Observa-se que apenas *Meyerozyma guilliermondii* não foi resistente à simulação da digestão do produto em pó, considerando a simulação da digestão com uso de cápsula gastro-resistente (sem a fase gástrica) e *Aspergillus Aspergillus_penicillioides* não foi resistente à simulação da digestão do produto reinoculado considerando a digestão gastrointestinal completa.

Quadro 2 – Resumo da Sobrevivência das bactérias à secagem e aos sistemas de digestão em relação aos produtos que lhes deram origem. As espécies originárias do kefir líquido que sobreviveram ao processo de secagem e a algum dos testes de digestão realizados foram destacadas em negro.

Kefir Puro	Secagem	Digestão	Digestão
Sobrevivência	Pó x Reinoculado	Pó	Reinoculado
<i>Kazachstania Kazachstania_unispora</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Saccharomyces Saccharomyces_cerevisiae</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Microidium Microidium_phyllanthi</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Malassezia Malassezia_restricta</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Saccharomyces Saccharomyces_cariocanus</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Espécie não identificada</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Cladosporium Cladosporium_delicatulum</i>	Sim	Sim	Sim
<i>Meyerozyma Meyerozyma_guilliermondii</i> ,	Sim	Não	Sim
<i>Kazachstania unidentified</i> ,	Sim	Sim	Sim
<i>Aspergillus Aspergillus_penicillioides</i>	Sim	Sim	Não

Perricone et al. (2014) isolaram leveduras de Altamura (região sul da Itália) e, resultados satisfatórios foram encontrados quando os autores testaram a capacidade probiótica delas; 18 isolados foram submetidos a uma seleção para suas características probióticas, entretanto, apenas 2 isolados (*Saccharomyces cerevisiae* cepa 2 e *Saccharomyces cerevisiae* cepa 4) foram selecionados e analisados em relação à simulação do trânsito gástrico; esses isolados mostraram uma tendência semelhante à *Saccharomyces Boulardii* no que diz respeito ao seu potencial probiótico.

6 Conclusão e Perspectivas Futuras

O uso da pectina como microencapsulante isolado ou em combinação com a goma acácia gerou os melhores resultados de sobrevivência de leveduras, porém não tiveram influência na sobrevivência de bactérias láticas.

A sobrevivência de bactérias láticas foi satisfatória, para ambas as amostras selecionadas em pó (com o uso de cápsula gastro-resistente) e para o leite fermentado proveniente da reinoculação das amostras GA+Pec (sem uso de cápsula gastro-resistente). Leveduras foram viáveis na simulação da digestão gastro-intestinal completa (sem cápsula gastro-resistente) apenas para a amostra pó puro.

Os dados apresentados mostram um produto composto de múltiplas espécies, com boa estabilidade de bactérias láticas, capacidade de ser utilizado como inóculo e resistência à digestão *in vitro* para várias espécies de bactérias e leveduras.

7 Referências Bibliográficas

ANAL, A. K.; SINGH, H. **Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery: a review.** Trends Food Sci Technol, v.18 p.240–251, 2007.

ARSLAN, S.; MUSTAFA, E.; ISMAIL, T.; AYHAN, T. **Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying.** LWT - Food Science and Technology, V. 63, Issue 1, 2015, p. 685-690, ISSN 0023-6438.

BOURRIE, B. C. T.; WILLING, B.P.; COTTER, P. D. **The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir.** Frontiers in Microbiology, v.7, Article 647, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 241, de 26 de julho de 2018.** Brasília, 2018. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7. Acesso em: 12 abr. 2019.

CABRAL, N. S. M. **Kefir sabor chocolate: caracterização microbiológica e físico-química.** 2014. 84p. Trabalho de conclusão do curso de Graduação em Nutrição da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro - Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2014.

CAI, Y.; JINSONG, Y.; HUILI P.; MAKI, K. ***Lactococcus fujiensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from vegetable matter.** International Journal of systematic and evolutionary microbiology, v. 61, Issue 7, 2011.

CASSANEGO, D. et al. **Identification by PCR and evaluation of probiotic potential in yeast strains found in kefir samples in the city of Santa Maria, RS, Brazil.** Food Science and Technology, v. 38, suppl. 1, p.59-65, 2017.

CASTRO-CISLAGHI, F.P.; FRITZEN-FREIRE, C.B.; SANT'ANNA, E.S. **Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* Bb-12 por spray drying: comparação com goma arábica.** Revista Ciência Rural online. Santa Maria, v.42, n.9, p.1694-1700, set. 2012.

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

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

FRITZMEIER, U.; LEWANDOWSKI, B. 2017. Patente US20190183783A1, United States.

FURUNO, T.; NAKANISHI, M. **Kefiran suppresses antigen-induced mast cell activation**. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 35, n. 2, p. 178-183, 2012.

GOLOWCZYC, M. A. et al. **Survival of spray-dried *Lactobacillus* kefir is affected by different protectants and storage conditions**. Biotechnology Letters, v.33 n.4, p.681-686, 2011.

GOLOWCZYC, M. A. et al. **Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying**. Letters in Applied Microbiology, v.50, p.7-12, 2010.

HUANG, T. et al. **Characterization and emulsifying properties of octenyl succinate anhydride modified *Acacia seyal* gum (gum arabic)**. Food Hydrocolloids, v. 65, p.10-16, 2017.

ISSA, A.T.; TAHERGORABI, R. **Milk bacteria and gastrointestinal tract: microbial composition of milk**. Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases, v.1. p.265-275, 2019.

KEMP, N. **Kefir, the champagne of cultured dairy products**. Cultured Dairy Products Journal, v. 19, n. 3, p.29-30, 1984.

KWON, O.K. et al. **Inhibitory effect of kefiran on ovalbumin-induced lung inflammation in a murine model of asthma**. Archives of Pharmacal Research, v. 31, n. 12, p. 1590-1596, 2008.

LEITE, A. M. O. **Análise da diversidade microbiana de grãos de kefir, caracterização da bebida fermentada e potencial probiótico das estirpes isoladas**. 2012. 237p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

MAGALHÃES, K. T. et al. **Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition**. Brazilian Journal of Microbiology, Braga, v.42, n.2, p.693-702, 2011.

MARSH, A.J. et al. **Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple sources**. PLoS ONE, Colin Dale, University of Utah, v.8, n.7, 2013.

MARTINS, E. M. F. et al. **Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria**. Food Research International, v.51, n.2, p. 764–770, 2013.

MEDRANO, M. et al. **Oral administration of kefiran induces changes in the balance of immune cells in a murine model**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 59, n. 10, p. 5299-5304, 2011.

MENEZES, C. R. et al. **Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas**. Ciência Rural, Santa Maria, v.43, n.7, p.1309-1316, 2013.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. **O Papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica**. Jornal de Pediatria, Porto Alegre, v.82, n.5, nov, 2006.

MORENO, H. O.; KUNIGK, C. J. **Encapsulação e secagem de microrganismos probióticos**. 2011. 7p. Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá - Instituto Mauá de Tecnologia, Mauá, 2011.

MORGAN, C. A. et al. **Preservation of micro-organisms by drying: A review**. Journal of Microbiological Methods, v. 66, p. 183-193. 2006.

NAMI, Y. Et al. **Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora.** Journal of Medical Microbiology, v.63, Issue 8, 2014.

NCBI. **Details about *Bacillus litoralis*:** NCBI 152268. 2021. Disponível em: https://microbiomeprescription.com/Library/Details?taxon=152268&tax_name=Bacillus%20litoralis. Acesso em: 20 jan. 2021.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de Alimentos:** Componentes dos Alimentos e Processos; trad. Fátima Murad. 1.ed. Porto Alegre: Artmed. v. 1, 294p. 2005.

PATIL, M.; JADHAV, A.; PATIL, U. **Functional characterization and in vitro screening of *Fructobacillus fructosus* MCC 3996 isolated from *Butea monosperma* flower for probiotic potential.** Lett Appl Microbiol, v.70, p.331-339.

PAULA, A. T. et al. **The Two Faces of *Leuconostoc mesenteroides* in Food Systems.** Food Reviews International, v. 31, Issue 2, p.147-171, 2015.

PAULO, E. M.; ASSIS, S. A.; SANTOS, V. L. C. S. **Polímeros constituídos por carboidratos utilizados no processo de microencapsulação de bactérias: uma revisão.** Sitientibus - Série Ciências Biológicas, Feira de Santana, v. 9, n. 4, p. 185-191, out./dez. 2009.

PERRICONE, M. et al. **Technological characterization and probiotic traits of yeasts isolated from Altamura sourdough to select promising microorganisms as functional starter cultures for cereal-based products.** Food Microbiology, v. 38, p. 26-35, 2014.

PRADO, M. R. et al. **Milk kefir:** composition, microbial cultures, biological activities, and related products. Frontiers in Microbiology, La Plata, v.6, article 1177, 2015.

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

SAKANDAR, H. A.; KUBOW, S.; SADIQ, F.A. **Isolation and in-vitro probiotic characterization of fructophilic lactic acid bacteria from Chinese fruits and flowers.** LWT, v.104, p.70-75, 2019.

SANT'ANA, G.S. **Resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces cerevisiae* e efeito protetor do íon sódio na morte celular induzida por ácido.** 2009. 130p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, área de concentração - Biologia Molecular). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2009. Orientador: Prof. Dr. Ieso de Miranda Castro.

SANTOS, C. S. **Aprimoramento das características sensoriais de emulsão alimentícia probiótica e avaliação do seu potencial funcional.** 2016, 120p. Dissertação (Mestrado na área de tecnologia de alimentos). Universidade de São Paulo – Faculdade de ciências farmacêuticas, São Paulo, 2016. Orientadora: Suzana Saad. USP, São Paulo, 2016.

SCHUCK, P. et al. **Spray drying of dairy bacteria:** New opportunities to improve the viability of bacteria powders. International Dairy Journal, Oxford, v.31, n.1, p.12-17, 2013.

UCHIDA, M. et al. **Kefiran reduces atherosclerosis in rabbits fed a high cholesterol diet.** Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, v. 17, n. 9, p. 980-988, 2010.

VINDEROLA, C. G. et al. **Immunomodulating capacity of kefir.** Journal of Dairy Research, v. 72, p. 195-202, 2005. doi: 10.1017/ S0022029905000828.

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

WANG, M. et al. **Isolation of a novel alginate lyase-producing *Bacillus litoralis* strain and**

its potential to ferment *Sargassum horneri* for biofertilizer. MicrobiologyOpen, v.5, n. 6, p. 1038-1049, 2016.

WANG, S. et al. **Effects of a novel encapsulating technique on the temperature tolerance and anti-colitis activity of the probiotic bacterium *Lactobacillus kefiranofaciens* M1.** Food Microbiology, v. 46, p. 494-500, 2015.

WESCHENFELDER, S. **Caracterização de kefir tradicional quanto à composição físico-química, sensorialidade e atividade anti-*Escherichia coli*.** 2009. 72p. Dissertação (Mestrado em ciências e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

XING, Z. et al. **In vitro and in vivo evaluation of the probiotic attributes of *Lactobacillus kefiranofaciens* XL10 isolated from Tibetan kefir grain.** Appl Microbiol Biotechnol, v.101, n. 6, p.2467–2477, 2017.

YOON, J.H.; OH, T.K. ***Bacillus litoralis* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 55, Issue 5, p. 1945–1948, 2005.

ZUCCOTI, G. V. et al. **Probiotics in clinical practice: an overview.** Journal of International Medical Research, Northampton, v. 36, n.1, p.1-53, 2008.