

Atividade inibitória de bebidas fermentadas artesanais por bactérias enteropatogênicas

Inhibitory activity of handcrafted fermented drinks by enteropathogenic bacteria

DOI:10.34117/bjdv7n1-443

Recebimento dos originais: 01/01/2021

Aceitação para publicação: 15/01/2021

Simone Brandão da Silva

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Feira de Santana
Avenida Senhora Santana, 82, Centro- Serrinha, Bahia, CEP: 48700-000
E-mail: symoonsea14@gmail.com

Elinalva Maciel Paulo

Doutora em Biotecnologia, pela Universidade Estadual de Feira de Santana
Av. Transnordestina, s/n, Novo Horizonte, Departamento de Ciências Biológicas/
LAMASP
CEP: 44036-900- Feira de Santana, BA
E-mail: elinalvamaciel@gmail.com

RESUMO

Este trabalho objetivou confrontar o caldo fermentativo das bebidas Kombucha, Aluá e Kefir sobre bactérias enteropatogênicas: *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Salmonella* sp. CCMB 281 e *Escherichia coli* CCMB 261. Para observar tal efeito inibitório, foi realizado dois tipos de testes de antagonismo bacteriano: o teste de difusão em disco e o teste de cultura mista. Também foram determinados o pH e a contagem microbiana do caldo fermentativo de cada bebida. Como resultado obtido pode-se constatar que o teste de cultura mista, mostrou-se mais eficiente com relação a detecção de efeito inibitório, quando comparado ao método de difusão em disco. Sendo possível observar através de uma das técnicas, que o Kombucha apresentou atividade antimicrobiana frente a todos os enteropatógenos testados. As demais bebidas obtiveram também efeitos inibitórios com algumas variações em relação as encontradas no Kombucha. Na contagem total de bactérias e fungos, o Kombucha apresentou menor contagem e o Kefir de leite maior contagem com relação as outras bebidas.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana, Bebidas artesanais, Kombucha, Alimentos funcionais; Micro-organismos patogênicos.

ABSTRACT

This work aimed to confront the fermentative broth of Kombucha, Aluá and Kefir drinks on enteropathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Salmonella* sp. CCMB 281 and *Escherichia coli* CCMB 261. To observe such an inhibitory effect, two types of bacterial antagonism tests were performed: the disk diffusion test and the mixed culture test. The pH and microbial count of the fermentative broth for each drink were also determined. As a result, it can be verify that the mixed culture test was shown to be more efficient in terms of detecting the inhibitory effect, when compared to the disk diffusion method. It allows to note that one of all techniques that Kombucha has presented

antimicrobial activity against all tested enteropathogens. The other drinks obtained has inhibitory effects with some variations comparing of Kombucha effects. In the microbial counting, Kombucha had a lower counting and Milk Kefir had a higher counting compared to other drinks.

Keywords: Antimicrobial activity, Craft drinks, Kombucha, Functional foods, Pathogenic microorganisms.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos fermentados são de grande importância, pois fornecem e preservam uma série de produtos com propriedades nutritivas, além de garantir sabores, aromas e texturas únicos, enriquecendo a dieta humana. A fermentação, seja acética, alcoólica ou láctica são produtos de micro-organismos fermentadores que durante o seu metabolismo geram produtos ácidos, modificando o pH do substrato.

Algumas das bebidas fermentadas, como Kombucha, Aluá e Kefir, estão cada vez mais ganhando espaço na dieta humana. Estas bebidas estão sendo atribuídas a grandes efeitos benéficos à saúde, pelos seus consumidores. Como exemplo, pode-se citar o Kombucha, que apesar de ser uma bebida milenar, e bastante consumida em outros países, está cada vez mais se popularizando no Brasil. O Kefir, também está seguindo esta tendência. Entretanto, o Aluá apesar de ser consumido há muito tempo pela comunidade indígena e por muitas famílias, em diferentes regiões no Brasil, ainda não é tão popular.

Diferentes funcionalidades, são atribuídas as bebidas fermentadas, sejam para a restauração da microbiota intestinal, emagrecimento, fortalecimento do sistema imunológico, fonte de vitaminas e minerais, melhora do funcionamento intestinal, entre outros benefícios, podendo ser portanto, consideradas como alimentos funcionais. Atualmente, o consumidor está mais consciente e exigente buscando estes tipos de alimentos. Os alimentos funcionais são atuantes na prevenção de doenças, promoção da saúde e com alto valor nutricional (ARIHARA, 2014).

As bebidas fermentadas envolvidas neste trabalho são viáveis para o consumo, por serem artesanais, de matéria prima de fácil acesso e de baixo custo. Os consumidores podem obter seus benefícios, através de receitas simples, aproveitando alguns materiais que normalmente são considerados resíduos, e com isso, beneficiando também o meio ambiente. Portanto, o objetivo do presente estudo foi elaborar bebidas fermentadas, (Kombucha de chá verde, Kefir de água, Kefir de leite e Aluá de abacaxi) e avaliar a atividade inibitória dessas bebidas sobre as bactérias enteropatogênicas (*Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Salmonella sp.* CCMB 281 e *Escherichia coli* CCMB 261). Além de

determinar o pH final, e a contagem microbiana do processo fermentativo de cada bebida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As bebidas fermentadas Kombucha, Aluá de abacaxi, Kefir de água e de Kefir de leite, foram preparadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Saúde Pública - LAMASP/UEFS. Para tal, foi utilizado um recipiente de vidro, higienizado, coberto com voal preso a um elástico, de forma a evitar a entrada de insetos e permitir aeração e liberação dos gases produzidos. Sendo os recipientes armazenados em um local sem incidência de luz direta, na temperatura ambiente (média de 30°C). O pH de cada bebida foi determinado no início e no final de cada experimento, utilizando um pHâmetro de bancada (Quimis).

2.1 PRODUÇÃO DA KOMBUCHA

Foi preparado 1 litro de chá verde, utilizando 25 gramas de folhas secas de *Camellia Simensis*, adicionado de 50 gramas de açúcar cristal, deixado em infusão por 10 minutos. De acordo com Moura (2019) o teor recomendado de açúcar varia de 5 a 20% do volume, e o teor de erva varia de acordo com a intensidade do sabor que se deseja. Após o chá atingir a temperatura ambiente, foi adicionado o inóculo (SCOBY- Symbiotic Culture of Bacteria and Yeasts), proveniente de um preparo de Kombucha comercial. Sendo adicionado também o caldo fermentativo da bebida, em um volume de 10% da infusão.

2.2 PRODUÇÃO DO KEFIR DE ÁGUA E DE LEITE

Os grãos de Kefir utilizados foram obtidos a partir de doação. A produção do Kefir de água e de leite é semelhante, modificando somente o substrato de fermentação. No presente trabalho foi produzido de acordo com Santos *et al.* (2012). 1 litro de leite no (preparo de Kefir de leite) e 1 litro de água (preparo de Kefir de água), foram fervidos, em recipientes de vidros separados, resfriados a temperatura ambiente (25°C), sendo imediatamente inoculado 50 gramas de grãos de Kefir proveniente das respectivas bebidas fermentadas. No recipiente contendo água foi adicionado 50 gramas de açúcar mascavo. Após o período de fermentação que durou 96h em temperatura ambiente (média de 30°C), os grãos foram separados por filtração, utilizando peneira, acondicionando a bebida imediatamente no refrigerador por 24 horas. O Kefir de leite a fermentação ocorreu em

24h, sendo também acondicionado sobre refrigeração. O maior período de fermentação em bebidas fermentadas resulta em um produto mais ácido, com redução significativa de açúcares na bebida (FERREIRA, 2001).

2.3. PRODUÇÃO DO ALUÁ DE ABACAXI

O substrato de fermentação do Aluá foram cascas de abacaxi, lavadas com água potável, mas não higienizadas. Em um recipiente de vidro contendo 1 litro de água mineral adoçado com 100g de açúcar cristal, foi adicionado 350g da casca de abacaxi. A fermentação ocorreu em temperatura ambiente por 48 horas (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

2.4 TESTE DE ANTAGONISMO

Visando avaliar o efeito inibitório dos metabólitos gerados no processo fermentativo das bebidas, foram utilizados dois métodos: difusão em disco de (Kirby& Bauer, 1966; Laborclin, 2011) e a técnica da cultura mista (MAMÉDIO, 2017). Os enteropatógenos testados para verificar tal efeito foram provenientes da Coleção de Culturas de Micro-organismos da Bahia (CCMB) da UEFS: *Escherichia coli* CCMB 261, *Staphylococcus aureus* CCMB 285 e *Salmonella* sp. CCMB 281. Os meios seletivos utilizados para os respectivos micro-organismos foram ágar Eosina azul de metileno (Acumedia®), ágar Baird Parker (Aquimedia®) e ágar Mac Conkey (Acumedia®). No controle positivo (que exerce efeito inibitório), não ocorre crescimento das bactérias, foi utilizado o antibiótico cloranfenicol (0,8 g) para *Escherichia coli* e *Salmonella* sp e amoxicilina (500 mg) para *Staphylococcus aureus*. Com o intuito de determinar a população microbiana desenvolvida no processo fermentativo de cada bebida, foi realizado a contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e a contagem de leveduras e fungos filamentosos (BRASIL, 2011).

2.5 MÉTODO DA CULTURA MISTA

As culturas dos *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Escherichia coli* CCMB 261 e *Salmonella* sp CCMB 281 ativadas em ágar nutrientes a 35°C/24 h. Após a incubação foi preparada suspensões em solução salina das culturas com turvação equivalente a 0,5 da escala Mc Farland. Foram inoculados 50 µL das suspensões das respectivas culturas em 5mL de cada amostra das bebidas fermentadas (Kombucha, Aluá, Kefir de água e Kefir de leite). As misturas de bactérias enteropatógenicas com as respectivas bebidas, foram acondicionadas no refrigerador por 24h. 10 microlitros de cada

uma destas misturas foram semeadas em placas de Petri, contendo meios seletivos para cada bactéria testada *Staphylococcus aureus* CCMB 285, *Escherichia coli* CCMB 261, *Salmonella* sp CCMB 281, sendo as placas incubadas a 35°C/24h. Na leitura das placas observou-se se houve ou não crescimento das bactérias.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

Bebidas fermentadas podem exercer efeitos benéficos sobre enterobactérias patogênicas que acometem o homem, a partir da ingestão de alimentos contaminados. As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas por agentes etiológicos, especialmente micro-organismos, os quais penetram no organismo humano a partir da ingestão de água e alimentos contaminados (WELKER *et al.*, 2010). A toxinfecção alimentar é um problema de saúde mundial. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, estes três patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp), são responsáveis pela maioria das doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2019). As bebidas fermentadas produzidas neste trabalho (Kombucha, Aluá de abacaxi, Kefir de água e Kefir de leite) podem trazer efeitos benéficos para a saúde humana, entretanto há poucos estudos comprovando tais benefícios nos humanos.

Muitos trabalhos (FIORDA *et al.*, 2016; PURE e PURE, 2016; MARSH *et al.*, 2014; SCARIOT *et al.*, 2018; GAO e LI 2016; LAUREYS *et al.*, 2016; DE ROOS; DE Vuyst, 2018), levam em consideração as propriedades antimicrobianas, a presença de bactérias lácticas, bactérias do ácido acético e seus metabólitos produzidos durante o processo de fermentação, além de relatos de consumidores, pode-se assim, induzir que estas bebidas podem ser caracterizadas com um alto potencial probiótico para a saúde humana. Os probióticos se caracterizam como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde (FAO/WHO, 2002; HILL *et al.*, 2014).

Esses micro-organismos são pertencentes a diferentes gêneros e espécies de bactérias e leveduras, tendo associação a diversos efeitos benéficos (ANVISA, 2019). Estudos mostram que as principais espécies com características probióticas são *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* (SHARMA *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2018). No trabalho de Jayabalan *et al.* (2008), eles relatam a potencial habilidade de eliminação de radicais livres pelo Kombucha preparado a partir de chá verde e preto. Segundo estes pesquisadores os compostos fenólicos, o radical

superóxido, e a atividade de reação com radical DPPH, foram aumentados durante o tempo de fermentação.

O Kefir de leite e Kefir de água também demonstram muitos efeitos benéficos à saúde humana. O caldo fermentativo gerado nestas bebidas possuem uma combinação de bactérias e leveduras em uma matriz simbiótica, e os micro-organismos mais presentes são bactérias como *Lactobacillus* sp. e leveduras. Possuem também um enriquecimento de vitaminas, aminoácidos, dióxido de carbono, acetoina, álcool e óleos essenciais, que vem demonstrando possuir benefícios à saúde (JOHN; DEESEENTHUM, 2015). O Kefir, seja de água ou de leite tem uma longa tradição no consumo humano em especial pelo seus supostos efeitos benéficos à saúde. Esses efeitos estão relacionados as funções probióticas das leveduras e bactérias do ácido lático, além de atividades do exopolissacarídeo Kefiran e peptídeos que são liberados durante produção do Kefir (RODRIGUES *et al.*, 2016).

A pesquisa de Lin *et al.* (2016), demonstrou eficiência no nível de glicemia em ratos obesos a partir de uma dieta suplementada com *Lactobacillus mali* APS 1 isolado dos grãos de Kefir de água. Estudos mostraram que o extrato de Kefir e isolados bacterianos de Kefir tem potencial de reduzir riscos ou interromper o desenvolvimento de tumores cancerígenos *in vitro* ou em modelos animais (RATTRAY; CONNELL, 2011). O Kefir pode estimular respostas imunes na defesa contra patógenos (JOHN; DEESEENTHUM, 2015). Huseini *et al.* (2012), afirmaram que o ácido lático, ácido acético, polissacarídeos e outros produtos presentes no Kefir foram importantes fatores na cicatrização de feridas.

Menezes *et al.*, (2020) avaliaram a atividade antimicrobiana de Kefir fermentado com subproduto de uva contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*, e obtiveram melhor valor de concentração bactericida em extratos em que continham grãos de Kefir, estes foram responsáveis pela produção de mais metabólitos secundários com adição de açúcar mascavo e os extratos apresentaram atividade contra *A. acidoterrestris*. O Kefir é considerado nutricionalmente benéfico, não apenas por possuir um sistema microbiano complexo, mas por inibir muitos patógenos, seja de origem alimentar ou micro-organismos deteriorantes (ADRIANA; SOCACIU, 2008).

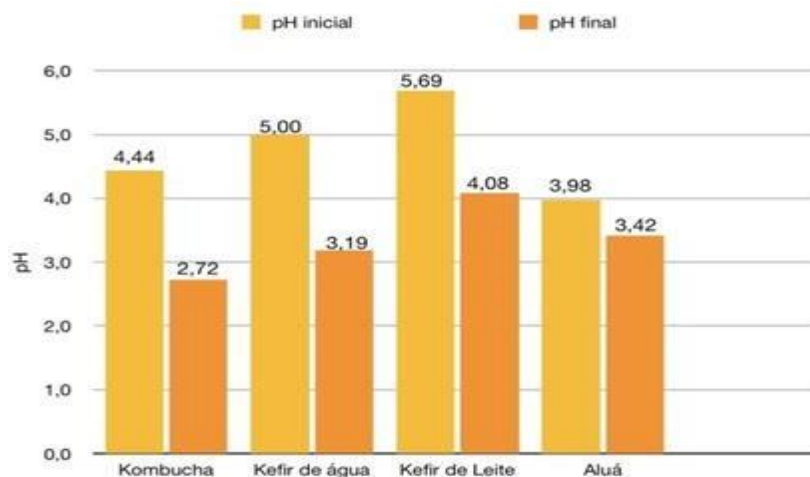
O Aluá, também possui uma microbiota rica em bactérias lácticas e leveduras, sendo considerada uma bebida de forte potencial probiótico. Porém, até o momento não existe trabalhos científicos disponíveis de consulta sobre a população microbiana desta

bebida, exceto o trabalho de Teixeira *et al.* (2017), que isolou do caldo fermentativo, bactérias lácticas dos gêneros *Lactobacillus*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bebidas Kombucha, Aluá, Kefir de água e de Kefir de leite, atingiram pH baixo (Figura 1) no seu tempo máximo de fermentação 7 dias, 48h, 96h e 24h, respectivamente.

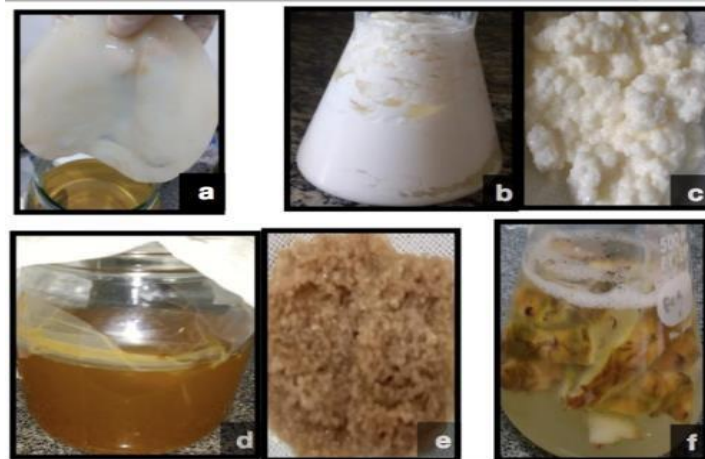
Figura 1: pH inicial e final das bebidas fermentadas.



Fonte: SILVA, S. B. (2019).

Segundo Franco *et al.* (2008) bactérias enteropatogênicas não sobrevivem em pH abaixo de 4, e as bebidas fermentadas em estudo ficaram nesta faixa de pH (Figura 1), sendo decorrente da produção de ácidos orgânicos, o que leva à diminuição do pH do meio (BOSCH, 2006). Substâncias como os ácidos orgânicos, lático e acético que contribuem para o decréscimo do pH, através de diferentes mecanismos podem exercer essa atividade antimicrobiana, como desestabilização da membrana, lise celular, a degradação de ácidos nucleicos e a inibição da síntese proteica (DIAS *et al.*,2018). A figura 2 (a) representa cada bebida no seu tempo máximo de fermentação.

Figura 2. (a) Kombucha; (b) Kefir de leite; (c) Grãos de Kefir de leite; (d) Kefir de água ;(e) Grãos de Kefir de água. (f) Aluá de abacaxi.



Fonte: SILVA, S. B. (2019).

Na bebida Kombucha ocorre predominância de diferentes espécies de leveduras (COTON *et al.*, 2017). Watawana *et al.* (2016), relataram *Zygosaccharomyces* sendo a levedura predominante com 84,1% da porcentagem relativa de abundância. No SCOBY também ocorre crescimento de bactérias, predominando as bactérias do ácido acético (VILLARREAL-SOTO *et al.*, 2018). Muitas bactérias do ácido acético estão presentes no SCOBY, incluído: *Acetobacter xylinoides*, *Bacterium gluconicum*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pasteurianus* e *Gluconobacter oxydans* (JAYABALAN *et al.*, 2014).

Na figura 2 (b e c) observa-se o Kefir de leite no seu tempo máximo de fermentação, em que também se observa a multiplicação dos seus grãos. A sua composição química é constituída por uma matriz inerte composta de lípidios, proteínas, polissacarídeo solúvel e o complexo Kefiran (GAO; LI, 2016). No Kefir de água (Figura 2 (d e e)) em seu tempo máximo de fermentação também apresenta grãos de Kefir de água, são bem semelhantes aos grãos do Kefir de leite em termos de estrutura, micro-organismos associados e os produtos formados durante o processo de fermentação (FIORDA *et al.*, 2017).

O Aluá de abacaxi (Figura 2 (f)), durante o processo de fermentação, foi obtido uma média do pH final de 3,42 em 48h na temperatura ambiente (média 30°C). Teixeira *et al.* (2017), isolaram bactérias lácticas do caldo fermentativo do Aluá (*Lactobacillus plantarum* U205; *Lactobacillus plantarum* ABX 3 e *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1 ABX 5.2) em diferentes tipos de sistema de incubação. Na fermentação espontânea obteve o pH final 4,0, já nas fermentações controladas dentre os ensaios de 2,67 a 3,99.

No teste de difusão em disco não foi obtido resultados de inibição em nenhuma das bebidas fermentadas. Isso pode ser explicado pelo fato do caldo fermentativo de todas elas não serem uma substância pura, sendo constituída por várias moléculas complexas de difícil difusão do meio. Já no teste de cultura mista (também denominada de co-cultivo) foi possível obter resultados de inibição. De acordo com Mamédio (2017) o método de cultura mista mostrou-se eficaz quanto à avaliação da capacidade inibitória de bactérias lácticas frente ao fungo *Fusarium guttiforme*.

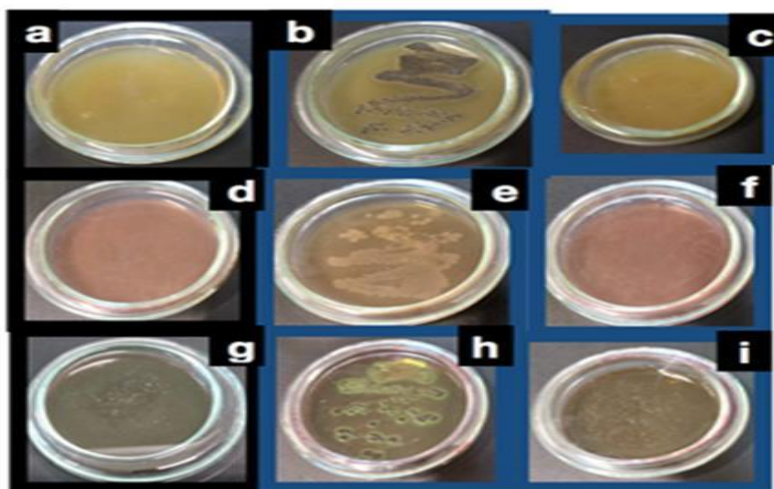
No presente trabalho, este método de cultura mista teve resultados efetivos na inibição dos enteropatógenos, mas apresentando resultados variáveis, a depender da bebida fermentada (Tabela 1). No Kombucha, como se pode observar na Tabela 1 e ilustrada na figura 3, houve efeito inibitório frente aos três patógenos testados (*Escherichia coli* CCMB 261, *Staphylococcus aureus* CCMB 285 e *Salmonella sp.* CCMB 281).

Tabela 1: Inibição das bebidas fermentadas a partir da técnica de cultura mista. O teste foi realizado em triplicata, com duas repetições (+ com efeito inibitório; - sem efeito inibitório; +* efeito inibitório parcial) ¹ antibiótico; ² crescimento bacteriano dos enteropatógenos.

Bebidas fermentadas	<i>S. aureus</i>		<i>Salmonella sp.</i>		<i>E. coli</i>	
Kombucha	+	+	+	+	+	+
Kefir de água	+*	+*	-	+*	+	-
Kefir de leite	-	-	+	+	-	+
Aluá de abacaxi	-	-	+	+	++	
¹ Controle positivo	+	+	+	+	+	+
² Controle negativo	-	-	-	-	-	-

Fonte: SILVA, S. B. (2019).

Figura 3. Placas de ensaios de antagonismo do caldo fermentativo da Kombucha utilizando o método da cultura mista. (a) *Staphylococcus aureus*; (d) *Salmonella sp.*; (g) *E.coli*; (b), (e) e (h) controle negativo dos três enteropatógenos; (c), (f) e (i) controle positivo.



Fonte: SILVA, S. B. (2019).

No Kefir de água houve variações nos resultados apresentando inibição parcial dos *Staphylococcus aureus* CCMB 285 (Tabela 1), quando comparado com o controle positivo.

No Kefir de leite e Aluá (Tabela 1) não houve inibição dos *Staphylococcus aureus* CCMB 285, mas houve inibição da *Salmonella* sp CCMB 28. Porém, no Kefir de água ocorreu inibição parcial deste patógeno, tendo em vista o crescimento de algumas colônias suspeitas deste patógeno.

Com relação a *Escherichia coli* CCMB 261, as bebidas Kefir de leite, Aluá e Kefir de água houve indicativo de que este patógeno teve inibição total em pelo menos uma das repetições (Tabela 1). O efeito inibitório do caldo fermentativo das bebidas fermentadas em estudo perante os patógenos, sugere ser atribuído aos metabólitos produzidos no processo de fermentação a partir dos micro-organismos presentes na bebida.

Pesquisas realizadas por Santos Jr *et al.* (2009), sobre a atividade antimicrobiana do caldo fermentado com colônias de Kombucha, mostraram eficiência contra *Microsporum canis*(828), *Escherichia coli* (CCT-0355) e *Salmonella typhi* (CCT-1511). Kumar e Joshi (2016) destacam que as bactérias e leveduras do Kombucha podem produzir moléculas de defesa antimicrobianas e atribuem ao teor de ácido acético responsável pela atividade antimicrobiana contra uma variedade de bactérias.

Sreeramulu *et al.* (2000), apontam a atividade antimicrobiana do Kombucha contra vários micro-organismos patogênicos considerados sensíveis ao chá Kombucha, inclusive o *Helicobacter pylori* e a *Listeria monocytogenes*. O ácido acético gerado no processo fermentativo, sugere ser o responsável pelo efeito inibitório. Battikh *et al.* (2012) relataram o potencial antimicrobiano do Kombucha preparado com chá verde e preto, contra micro-organismos patogênicos humanos, a Kombucha preparada com chá verde exibiu maior potencial antimicrobiano.

A atividade antimicrobiana obtida na bebida Kefir de água frente às enterobactérias (*Escherichia coli* CCMB 261, *Staphylococcus aureus* CCMB 285 e *Salmonella* sp. CCMB 281), podem ser demonstradas por alguns autores que realizaram testes com isolados desta bebida. Laureys e De Vuyst (2014) abordam a diversidade de espécies microbianas e a produção de metabólitos do Kefir de água, em um período de fermentação de 192h. A atividade antimicrobiana do Kefir de água tem sido eficiente contra muitas espécies de micro-organismos patogênicos, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphyrumium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus*

pyogenes, *S. salivarius*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans* (GOLOWCZY *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2005; FIORDA *et al.*, 2017).

O Kefir de leite também possui um efeito antibacteriano contra muitos organismos patogênicos, graças à formação de ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, acetaldeído, dióxido de carbono e bacteriocinas, o peróxido de hidrogênio é um metabólito produzido por algumas bactérias com composto antimicrobiano (JOHN; DEESEENTHUM, 2015).

Tanto o Kefir, quanto o Kefiran foram relatados pela significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram- negativas e Gram- positivas, bem como leveduras, *Candida albicans* (JOHN; DEESEENTHUM, 2015; RAHIMZADEH *et al.*, 2015). Dias *et al.* (2012) avaliaram a sobrevivência de bactérias patogênicas (*Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*) na fermentação do Kefir produzido de forma artesanal. Este estudo mostrou que a fermentação do leite causada pelos micro-organismos presentes nos grãos geraram um ambiente desfavorável às bactérias testadas, estas não foram recuperadas após 24 horas de fermentação do Kefir. A ação antimicrobiana do Kefir frente a micro-organismos Gram-negativos demonstrou a inatividade de *Salmonella* após 60 minutos de exposição (DIAS *et al.*, 2016).

Teixeira *et al.* (2017) apontam a eficácia da fermentação espontânea do Aluá, por obter bactérias como *Lactobacillus plantarum* e o *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 1, possuindo características probióticas e por apresentar uma boa capacidade de crescimento durante a fermentação. No trabalho de Mamédio (2017), foi realizado testes de antagonismo utilizando dois isolados de bactérias lácticas (ABX3 *Lactobacillus plantarum* e ABX5 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*), provenientes do caldo fermentativo do Aluá, contra colônias isoladas de *Fusarium guttiforme* de amostras de abacaxi. As bactérias lácticas isoladas do Aluá (ABX3 e ABX5) obtiveram efeito inibitório e fungicida frente a *F. guttiforme*.

4.1 CONTAGEM TOTAL DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS AERÓBIAS MESÓFILAS E LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS

A Kombucha entre todas as bebidas produzidas neste trabalho foi a que apresentou menor número de micro-organismos ($3,85 \times 10^3$ UFV/mL). Em bebidas fermentadas é normal ter concentração elevada de bactérias fermentativas. Como o Kombucha no processo fermentativo chegou a um pH abaixo de 3,0, muitas células se auto destruíram em função da baixa acidez. Já nas outras bebidas o número de bactérias estão elevados (Tabela 2), podendo até estar em uma contagem subestimada.

Nas bebidas fermentadas por fermentação espontânea, o número de colônias de fungos, principalmente as leveduras (predominância em todas as bebidas) também apresentou níveis elevados.

Tabela 2: Média dos resultados obtidos nas análises de micro-organismos mesófilos aeróbios nas bebidas fermentadas e contagem de leveduras e fungos filamentosos.

Bebida	Bactérias Mesófilas (UFC/mL)	Leveduras e Fungos filamentosos (UFC/mL)
Kombucha	$3,85 \times 10^3$	$3,85 \times 10^6$
Kefir de água	$4,2 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$
Kefir de leite	$8,0 \times 10^8$	$1,05 \times 10^6$
Aluá de abacaxi	$1,79 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho as bebidas fermentadas Kombucha, Aluá, Kefir de água e Kefir de leite, mostraram eficiência para inibir total ou parcial os enteropatógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella sp.* Representando um grande aliado na prevenção e terapia de doenças transmitidas por alimentos, inferindo serem produtos de grande potencial probiótico.

REFERÊNCIAS

- ADRIANA, P.; SOCACIU, C. Probiotic activity of mixed cultures of kefir's lactobacilli and non-lactose fermenting yeasts. **Bulletin UASVM, Agriculture**, v. 65, n. 2, p. 1843, 2008.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para instrução processual de petição de avaliação de probióticos para uso em alimentos. **ALIMENTOS - GUIA nº 21/2019, versão 1**, 2019. Disponível em: <https://alimentosconsultoria.com.br/guia-para-instrucao-processual-de-peticao-de-avaliacao-de-probioticos-para-uso-em-alimentos/>. Acesso em: 10 de Dez. 2019.
- ARIHARA, K. Alimentos funcionais. **Encyclopedia of Meat Sciences**. 2014. 32-36 p.
- BATTIKH, H.; BAKHROUF, A.; AMMAR, E. Antimicrobial effect of Kombucha analogues. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 1, pág. 71–77, 2012.
- BOSCH, A. *et al.* 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.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 20 de setembro de 2011. **Diário Oficial da União**, 30 dez. 2011. Seção 1, p.6.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Doenças transmitidas por alimentos: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/doencas-transmitidas-por-alimentos>. Acesso em: 11 de nov. 2019.
- COTON, M. *et al.* Unraveling microbial ecology of industrial-scale Kombucha fermentations by metabarcoding and culture-based methods. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n.5, p. 1-16, 2017.
- DE ROOS, J.; DE Vuyst, L. Acetic acid bacteria in fermented foods and beverages. **Current opinion in biotechnology**, v. 49, p. 115-119, 2018.
- DIAS, P. A.; SILVA, D. T.; TIMM, C. D. Atividade antimicrobiana de micro-organismos isolados de grãos de kefir. **Ciência Animal Brasileira**, v. 19, n. 0, 2018.
- DIAS, P. A. *et al.* Propriedades antimicrobianas do kefir. **Arq. Inst. Biol**, v.83, p.1-5 e0762013, 2016.
- DIAS, P.A. *et al.* Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 182-6, 2012.
- FERREIRA, C.L.L.F. Tecnologia de produtos lácteos fermentados - **Aspectos bioquímicos e tecnológicos**, 2ª. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2001. 112 p. (Cadernos Didáticos, 43).
- FIORDA, F. A. *et al.* Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT- Food Science and Technology**, v. 68, p.690-607, 2016.

- FIORDA, F. A. *et al.* Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017.
- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.
- GAO, X.; LI, B. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n.1, p. 1272152, 2016.
- GOLOWCZYC, M. A. *et al.* Protective action of Lactobacillus kefir carrying S-layer protein against Salmonella enterica serovar Enteritidis. **International journal of food microbiology**, v. 118, n. 3, p. 264-273, 2007.
- HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506, 2014.
- HUSEINI, H.F. *et al.* Evaluation of wound healing activities of kefir products. **Burns**.v. 38, n.5, p. 719-723, 2012.
- JAYABALAN, R. *et al.* Changes in free-radical scavenging ability of kombucha tea during fermentation. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 227-234, 2008.
- JAYABALAN, R. *et al.* A review on Kombucha tea- microbiology, composition, fermentation, beneficial effects, toxicity, and tea fungus. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n.4, p. 538-550, 2014.
- JOHN, S. M.; DEESEENTHUM, S. Properties and benefits of kefir- A review. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 37, n.3, p. 275-282, 2015.
- JOINT, F.A.O. WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. **London, Ontario, Canada**, v. 30, 2002.
- KUMAR, V.; JOSHI, V.K. Kombucha: Technology, microbiology, production, composition and therapeutic value. **Intl. J. Food. Ferment. Technol.** v.6, n.1, p.13-24, 2016.
- LABORCLIN. **Manual para antibiograma: Difusão em disco (Kirby e Bauer)**. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Rev.: 05, 29p, 04/2011. Disponível em: https://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf.
- LAUREYS, D.; VUYST, L. D. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water kefir fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v.80, n.8, p. 2564 -2572. 2014.
- LAUREYS, D. *et al.* Bifidobacterium aquikefiri sp. nov., isolated from water kefir. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 3, p. 1281-1286, 2016.

LIN, Y. C. *et al.* Effect of lactobacillus mali APS1 and L. kefiranofaciens M1 on obesity and glucose homeostasis in diet-induced obese mice. **Journal of functional foods**, v. 23, p. 580–589, 2016.

MAMÉDIO, I. M. P. **Atividade antifúngica de cepas de bactérias lácticas e extratos de casca e coroa de abacaxi sobre *fusarium guttiforme* Nirenberg & O'Donnell.** Dissertação (mestrado- Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais), Universidade Estadual de Feira de Santana, 2017.

MARSH, A. J. *et al.* Sequence-based analysis of the bacterial and fungal compositions of multiple kombucha (tea fungus) samples. **Food microbiology**, v. 38, p. 171-178, 2014.

MENEZES, J. L. *et al.* Atividade antimicrobiana de kefir fermentado com subproduto de uva contra *Alicyclobacillus acidoterrestris*/Antimicrobial activity of fermented kefir with a byproduct. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 9900-9911, 2020.

MOURA, A. B. **Monitoramento do processo fermentativo da kombucha de chá mate.** Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Pernambuco, Centro acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, 2019.

OLIVEIRA, E. A. M. *et al.* Contagem de bactérias lácticas viáveis em leites fermentados. **Revista Univap**, v. 24, n. 46, p. 94-104, 2018.

PURE, A. E.; PURE, M. E. Antioxidant and antibacterial activity of kombucha beverages prepared using banana peel, common nettles and black tea infusions. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 125-130, 2016.

RAHIMZADEH, G. *et al.* Evaluation of anti-microbial activity and wound healing of kefir. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. p. 286-293, 2015.

RATTRAY, F.P.; CONNELL, M.J. Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J.W. **Encyclopedia of Dairy Sciences** 2. ed. San Diego: Academic Press, USA, 2011. 518-524 p.

RODRIGUES, K. L. *et al.* Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404- 408, 2005.

RODRIGUES, K. L. *et al.* A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 58-69, 2016.

SANTOS, F. L. *et al.* Kefir: Uma nova fonte alimentar funcional. **Diálogos & Ciência. Online. Disponível em <http://www.dialogos.ftc.br>. Acesso em, 25 de out. 2019, v. 27, 2012.**

SANTOS JR, R. J. *et al.* Antimicrobial activity of broth fermented with kombucha colonies. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 1, n. 1, p. 72- 8, 2009.

SCARIOT, M. C. *et al.* Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International journal of food microbiology**, v. 264, p. 1-7, 2018.

SHARMA, C. *et al.* Antibacterial effects of Lactobacillus isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 30-31, 2017.

SREERAMULU, G.; ZHU, Y.; KNOL, W. Kombucha fermentation and its antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2589-2594, 2000.

TEIXEIRA, A. P. *et al.* Desenvolvimento de uma bebida semelhante ao Aluá, com fermentação controlada, utilizando bactérias ácido-láticas isoladas da fermentação espontânea da casca do abacaxi. **Higiene Alimentar**, v. 31, p. 3265-2369, 2017.

VILLARREAL-SOTO, S. A. *et al.* Understanding kombucha tea fermentation: A review. **Journal of food Science**, v. 83, n.3, p. 580-588, 2018.

WATAWANA, M. I. *et al.* Enhancement of the antioxidant and starch hydrolase inhibitory activities of king coconut water (*Cocos nucifera* var. *aurantiaca*) by fermentation with kombucha 'tea fungus'. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 2, p. 490-498, 2016.

WELKER, C. A. D. *et al.* Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de Biociências**, v. 8, n. 1, 2010