

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS ISOLADAS DE KEFIR

SILVANA DE SOUZA SIGALI¹; JÚLIA SILVA PERES²; JOICE DA SILVA RAMSON³; GABRIELA SOARES MARTIN⁴; GRACIELA VOLZ LOPES⁵; ÂNGELA MARIA FIORENTINI⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – silvanasigali@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – juliasperes@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – joice.zootecniaufpel@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – gabrielaamartin@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – angefiore@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido-láticas (BAL), caracterizadas como Gram-positivas, não formadoras de esporos e com morfologia cocóide ou bacilar, desempenham um papel fundamental na fermentação de alimentos e na elaboração de produtos com potencial probiótico (JHAMB; SWAMINATHAN, 2023).

Dentre as matrizes alimentares, as BAL fazem parte da composição dos grãos de kefir. Esses são compostos por uma complexa associação de bactérias (BAL e acéticas) e leveduras, envoltos por exopolissacarídeos, denominado kefiran (MAUGHAN *et al.*; 2025). A partir dos grãos é obtido um leite fermentado com características ácido-alcoólicas, ou seja, o produto da fermentação é predominantemente ácido láctico e pequenas quantidades de álcool (ATES; ZEREN; KUÇUKÇETIN, 2025). O consumo desse produto, devido a associação dos microrganismos que podem apresentar potencial probiótico, está relacionado com importantes efeitos benéficos à saúde como: efeitos anticancerígenos, antimicrobianos, antioxidantes, melhora da digestão da lactose e equilíbrio da microbiota intestinal (AZIZI *et al.*, 2021). Além disso, o sinergismo entre os microrganismos presentes nos grãos possibilita a produção de vitaminas, fatores de crescimento e aminoácidos que favorecem o desenvolvimento das BAL (MAUGHAN *et al.*, 2025).

Uma das vantagens do kefir ser utilizado como matriz para isolamento de bactérias é que apesar de ser um alimento seguro e de baixo custo, é fácil de ser produzido de forma artesanal (ROSA *et al.*, 2022). Além disso, o kefir se encaixa na crescente demanda do consumidor por alimentos, minimamente processados e benéficos à saúde (MAUGHAN *et al.*, 2025).

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas promovem ação benéfica à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; HILL *et al.*, 2014). No entanto, para um microrganismo ser considerado probiótico, este deve se manter viável, após a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como possuir a capacidade de multiplicação e adesão às células da mucosa intestinal no hospedeiro (SIDIRA *et al.*, 2015).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial probiótico de bactérias ácido-láticas isolados de kefir, através dos testes de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade.

2. METODOLOGIA

Para a avaliação da capacidade de coagregação, autoagregação e hidrofobicidade foram utilizados oito (8) isolados de bactérias ácido-láticas procedentes de kefir, identificados em estudos anteriores, sendo: um isolado

Pediococcus pentosaceus (KPP1) e sete isolados *Leuconostoc mesenteroides* (KLM1, KLM2, KLM3, KLM4, KLM5, KLM6 e KLM7). Os isolados foram cultivados em caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) por 24 horas a 37 °C, para a obtenção de um cultivo ativo para a realização dos testes.

A metodologia descrita por Collado, Meriluoto e Salminen (2008) foi empregada para avaliar a capacidade de autoagregação e coagregação, com os resultados expressos em percentual, com base em leituras obtidas em espectrofotômetro a 600 nm, conforme a equação: $[1 - (A_{600nm} \text{ da suspensão inicial} / A_{600nm} \text{ da suspensão final}) \times 100]$. A leitura dos resultados para autoagregação foram realizadas nos tempos 0h, 2h, 4h, 20h e 24h. Para coagregação, as leituras foram realizadas nos tempos 0h, 2h, 4h e 24h e *Escherichia coli* ATCC 8739 foi utilizada no teste de coagregação. Os resultados foram expressos em percentual, conforme $[(A_{pat} + A_{isol})/2 - (A_{mix})/(A_{pat} + A_{isol})/2] \times 100$, onde A_{pat} e A_{isol} representam a absorbância das suspensões em separado para cada bactéria, em tubos controle e A_{mix} representa a absorbância das suspensões celulares de ambas as bactérias misturadas, nos diferentes tempos (0h e 24h). A avaliação da hidrofobicidade da superfície celular foi medida pela sua afinidade ao solvente orgânico xileno seguindo o método proposto por Vinderola e Reinheimer (2003). Os resultados foram expressos em percentual de adesão após leituras nos tempos 0h e 2h em espectrofotômetro a 600 nm, conforme $[(A_0 - A)/A] \times 100$, onde A_0 e A são as absorbâncias antes e depois da extração com xileno, respectivamente. Todas as leituras foram realizadas em duplicata, para cada um dos testes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os dados na tabela 1, observa-se que o isolado KPP1 apresentou maior percentual de autoagregação durante todos os tempos, chegando a $58 \pm 0,02\%$ em 20h; seguido de KLM6 que atingiu seu valor máximo de $54,55 \pm 0,01\%$ em 24h.

Tabela 1- Percentual (%) de autoagregação, coagregação e hidrofobicidade dos isolados de bactérias ácido-láticas procedentes de kefir

Isolados	Autoagregação (%)			Coagregação (%)			Hidrofobicidade (%)
	2 h	20 h	24 h	2 h	4 h	24 h	2 h
KLM1	$8,0 \pm 0,02\%^a$	$8,0 \pm 0,01\%^a$	$9,6 \pm 0,01\%^b$	$21,43 \pm 0,05\%^a$	$37,14 \pm 0,1\%^b$	$56,67 \pm 0,01\%^c$	$44,42 \pm 0,02\%$
KLM2	$47,06 \pm 0,00\%^a$	$47,90 \pm 0,01\%^b$	$24,37 \pm 0,01\%^c$	$16,18 \pm 0,03\%^a$	$53,22 \pm 0,01\%^b$	$62,18 \pm 0,02\%^c$	$10,35 \pm 0,01\%$
KLM3	$14,81 \pm 0,02\%^a$	$13,33 \pm 0,04\%^b$	$16,30 \pm 0,03\%^c$	$38,81 \pm 0,03\%^a$	$43,84 \pm 0,06\%^b$	$55,71 \pm 0,01\%^c$	$56,08 \pm 0,03\%$
KLM4	$7,81 \pm 0,03\%^a$	$25 \pm 0,03\%^b$	$25,78 \pm 0,03\%^c$	$53,62 \pm 0,01\%^a$	$52,77 \pm 0,02\%^b$	$60,00 \pm 0,07\%^c$	$36,5 \pm 0,00\%$
KLM5	$25,40 \pm 0,01\%^a$	$26,98 \pm 0,07\%^b$	$30,95 \pm 0,06\%^c$	$39,71 \pm 0,01\%^a$	$43,14 \pm 0,03\%^b$	$45,59 \pm 0,01\%^c$	$23,78 \pm 0,03\%$
KLM6	$30,30 \pm 0,02\%^a$	$47,73 \pm 0,02\%^b$	$54,55 \pm 0,01\%^c$	$54,10 \pm 0,1\%^a$	$54,51 \pm 0,02\%^b$	$62,70 \pm 0,05\%^c$	$28,75 \pm 0,02\%$
KLM7	$22,83 \pm 0,03\%^a$	$21,65 \pm 0,06\%^b$	$20,47 \pm 0,33\%^c$	$37,31 \pm 0,02\%^a$	$17,91 \pm 0,25\%^b$	$65,30 \pm 0,03\%^c$	$43,61 \pm 0,01\%$
KPP1	$48,67 \pm 0,07\%^a$	$58 \pm 0,02\%^b$	$57,33 \pm 0,01\%^c$	$65,07 \pm 0,01\%^a$	$65,81 \pm 0,02\%^b$	$69,85 \pm 0,1\%^c$	$18,37 \pm 0,02\%$

Valores expressos em média e desvio padrão.

Letras minúsculas diferentes na mesma linha para o mesmo teste indicam diferença significativa.

Pediococcus pentosaceus (KPP1); *Leuconostoc mesenteroides* (KLM1, KLM2, KLM3, KLM4, KLM5, KLM6 e KLM7).

Resultados diferem do estudo em que foi isolado *L. mesenteroides* K1 de Kepel (alimento tradicional da Indonésia), onde a capacidade de autoagregação de K1 atingiu o percentual de $98,36 \pm 1,84\%$, um valor muito elevado quando comparado aos resultados obtidos com isolados de kefir (LEKSONO, PURWIJANTININGSIH, E WIBISONO, 2024).

No teste de coagregação, todos os isolados apresentaram aumento na coagregação ao patógeno *E. coli* ATCC 8739 ao longo do tempo, principalmente o isolado KPP1 que em 24h atingiu $69,85 \pm 0,1\%$, seguido de KLM7 com $65,30 \pm 0,03\%$ também em 24h. Ouili *et al.* (2025) mostraram que o isolado *P. pentosaceus* 67A9 apresentou uma capacidade de coagregação ao patógeno *E. coli* de $81,79 \pm 1,75\%$, um valor elevado quando comparado aos isolados de kefir. Diferindo dos resultados citados, García-Cayuela *et al.* (2014) avaliaram a capacidade de coagregação entre *L. plantarum* a *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, e observaram coagregação menor que 40% para todos os patógenos, após 24 horas.

Em relação a hidrofobicidade, a adesão a um hidrocarboneto, simula a forma com que a bactéria se ligaria às células epiteliais do hospedeiro. O destaque foi para KLM3 ($56,08 \pm 0,03\%$ em 2h) e KLM1 ($44,42 \pm 0,02\%$ em 2h), porém houve resultados baixos como o apresentado por KLM2 ($10,35 \pm 0,01\%$ em 2h). No estudo de Leksono, Purwijantiningasih e Wibisono, (2024), o isolado *L. mesenteroides* K1 apresentou uma hidrofobicidade de $6,94 \pm 3,67$, um valor considerado baixo quando comparado com o menor resultado obtido com os isolados de kefir.

A alta capacidade de autoagregação aumenta a adesão do probiótico às bactérias da mesma linhagem e às células epiteliais intestinais e a hidrofobicidade é a capacidade de aderência e persistência da cepa probiótica na cavidade intestinal, sendo ambas as características essenciais para uma funcionalidade probiótica eficaz (ASCANTA *et al.*, 2025). Além disso, a coagregação contra patógenos é um fator fundamental na determinação do potencial probiótico dos isolados de BAL (LEKSONO, PURWIJANTININGSIH E WIBISONO, 2024).

Com estas propriedades muitos dos isolados de BAL avaliados podem propiciar benefícios à saúde e prevenir a colonização de patógenos transmitidos por alimentos. No entanto, constata-se diferenças na capacidade entre os isolados, inclusive da mesma espécie, o que reforça o entendimento de que a capacidade de agregação por ser mediada por estruturas de superfície bacteriana a expressão dessas estruturas pode variar entre diferentes cepas (MONTEAGUDO-MERA *et al.*, 2019).

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que frente aos testes avaliados, os isolados demonstraram potencial probiótico, pois na avaliação tanto da capacidade de coagregação, autoagregação e hidrofobicidade foram observados valores satisfatórios, com destaque para *P. pentosaceus* KPP1 nos testes de autoagregação e coagregação e *L. mesenteroides* KLM3 no teste de hidrofobicidade. Para confirmar o potencial probiótico dos isolados de kefir, testes adicionais são necessários, como avaliar a capacidade de sobrevivem ao trânsito gastrointestinal.

Os autores agradecem o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of United Nations; World Health Organization. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

GARCÍA-CAYUELA, T., KORANY, A. M., BUSTOS, I., P. GÓMEZ DE CADIÑANOS, L., REQUENA, T., PELÁEZ, C., & MARTINEZ-CUESTA, M. C. (2014). Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, 57, 44–50.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.** 11, 506–514, 2014.

MONTEAGUDO-MERA, A., RASTALL, R.A., GIBSON, G.R. *et al.* Mecanismos de adesão mediados por probióticos e prebióticos e seu potencial impacto na saúde humana. **Appl Microbiol Biotechnol**/103, 6463–6472 (2019).

SIDIRA, M., KANDYLIS, P., KANELAKI, M., & KOURKOUTAS, Y. Effect of immobilized *Lactobacillus casei* on volatile compounds of heat treated probiotic dry-fermented sausages. **Food Chemistry**, 178, 201-207, 2015.

COLLADO, M. C.; MERILUOTO, J.; SALMINEN, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. **European Food Research and Technology**, vol.226, no.5, p.1065-1073, 2007.

AZIZI, N. F.; KUMAR, M. R.; YEAP, S. K.; ABDULLAH, J. O.; KHALID, M.; OMAR, A. R.; OSMAN, M. A.; MORTADZA, S. A. S.; ALITHEEN, N. B. Kefir and its biological activities. **Foods**, vol.10, 2021.

JHAMB, V., SWAMINATHAN, P. Role and importance of lactic acid bacteria in different Indian fermented foods. **Biologia**, p.3609-3623, 2023

LEKSONO, B.; PURWIJANTININGSIH, E.; WIBISONO, G. I. B. Cell surface and adherence properties of Indonesian indigenous lactic acid bacteria as probiotic candidate. **Biota : Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati**, p.1-11, 2024

OUILI, A. S.; OUATTARA, A.; MOGMENGA, I.; CAMPAORÉ, C. O. T.; MAIGA, Y.; NIKIEMA, M.; OUATTARA, A. S. In vitro screening for potential probiotic properties of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from fermented Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L.) grains: A legume native to West Afric. **The microbe**, 2025.

MAUGHAN, L.; KOOLMAN, L.; MACORI, G.; KILLIAN, C.; FANNING, S.; WHYTE, P.; BOLTON, D. Characterization of bacterial and fungal populations in retail kefir in Ireland. **American Dairy Science Association**. p.8187-8204, 2025

ASCANTA, P.; HANGANU, A.; MARINAS, I. C.; HIDALGO, J.; GRADISTEANU-PIRCALABIORU, G.; CHIFIRIUC, M. C.; TENEA, G. N. Probiotic potential and exopolysaccharide characterization of two native lactic acid bacteria for functional applications. **Food Bioscience**, 2025.

ROSA, D. D.; DIAS M. M. S.; GRESKOWIAK, L. M.; REIS, S. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; PELUZIO, M. C. G. Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutr Res Rev**. p.82-96, 2025.

ATES, F. Ö.; ZEREN, F. E.; KÜÇÜKÇETIN, A. Effects of changes in homogenisation sequence and stage for sheep mil on physicochemical and microbiological properties and consumer acceptance of kefir. **Small Ruminant Research**. 2025.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, vol. 36, no. 9-10, p.895-904, 2003.