

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

MEIRE DOS SANTOS FALCÃO DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DO
LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR

Recife
2018

MEIRE DOS SANTOS FALCÃO DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DO
LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutora.
Orientadora: Prof. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo
Porto

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Maria Taciana
Cavalcanti Vieira Soares

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Lima, Meire dos Santos Falcão de

Caracterização microbiológica, bioquímica e funcional do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir/ Meire dos Santos Falcão de Lima- 2018.

145 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Leite 2. Probióticos 3. Kefir I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (orient.) II. Soares, Maria Taciana Cavalcanti Vieira (coorient.) III. Título

637

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-126

MEIRE DOS SANTOS FALCÃO DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA, BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DO
LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Biologia Aplicada à Saúde, da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutora em
Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 08/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares (Co-orientadora)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da
Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMFA – UFRPE)

Prof. Dr. Attilio Converti
Departamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental,
Polo de Engenharia Química da Universidade de Gênova (UNINGE)

Prof. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Departamento de Nutrição / Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco (CCS – UFPE)

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho
Departamento de Biologia da
Universidade Federal Rural de Pernambuco (DB- UFRPE)

Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco (DMFA – UFRPE)

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais José Bezerra (in memoriam) e Iracema, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade e persistência”.

AGRADECIMENTOS

A experiência vivida junto a minha mãe (Iracema), meu pai (José Bezerra) e minha irmã (Meive). “Não fez mais do que a sua obrigação” foi a frase que mais escutei durante minha infância..., ela era dita logo após eu chegar feliz em casa dizendo: mainha passei nas matérias por média... Para algumas pessoas isso pode ser ruim, mas para mim serviu para sempre me fortalecer e eu sempre colocar metas maiores em meu caminho, e ser melhor a cada dia. Isso me fez acreditar que posso sim conseguir alcançar meus sonhos. “Minha filha não estude para ser uma aluna mediana, estude para sempre estar entre os primeiros da sala de aula” essa frase escutei durante minha juventude, a mesma foi dita pelo meu pai. Ele sempre acreditou em mim, sempre falava do orgulho que eu era para ele – a menina de ouro dele –, mesmo não estando presente fisicamente desde novembro de 2009, ele está presente e me fortalecendo em todos os dias de minha vida. O exemplo e força e garra da minha irmã também é uma grande inspiração para mim. Mesmo tendo sido mãe jovem e ter sido muito julgada pela sociedade, ela nunca baixou a cabeça para ninguém. Ela acorda cedo e luta todos os dias pelos seus objetivos: ter uma vida tranquila e com meus sobrinhos (Fábio e Flávia).

Um agradecimento especial é para as minhas orientadoras Ana Porto e Taciana, que vem me acompanhando desde o mestrado e que me auxiliaram nas correções e me forneceram condições para a execução do presente estudo. A professora Taciana também agradeço pelas reuniões que serviram para os ajustes dos métodos realizados aqui, além das cobranças e questionamentos e pela amizade.

A CAPES pelo financiamento da Bolsa de Estudos.

Agradeço ao pai da professora Taciana, o Sr. Tércio Holanda Cavalcanti Filho, que muitas vezes viajou e acordou bem cedo para retirar pacientemente o leite das ovelhas, utilizado neste estudo, e a Paulina Maria Santos de Albuquerque que doou os grãos de Kefir para a Profª Taciana e assim este trabalho pode ser realizado.

Para a realização deste estudo, fui a um curso sobre microrganismos probióticos na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp e lá tive a oportunidade de tirar algumas dúvidas sobre a condução deste projeto com o Prof. Dr. Gabriel Vinderola, e graças a isto pude reconduzir o estudo e assim obter os resultados aqui presentes.

Ao professor Joaquim Evêncio Neto que cedeu equipamentos, e a Técnica Maria Edna Barros, pessoa paciente e de ótima convivência, ajudou nas fotografias histológicas, e com o MEV do Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE (Cenapesq) durante o curso de manipulação que fizemos. A Julia Campos que me ajudou com as análises por Maldi-ToF, realizadas lá no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE. A Wendell que me ajudou na correção e submissão do primeiro artigo. Agradeço a Karoline Souza, aluna de Iniciação Científica que vem me ajudando na realização das atividades, vem conduzindo um belo trabalho e amadurecendo muito na pesquisa científica, me ajudou na execução do primeiro capítulo e foi fundamental condução do terceiro capítulo.

Aos professores convidados para esta banca de Tese de doutorado. Professor José Vitor Moreira Lima Filho que me ajudou bastante nas correções da Qualificação, e também admiro muito por ser esta pessoa tão inteligente e

comprometida. A professora Tânia Stamford por acreditar, confiar, e sempre com sua alegria dar bons conselhos. Agradeço muito a senhora por ter me apresentado a pesquisa na área de Nutrição, a qual estou afetivamente envolvida. Ao professor Atílio Converte que já contribuiu substancialmente na qualificação, admiro demais o senhor e a sua pesquisa, parabéns pela competência, inteligência e criticidade. Ao Romero que é a ciência em pessoa, quando se fala de enzimas, caracterização ou ensaios proteômicos, parabéns por sua competência e amor à ciência, agradeço demais pela ajuda na resolução das dúvidas que tinha ao conduzir os estudos do terceiro capítulo. Ao professor Luiz de Carvalho sou grata a tantos ensinamentos científicos e humanos, com certeza o senhor é uma pessoa iluminada que contribui para o crescimento de todos ao seu redor. A Polyanna que sempre ensinou a todos o valor da organização e persistência para a condução de um ótimo trabalho.

Agradeço muito ao meu namorado Rodrigo Novaes (por ser esta pessoa tão maravilhosa comigo), e a sua família (Dona Rose, Dona Edenise, Senhor Antônio de Sá, Senhor Clóvis e a Beatriz) por me fornecerem sempre ótimas condições de estudo, além de me apoiarem junto as complicações da vida.

Os amigos aos quais convivemos mais que a nossa própria família, me apoiaram bastante na realização das tarefas e pela amizade: Karoline Mirella, Thiago Pajeú, Milena, Páblo, Karol Caitano, Ariadne, Tati Liu, Michelly, Priscilla Calaça, Sabrina, Leandro, Iris, Diego, Juliano, Elaine, Alexandra, Priscila Santos, Juanize, Amanda, Éllen, Késsia, Patyanne, Kátia, Danilo, Wendell, Eliz, Rafael, Felipe, Steliane, Tiago Santos, Anderson, Sheylla, Carol, Manu, Ana Flávia, Adely, Rebeca, Zé Noé, e Iêda. Aos PNPDs e professores pelos puxões de orelha e pelos bons conselhos: Romero Brandão, Cynthia Nascimento, Daniela Viana, Polyanna Nunes, Camila Porto, Tatiana Porto e Raquel Pedrosa.

Amigos da PPGBAS (Veridiana, Marcela, Catarina, Thiago Pajeú, Juliana, Priscila, Amanda, Aurenice, Suelen, Adelmo, André, Zé Manoel, Andriu, Luiz, Romério, Tiago Barros), tivemos dias inesquecíveis, dia do cafezinho por exemplo, durante as cadeiras da pós-graduação. O conhecimento fornecido pelos professores Roberto Afonso, Gustavo, Luiz de Carvalho, Zé Luiz, Eduardo Beltrão, Tania Stamford, Margarida Angélica, também sou grata.

Agradeço aos amigos que fiz durante o curso de Nutrição, especialmente a Paloma. Às professoras amigas que fiz lá Viviane Lansk, Marthyna, Margarida Angélica, Tânia Stamford pela aprendizagem, amizade, companheirismo e pelos momentos de descontração.

Pessoas que passaram em minha vida e que duvidaram da minha capacidade, a estas eu tenho que agradecer muito pois a frase “duvido muito que você consiga fazer...” é extremamente desafiadora, e como gosto de desafios, isso foi extremamente importante para que eu chegasse neste dia tão esperando em minha vida!

“Faça o teu melhor, na condição que você tem, enquanto você não tem condições melhores, pra fazer melhor ainda!”. (Mario Sérgio Cortella)

RESUMO

O leite de ovelha é um produto rico que permite elevado rendimento industrial na produção de derivados como o leite fermentado por grãos de Kefir. O consumo do Kefir está associado a benefícios à saúde, tais como: capacidade na proliferação gastrointestinal, espectro antibacteriano, efeito hipocolesterolêmico, atividade β -galactosidase, atividade antioxidante e reforço do sistema imunitário; também é considerado uma fonte de cepas probióticas e de peptídeos bioativos (PBA) que são liberados das proteínas do leite no decorrer da fermentação dos microrganismos presentes nos grãos ou por meio da digestão. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização microbiológica, bioquímica e funcional do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir após o processo de digestão *in vitro*. O leite fermentado foi produzido com leite comercial UHT no primeiro trabalho e leite de ovelha pasteurizado nos trabalhos subsequentes; em ambos os grãos de kefir foram adicionados na proporção de 5% (m/v), a fermentação foi realizada a 21°C por ~40h. Com os leites fermentados prontos, realizou-se digestões *in vitro* que simula a digestão humana (com ácido, enzimas digestivas e bile), ao final foram isolados microrganismos aos quais foram testados para características probióticas: atividade antagonista, resistência a antibióticos, atividade antioxidante, atividade de beta-galactosidase, auto-agregação, hidrofobicidade, teste de aderência *in vitro* em células epiteliais. Nos ensaios com os peptídeos foram utilizadas a eletroforese e a espectrometria de massa para avaliar o perfil durante o processo de digestão *in vitro*; após esta digestão frações foram separadas frações de pesos moleculares abaixo de 3kDa por ultrafiltração e atividades biológicas (antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e anti-hemolítica) foram testadas. Após a digestão do leite UHT fermentado foram isolados 28 *Saccharomyces cerevisiae* identificados por métodos clássicos e confirmação da espécie por análise do DNA. A partir da digestão do leite de ovelha fermentado 24 cepas de *Lactobacillus* sp. foram isoladas e 3 identificadas como *L. rhamnosus*. Os microrganismos isolados apresentaram: antagonismo contra bactérias patogênicas, atividade beta-galactosidase (destacando-se os 3 *L. rhamnosus* que produziram em média 45.32 U/mg), atividade antioxidante (2 *S. cerevisiae* com atividade acima de 90%), atividade hidrofóbica acima de 90% (19 *S. cerevisiae* e 2 *L. rhamnosus*), capacidade de auto-agregação acima de 60% com 4h de estudo, e capacidade de adesão em células epiteliais intestinais de camundongos. *S. cerevisiae* e *L. rhamnosus* apresentaram potencial uso como probióticos. Nos ensaios de PBA, foram observados um total de 134

peptídeos gerados durante digestão, 60 foram identificados por correlação na literatura e 12 com bioatividade já relatadas. Um PBA (661.8Da) foi resistente ao processo digestivo. As atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e anti-hemolítica foram observadas em todas as frações estudadas de 5-0.625 mg/mL. A fração extraída após toda a simulação da digestão, apresentou os melhores resultados. Os testes *in vitro* foram válidos para apontar *L. rhamnosus* Lb16 para aplicações probióticas *in vivo*. Os PBA encontrados no presente estudo indicam propriedades multifuncionais, têm potencial para identificação das sequências de aminoácidos que conferem cada bioatividade, isto pode permitir a síntese, purificação e aplicação no desenvolvimento de produtos nutracêuticos e na indústria biotecnológica.

Palavras chave: Leite de ovelha. Kefir. Probióticos. *Saccharomyces cerevisae*. *Lactobacillus rhamnosus*. peptídeos bioativos.

ABSTRACT

Sheep's milk is a rich product that allows high industrial yield in the production of derivatives such as milk fermented by grains of Kefir. Kefir consumption is associated with health benefits such as: gastrointestinal proliferation capacity, antibacterial spectrum, hypocholesterolemic effect, β -galactosidase activity, antioxidant activity and immune system enhancement; is also considered a source of probiotic strains and bioactive peptides (BAPs) that are released from milk proteins during the fermentation of the microorganisms present in the grains or through digestion. The objective of this work was to perform the microbiological, biochemical and functional characterization of sheep milk fermented by kefir grains after the *in vitro* digestion process. Fermented milk was produced with UHT commercial milk in the first part of work and pasteurized sheep's milk in the subsequent works; in both kefir grains were added in the proportion of 5% (w/ v), the fermentation was performed at 21 °C for ~40h. With the fermented milks prepared, *in vitro* digestions were performed to simulate human digestion (with acid, digestive enzymes and bile). At the end, microorganisms were tested and tested for probiotic characteristics: antagonistic activity, resistance to antibiotics, antioxidant activity, beta-galactosidase activity, auto-aggregation, hydrophobicity, *in vitro* adherence test in epithelial cells. In the peptide assays, electrophoresis and mass spectrometry were used to evaluate the profile during the *in vitro* digestion process; after this digestion fractions were separated molecular weight fractions below 3kDa by ultrafiltration and biological activities (antimicrobial, antioxidant, antihypertensive and anti-hemolytic) were tested. After the digestion of the fermented UHT milk, 28 *Saccharomyces cerevisiae* were identified by classical methods and confirmation of the species by DNA analysis. From the digestion of fermented sheep's milk, 24 strains of *Lactobacillus* sp. were isolated and 3 identified as *L. rhamnosus*. The isolated microorganisms presented: antagonism against pathogenic bacteria, beta-galactosidase activity (especially 3 *L. rhamnosus* that produced on average 45.32 U/ mg), antioxidant activity (2 *S. cerevisiae* with activity above 90%), hydrophobic activity above 90% (19 *S. cerevisiae* and 2 *L. rhamnosus*), autoaggregation capacity above 60% with 4h of study, and capacity of adhesion in intestinal epithelial cells of mice. *S. cerevisiae* and *L. rhamnosus* showed potential use as probiotics. In the PBA assays, a total of 134 peptides generated during digestion were observed, 60 were identified by correlation in the literature and 12 with

bioactivity already reported. A PBA (661.8Da) was resistant to the digestive process. The antimicrobial, antioxidant, antihypertensive and anti-hemolytic activities were observed in all studied fractions of 5-0,625 mg/ mL. The fraction extracted after the whole digestion simulation presented the best results. The *in vitro* tests were valid for pointing *L. rhamnosus* Lb16 for probiotic applications *in vivo*. The PBAs found in the present study indicate multifunctional properties, have potential for identification of the amino acid sequences that confer each bioactivity, this can allow the synthesis, purification and application in the development of nutraceutical products and the biotechnology industry.

Keywords: Sheep milk. Kefir. Probiotics. *Saccharomyces cerevisiae*. *Lactobacillus rhamnosus*. Bioactive peptides.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1. Dados sobre a produção de leite de ovelha no mundo _____	21
FIGURA 2. Produção de Leite de ovelha por continente em 2016 _____	22
FIGURA 3. Produção de Leite de ovelha: 10 maiores produtores em 2016 _____	22
FIGURA 4. Evolução sobre o número de ovinos no Brasil 2007-2016 _____	23
FIGURA 5. Rebanho de ovelhas Bergamácia _____	24
FIGURA 6. Grãos de kefir A) tamanho original (os retângulos pretos equivalem a 1 cm), B) vistos por microscopia eletrônica de varredura (a barra branca equivale a 10 µm) _____	29
FIGURA 7. Produção de kefir a) tradicional e b) em larga escala (método Russo) _____	30
FIGURA 8. Potenciais mecanismos de ação dos probióticos _____	37
FIGURA 9. Alvos terapêuticos potenciais para aplicação probiótico _____	38
FIGURA 10. As etapas de estudo da viabilidade e desempenho de estirpes probióticas _____	41
FIGURA 11. Hidrólise de proteínas dos derivados lácteos pelo sistema proteolítico de bactérias ácido lácticas ou por várias enzimas digestivas durante o processo de digestão, que resulta na liberação de peptídeos bioativos _____	50
FIGURA 12. Representação esquemática do sistema proteolítico de bactérias ácido lácticas _____	51

CAPÍTULO II. ARTIGO 2

FIGURA 1. Representação esquemática do gene 16S rDNA bacteriano e a localização de primers de sequenciamento. Um produto de PCR inicial de 1465 pares de bases é amplificado a partir do DNA bacteriano com os iniciadores 27F e 1492R. O amplicon resultante é sequenciado usando os quatro primers representados. A sequência de consenso é obtida a partir do conjunto que cobre toda a região amplificada _____	64
--	----

FIGURA 2. Os resultados do ensaio de auto-agregação de cepas de *Lactobacillus* sp. obtidos após uma simulação de digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir. Cepas Lb2 (branco), Lb16 (cinza escuro) e Lb24 (cinza claro). Os dados são expressos como média $\pm$ DP (n = 3). Letras diferentes (a, b e c) representam diferenças significativas (P <0,05) _____74

FIGURA 3. Resultados da adesão de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* obtidas após uma digestão *in vitro* de leite de ovelha fermentado, com células epiteliais intestinais raspadas de camundongos albinos Suíços, *L. rhamnosus* Lb16, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. A seta aponta para o local das células aderidas _____75

CAPÍTULO III. ARTIGO 3

FIGURA 1. Visão geral esquemática da estratégia analítica para identificar peptídeos do leite de ovelha fermentado em kefir na digestão gastrointestinal simulada _____98

FIGURA 2. Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15%) de proteínas de leite de ovelha fermentado em kefir durante a digestão *in vitro*: linha 2 - fase inicial (SMK), linha 3- fase gástrica (GD), linha 4- após total digestão (PD), linha 1- padrão de peso molecular (6,5-200 kDa) _____98

FIGURA 3. Perfil de espectrometria por Maldi-ToF-ToF do leite de ovelha fermentado pelo kefir (SMK), digerido gástrico (GD) e digerido pancreático (PD) entre 0.5 e 3kDa____100

FIGURA 4. Diagrama Venn do número de peptídeos identificados em leite de ovelha fermentado em kefir, digestão gástrica e digestão pancreática numa faixa entre 0,5 e 3 kDa _____101

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

TABELA 1. Composição média aproximada de leite de humanos, vaca, búfala, cabra e ovelha (por 100g de leite) _____	25
TABELA 2. Efeitos terapêuticos do kefir e de seus componentes _____	33
TABELA 3. Maior grupo de probióticos _____	35

CAPÍTULO II. ARTIGO 2

TABELA 1. Percentagem de cepas de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> resistentes ao ácido e bile depois de 24h de incubação a 37°C em caldo MRS _____	71
TABELA 2. Atividade antagonista de cepas de <i>Lactobacillus</i> isolados após uma simulação de digestão <i>in vitro</i> do leite de ovelha fermentado por kefir, contra vários patógenos _____	72
TABELA 3. Atributos funcionais de cepas de <i>Lactobacillus</i> spp. isoladas após simulação de digestão <i>in vitro</i> de leite de ovelha fermentado _____	73

CAPÍTULO III. ARTIGO 3

TABELA 1. Preparação das diferentes soluções para a simulação da digestão <i>in vitro</i> _____	93
TABELA 2. Perfis peptídicos de leite de ovelha fermentado por kefir (SMK), digestão gástrica (GD) e digestão pancreática (PD). As sequências são mostradas no código de letra única e as massas peptídicas são dadas em Da _____	102
TABELA 3. Peptídeos identificados no leite de ovelha fermentado em kefir de acordo com os dados da espectrometria de massa em comparação com a literatura _____	104
TABELA 4. Resultados dos ensaios de bioatividades dos extratos peptídicos (menores que 3kDa) obtidos do leite de ovelha fermentado por kefir (SMK), após a digestão gástrica (GD) e digestão pancreática (PD) _____	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a. C.	antes de Cristo
ABS	absorbância
ABTS	ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)- 6-sulfônico
AG	ácido graxo
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	Coleção de Cultura Americana
AVC	acidente vascular cerebral
a_w	atividade de água
BAL	bactéria ácido láctica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Da	Dalton
DCV	doenças cardiovasculares
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ECA	enzima conversora da angiotensina
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
GRAS	geralmente considerado seguro
HIV	vírus da imunodeficiência humana
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
OD	densidade ótica
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBAs	peptídeos bioativos
PBS	tampão fosfato salino
rRNA	RNA ribossomal
D.P.	desvio padrão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
TGI/ trato-GI	trato gastrointestinal
Tr	traços
UFC	unidades formadoras de colônia
UHT	processamento por temperatura ultra alta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 LEITE DE OVELHA	21
2.1.1 Composição do leite de ovelha	24
2.2 LEITE FERMENTADO	26
2.2.1 Propriedades biofuncionais de leites fermentados	27
2.3 KEFIR	28
2.3.1 Aspectos terapêuticos do kefir	31
2.4 PROBIÓTICOS	35
2.4.1 Aplicações terapêuticas atribuídas aos probióticos	37
2.4.2 Critérios de elegibilidade de um probiótico	40
2.5 PEPTÍDEOS BIOATIVOS	47
2.5.1 Peptídeos bioativos de leite	49
2.5.2 Obtenção de peptídeos bioativos por simulação da digestão ou hidrólise enzimática	52
3 OBJETIVOS	55
4 PUBLICAÇÕES	56
4.1 CAPÍTULO I	56
4.1.1 Resumo	58

4.2 CAPÍTULO II	59
4.2.1 Resumo	60
4.2.2 Introdução	61
4.2.3 Material e métodos	63
4.2.4 Resultados	70
4.2.5 Discussão	75
4.2.6 Conclusão	81
4.2.7 Agradecimentos	81
4.2.8 Referencias	81
4.3 CAPÍTULO III	88
4.3.1 Resumo	89
4.3.2 Introdução	90
4.3.3 Material e métodos	92
4.3.4 Resultados e discussão	97
4.3.5 Conclusões	110
4.3.6 Agradecimentos	110
4.3.7 Referencias	110
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	117
REFERÊNCIAS	118
ANEXOS	142

1 INTRODUÇÃO

O uso de probióticos tem sido conhecido pela humanidade há séculos e a busca por seus benefícios para a saúde é cada vez maior (ZAJŠEK; GORŠEK, 2010). Os consumidores também têm mostrado sua preferência no uso de alimentos que são alternativas às terapias convencionais durante o tratamento de várias doenças crônicas. Alta aceitação dos consumidores por estes produtos, crescimento industrial, elevados gastos com a saúde e melhoria da qualidade de vida são alguns dos fatores que podem levar ao desenvolvimento de novos leites fermentados com potencial nutricional e terapêutico (AHMED *et al.*, 2013).

O leite de ovelha é um produto rico, com alto valor nutricional e que permite elevado rendimento industrial na produção de derivados, e por isso apresenta grande valor agregado aos produtores. Nesse leite são encontradas todas as vitaminas e nas gorduras são encontrados ácidos graxos de cadeia curta e média, que são metabolizados de forma rápida e constituem-se, portanto, de rápida fonte energética, sendo ideais na alimentação de idosos e pessoas malnutridas. Além disso, por serem metabolizados de forma rápida, reduzem os teores de colesterol circulante e promovem menor deposição da gordura nos adipócitos (TAMIME *et al.*, 2011).

Uma alternativa do uso terapêutico do leite de ovelha é a produção de um leite fermentado pelos grãos de kefir (LEITE *et al.*, 2015). Os grãos de kefir são compostos por uma comunidade de bactérias ácido-láticas, leveduras e bactérias ácido acéticas, confinadas numa matriz complexa de polissacarídeos e proteínas (BOLLA *et al.*, 2013). A composição microbiana do Kefir e dos seus grãos é dependente das condições geográficas, climáticas e culturais, bem como da diversidade de espécies bacterianas e fúngicas selvagens (MARSH *et al.*, 2013).

Devido aos microrganismos presentes no leite fermentado pelo kefir, o mesmo é considerado como um probiótico complexo (BOLLA *et al.*, 2011), que pode exercer suas propriedades benéficas através de dois mecanismos: efeitos diretos das células microbianas vivas (probióticos) ou efeitos indiretos através dos metabólitos destas células (biogênicos). Biogênicos são definidos componentes alimentares derivados da atividade microbiana que proporcionam benefícios à saúde, sem envolver a microflora intestinal. Os biogênicos mais

importantes dos leites fermentados são peptídeos que não estão presentes antes da fermentação (VINDEROLA *et al.*, 2006).

Alguns destes peptídeos partilham características estruturais com peptídeos endógenos que atuam no organismo como hormônios, neurotransmissores ou peptídeos reguladores. Estes peptídeos exógenos derivados de componentes alimentícios podem interagir com os mesmos receptores no organismo ou/e exercem uma atividade agônica ou antagônica (HAFEEZ *et al.*, 2014). A investigação dos peptídeos bioativos após a fermentação do leite pelos grãos de kefir é uma alternativa para avaliar a qualidade funcional desse alimento, pois, eles representam uma significativa classe de nutracêuticos que podem ser isolados, purificados e caracterizados por diversas ferramentas proteômicas (DALLAS *et al.*, 2016).

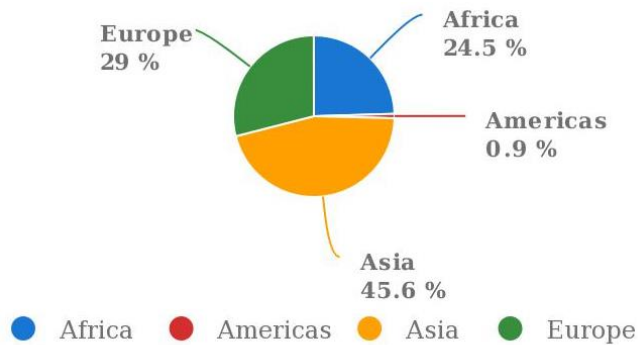
Para a fabricação de um derivado lácteo funcional, os microrganismos devem resistir às condições de fabricação de alimentos. Para ter viabilidade e eficácia, quando inseridos na matriz alimentar (SUMERI *et al.*, 2010), estes microrganismos probióticos também devem ser resistentes ao trato gastrointestinal (TGI), tolerando ácidos, a ação de enzimas digestivas tais como a pepsina e pancreatina, e sais biliares (XIE; ZHOU; LI, 2012) e, finalmente, atingir as células epiteliais do intestino (BOTTA *et al.*, 2014) em número suficiente para conferir benefício para o hospedeiro (GOLOWCZYC *et al.*, 2011). A capacidade de os microrganismos sobreviverem e crescerem depende em grande parte da sua capacidade de se adaptarem às mudanças no ambiente (SUMERI *et al.*, 2010), enquanto a possível resistência a antibióticos é a principal característica indesejável (SHARMA *et al.*, 2014).

Outros atributos que variam entre os probióticos é a capacidade de interagir com o consumidor, capturando os radicais livres gerados durante o processo digestivo (AMARETTI *et al.*, 2013), ou agindo de forma antagônica contra microrganismos patogênicos e também, por produzir a enzima β -galactosidase, ajudando na digestão da lactose (MEIRA; HELFER; *et al.*, 2012).

Assim o kefir é um produto com características semelhantes a outros alimentos fermentados lácteos, mas apesar de existirem vários estudos sobre a sua composição, poucos deles enfatizam o caráter de seus microrganismos como probióticos. Assim, este projeto se justifica pela importância da investigação sobre os mecanismos que norteiam as propriedades protetoras do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir, entre as quais podemos listar os microrganismos probióticos e os peptídeos bioativos contidos neste alimento.

Os dados da produção de leite de ovelha no mundo em 206 (FAOSTAT, 2018), informam que a Ásia é o continente que mais produz leite de ovelha 45,6%, sendo seguida pela Europa 29% (Figura 2).

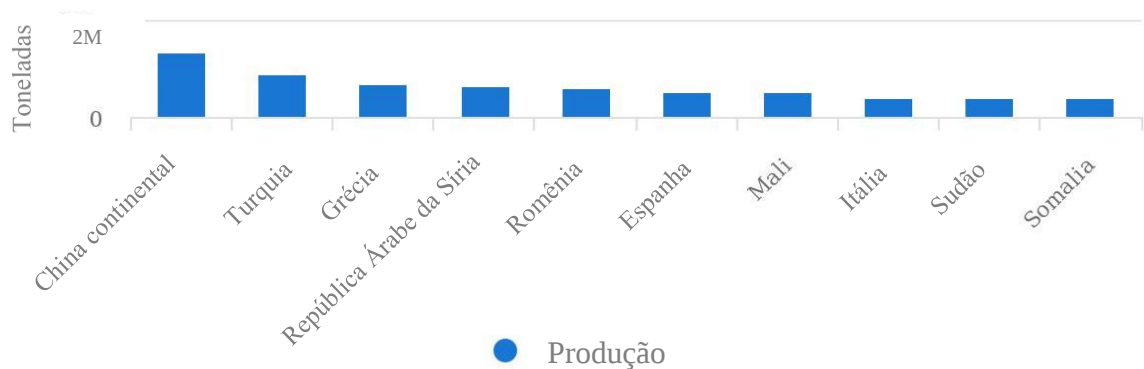
Figura 2: Produção de Leite de ovelha por continente em 2016



Fonte: FAOSTAT (2018).

Cerca de 1,3 M de toneladas do leite de ovelha do mundo é produzido na China, essa produção é seguida por 0,9M de toneladas pela Turquia (Figura 3).

Figura 3: Produção de Leite de ovelha: 10 maiores produtores em 2016

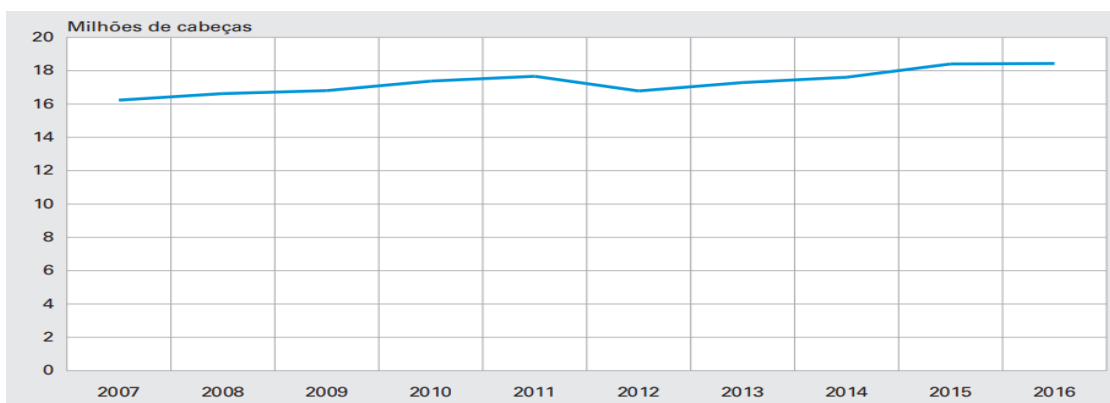


Fonte: FAOSTAT (2018).

No Brasil a exploração da atividade leiteira ovina em escala industrial é recente, sendo o quarto rebanho mais explorado no país, foi a princípio introduzido em 1992 pela exploração de carne e lã no Rio Grande do Sul com a raça Lacaune (origem francesa), mas com aquisição de raças leiteiras como a Bergamácia (origem italiana) o leite tem sido explorado em outros Estados nos últimos anos (ALEXANDRA; TAFFAREL; BRANDELLI, 2009).

O efetivo de ovinos no Brasil foi de 18,43 milhões em 2016, como retratado na Figura 4, do ano 2007 até 2016 pode ser observado um crescimento na criação destes animais (BRASIL, 2017).

Figura 4: Evolução sobre o número de ovinos no Brasil 2007-2016



Fonte: IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal 2007-2016.

De acordo com dados do BRASIL (2017) a Região Nordeste concentrou 63,0% do rebanho nacional de ovinos, seguida pela Região Sul representando 23,9%. As Regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste abrigaram, respectivamente, 5,7%, 3,7% e 3,7% do total. Os Estados que se destacaram no ranking foram a Bahia e Rio Grande do Sul que somaram juntos 38,0% do efetivo nacional. Pernambuco e Ceará aparecem em seguida com, respectivamente, 13,4% e 12,6% do total nacional (BRASIL, 2017)

Uma vantagem deste mercado é o baixo investimento inicial pela fácil adoção pela mão de obra. Outra vantagem é o lucro com os derivados, pois a produção do leite de ovelha no Brasil tem sido, em geral, destinada à fabricação de queijos finos, de elevado valor (ALEXANDRA; TAFFAREL; BRANDELLI, 2009). A ovinocultura de leite pode ter um bom resultado em pequenas propriedades, pois, na mesma área onde é criada uma vaca podem ser criadas cinco ovelhas. A fêmea adulta da raça Bergamácia (Figura 5), pode produzir em média de 250 kg de leite durante um período de 160 dias (ROHENKOHL *et al.*, 2011). O litro de leite de ovelha pode chegar a R\$ 3,00 e esse valor pode dobrar na produção de queijo e derivados (ALEXANDRA; TAFFAREL; BRANDELLI, 2009).

O rebanho de ovelhas da raça Bergamácia está entre os maiores do país, se concentram nas regiões Centro-Oeste e Nordeste (ROHENKOHL *et al.*, 2011), o mesmo já é explorado para a produção de leite no Estado de Pernambuco, e estudos têm sido realizados

para o melhor rendimento e qualidade desse produto para a fabricação de derivados (SÁ *et al.*, 2005).

Figura 5: Rebanho de ovelhas Bergamácia



Fonte: O Autor (2014).

2.1.1 Composição do leite de ovelha

As características e composição físico-química do leite de ovelha são essenciais para o sucesso na produção de seus derivados lácteos na indústria, bem como para o marketing desses produtos (TAMIME *et al.*, 2011). O teor médio de proteína (5,6 g/ 100 g) é alto (Tabela 1) (FAO, 2013), e neste leite é encontrada a taurina tal como no leite de cabra (PARK, 2007); este aminoácido é produzido em quantidades baixas pelo homem e está relacionado com a diminuição da pressão arterial (LOURENÇO; CAMILO, 2002).

O percentual de gordura (6,4 g/ 100 g) no leite de ovelha é elevado (Tabela 1); somente o leite de búfala contém em média mais gordura, isso quando é considerado o leite das principais espécies leiteiras (FAO, 2013). O tamanho médio de glóbulo de gordura no leite de ovelha é menor do que no leite de cabra, esta característica é importante, devido à melhor digestibilidade e ao metabolismo mais eficiente desses lipídeos, quando comparado ao leite de vaca (TAMIME *et al.*, 2011). Nestes glóbulos estão presentes os ácidos graxos (AG), que são bastante semelhantes aos do leite de cabra, e cinco tipos (ácido cáprico C10:0, ácido mirístico C14:0, ácido palmítico C16:0, ácido esteárico C18:0, e ácido oleico C18:1) representam mais de 75% da gordura total (PISANU *et al.*, 2011). O retinol ou vitamina A tem percentuais maiores no leite de ovelha quando comparado aos leites de vaca e de cabra (PARK, 2007).

Tabela 1. Composição média aproximada de leite de humanos, vaca, búfala, cabra e ovelha (por 100g de leite)

Principais componentes	Humano	Vaca	Búfala	Cabra	Ovelha
Energia (kJ)	291	262	412	270	420
Energia (kcal)	70	62	99	66	100
Água (g)	87,5	87,8	83,2	87,7	82,1
Proteína total (g)	1,0	3,3	4,0	3,4	5,6
Gordura total (g)	4,4	3,3	7,5	3,9	6,4
Cinza	0,2	0,7	0,8	0,8	0,9
Minerais					
Cálcio (mg)	32	112	191	118	190
Ferro (mg)	Tr	0,1	0,2	0,3	0,1
Magnésio (mg)	3	11	12	14	18
Fósforo (mg)	14	91	185	100,4	144
Potássio (mg)	51	145	112	202	148
Sódio (mg)	17	42	47	44	39
Zinco (mg)	0,2	0,4	0,5	0,3	0,6
Cobre (mg)	0,1	Tr		Tr	0,1
Selênio (µg)	1,8	1,8		1,1	1,7
Manganês (µg)		8		18	18
Vitaminas					
Riboflavina (mg) (vit B ₂)	0,04	0,20	0,11	0,13	0,34
Niacina (mg)	0,18	0,13	0,17	0,24	0,41
Ácido Pantotênico (mg)	0,22	0,43	0,15	0,30	0,43
Vitamina B ₆ (mg)		0,04	0,33	0,05	0,07
Folato (µg)	5,0	8,5	0,6	1,0	6,0
Biotina (µg)		2,0	13,0	2,5	2,5
Vitamina B ₁₂ (µg)	0,05	0,51	0,40	0,07	0,66
Vitamina C (mg)	5,0	1,0	2,5	1,1	4,6
Vitamina D (µg)	0,1	0,2		0,1	0,2

Espaços em branco indicam que os dados não foram avaliados.

Tr : Traços

Fonte: FAO (2013).

Em relação aos açúcares, o leite de ovelha contém mais lactose do que os leites de humanos, vacas, búfalas e cabras (FAO, 2013). E os oligossacarídeos do leite de ovelha contêm ácido siálico, geralmente chamado de ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) e ácido N-gliconeuramínico (Neu5Gc), que estão relacionados com o desenvolvimento do cérebro infantil (PARK, 2009).

Os minerais estão presentes em quantidades mais elevadas no leite de ovelha, tornando assim o teor de cinzas superior, no entanto, entre estes minerais os níveis de sódio e de potássio são baixos quando comparado ao leite de outras espécies (FAO, 2013).

O conhecimento das diferenças dos nutrientes do leite das várias espécies facilita o desenvolvimento de produtos para consumidores com necessidades específicas (TAMIME *et al.*, 2011). A exemplo produtos derivados de leite de ovelha, como iogurtes e leites fermentados, são de fácil digestão (MEDINA *et al.*, 2011) e podem ser indicados para grupos de consumidores com necessidades especiais, como crianças, atletas e idosos. Além disto estes derivados podem atuar como alimentos funcionais naturais (MICHAELIDOU, 2008).

2.2 LEITE FERMENTADO

Alimentos fermentados são alimentos submetidos à ação de microrganismos ou enzimas que causam alterações desejáveis ajudando a preservar, melhorando a aparência ou sabor dos alimentos. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação FAO (2013), existem mais de 3.500 alimentos fermentados tradicionais originados há milhares de anos em diferentes regiões do mundo, quando microrganismos foram introduzidos, por acaso, em alimentos locais (CAMPBELL-PLATT, 2014).

As primeiras evidências da prática de fermentação de leite na África, Oriente Médio e Europa estão datadas entre o 5º e 6º milênio a.C., há indícios de que esta prática também existia no Egito e na Mesopotâmia no terceiro milênio a.C. (DUNNE *et al.*, 2012; SALQUE *et al.*, 2013), e na Ásia Oriental por volta de 3.800 anos atrás (XIE *et al.*, 2016).

Nos dias atuais, o mercado de iogurtes e leites fermentados vale 46 bilhões de Euros, sendo que a América do Norte, Europa e Ásia representam 77% do mercado. Muitas comunidades em todo o mundo produzem naturalmente leite fermentado com leite de diversas fontes, incluindo vaca, camela, cabra, ovelha e mesmo iaque. Eles podem ser produzidos utilizando culturas starters definidas, ou deixando fermentar naturalmente (MARSH *et al.*, 2014).

A produção do leite fermentado vem se destacando, em 2014 apresentou uma produção estimada de 25 milhões de toneladas, e isto pode ser devido à alta aceitação do produto e da conquista de mercado ao longo da história (CAMPBELL-PLATT, 2014).

De acordo com a normativa do Codex Alimentarius (2011), leite fermentado é um produto obtido por fermentação de leite, com ou sem modificação da composição, limitado pela ação de microrganismos adequados, que resulta na redução do pH com ou sem coagulação (precipitação isoelétrica). Estes microrganismos iniciadores devem estar viáveis,

ativos e abundantes no produto até a data de durabilidade mínima. Se estes produtos forem tratados termicamente após a fermentação a exigência de microrganismos viáveis não se aplica.

Os microrganismos iniciadores predominantemente no leite fermentado são bactérias ácido lácticas (BAL), cujo teor microbiano pode variar, dependendo da fonte de leite, do tratamento do leite (por exemplo, pasteurização), do uso de culturas iniciadoras, da natureza dos microrganismos autóctones presentes, da temperatura, da higiene, do tipo e tratamento das embalagens usadas e do período de fermentação (MARSH *et al.*, 2014).

2.2.1 Propriedades biofuncionais de leites fermentados

O leite fermentado é conhecido pelo seu teor nutricional superior à matéria prima utilizada. Isto devido ao fato de as proteínas do leite e lactose estarem parcialmente digeridas pela ação do sistema enzimático das bactérias, permitindo melhor absorção intestinal (FAO, 2013).

Produtos lácteos fermentados tradicionalmente têm sido associados com uma série de propriedades promotoras de saúde (MARSH *et al.*, 2014), que podem ser devidas a efeitos probióticos ou biogênicos.

Estirpes bacterianas específicas podem ter propriedades de redução de colesterol (FAO, 2013); vários mecanismos têm sido sugeridos para os efeitos de redução de colesterol destas estirpes, incluindo desconjugação de sais biliares pela enzima hidrolase e subsequente co-precipitação de moléculas de colesterol, bem como a integração das partículas de colesterol na membrana da célula bacteriana (AYDAŞ; ASLIM, 2016).

Alguns produtos fermentados, especialmente os produzidos utilizando *Lactobacillus helveticus*, exibiram a capacidade de diminuir a pressão arterial em pacientes hipertensos. Sonestedt *et al.*, (2011) ao avaliar durante doze anos eventos cardiovasculares de 2.520 pessoas, perceberam uma relação inversa estatisticamente significativa entre o consumo de leite fermentado e doenças cardiovasculares (DCV).

Goldbohm *et al.* (2011) e Dalmeijer *et al.* (2013) relataram respectivamente que o consumo de leite integral fermentado e produtos lácteos fermentados possuíam uma relação inversa com as causas de mortalidade e risco de acidente vascular cerebral (AVC).

Bactérias ácido lácticas (BAL) em leites fermentados podem afetar agentes patogênicos de origem alimentar. No Zimbábue, as culturas de BAL isoladas a partir de leite fermentado

naturalmente (Amasi) inibiram a sobrevivência e o crescimento de agentes patogênicos humanos como *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis* (FAO, 2013).

O documento da FAO (2013) relata que o leite de camela fermentado tem recebido atenção por seu potencial de qualidades medicinais, incluindo o tratamento de úlceras no estômago, distúrbios hepáticos, prisão de ventre e feridas. Outro tipo de leite de camela fermentado (o Shubat) é utilizado como um agente terapêutico para tratar a tuberculose na Índia, Líbia e Cazaquistão.

Foi relatado que o consumo de iogurte pode beneficiar populações vulneráveis, incluindo pessoas subnutridas e pessoas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (FAO, 2013). Para este efeito testes foram realizados com bactérias ácido lácticas geneticamente modificadas, como vetores de uma droga em seu material genético, a qual serve para bloquear a infecção pelo HIV (PUSCH *et al.*, 2005).

Outro tipo de leite fermentado conhecido por sua longa história de benefícios de saúde é o kefir (MARSH *et al.*, 2014).

2.3 KEFIR

Kefir é um produto de leite fermentado que tem sido historicamente utilizado para promover e manter a boa saúde (SATIR; GUZEL-SEYDIM, 2016). A palavra "kefir" é derivada da palavra turca "keif" que significa "boa sensação" (LEITE *et al.*, 2015). Provavelmente sua produção teve início em tribos da região montanhosa do norte do Cáucaso da antiga União Soviética e seu consumo data de milhares de anos.

Originalmente, este produto foi fermentado naturalmente em sacos feitos de peles de animais e armazenado à temperatura ambiente, sendo, portanto, obtido de forma acidental. A longevidade das pessoas caucasianas é atribuída ao consumo de kefir e outros leites fermentados em níveis elevados (ÖZER; KIRMACI, 2014).

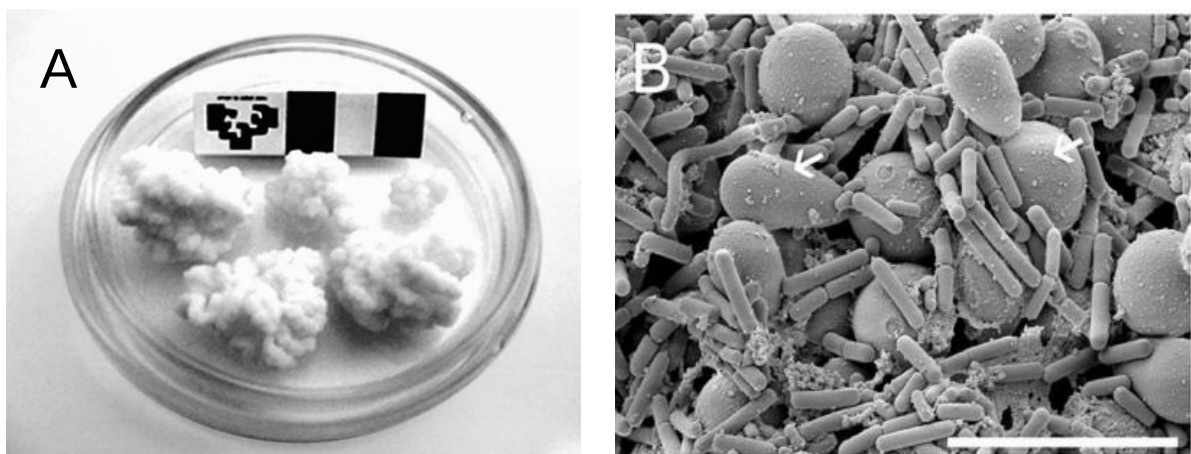
No final do século XIX, a produção de kefir se espalhou para a Europa Central e Oriental e em outras partes do mundo. No século XXI, o kefir começou a ser produzido industrialmente em diferentes regiões do mundo e comercializado sob diferentes nomes locais, como kefir, kefer, kiaphur, kefyr, knapon, kepi, e Kippi (ÖZER; KIRMACI, 2014). Esta bebida tem tido um notável sucesso, ganhando popularidade em todo o mundo, com um mercado de 130 milhões de dólares só na América do Norte em 2014 (TEREFE, 2016).

A composição microbiana do kefir e dos seus grãos é dependente das condições geográficas, climáticas e culturais, bem como da diversidade microbiana (MARSH *et al.*, 2013). Este produto vem sendo usado há muito tempo no Leste europeu, onde tem tradição de oferecer benefícios a pessoas com doenças metabólicas, aterosclerose, enfermidades alérgicas e distúrbios gastrintestinais (GLIBOWSKI; KOWALSKA, 2012).

Segundo a FAO (2013), essa bebida pode ser produzida com leite cru, pasteurizado ou UHT obtido de vaca, cabra, ovelha ou égua, com características de viscosidade e altamente ácida a partir da fermentação láctica e da fermentação alcoólica realizadas por bactérias mesofílicas e leveduras, respectivamente (AHMED *et al.*, 2013). A fabricação pelo processo tradicional envolve a adição dos grãos de kefir ao leite, com repouso durante cerca de 24 h. O leite é em seguida filtrado para recuperar os grãos, que serão utilizados para produzir o próximo lote de leite fermentado. Sendo os grãos são passados de geração em geração (KANDYLIS *et al.*, 2016).

Os grãos de kefir são de coloração branca para amarelado em formato de couve-flor de 0,3 a 3,5 cm de diâmetro (Figura 6), com uma textura viscosa, mas firme (LEITE *et al.*, 2015). A biomassa de grãos de kefir aumenta lentamente durante a fermentação do leite, e as propriedades dos grãos de kefir passam para grãos recém-formados (FARNWORTH, E. R., 2003).

Figura 6: Grãos de kefir A) tamanho original (os retângulos pretos equivalem a 1 cm), B) vistos por microscopia eletrônica de varredura (a barra branca equivale a 10 μ m)



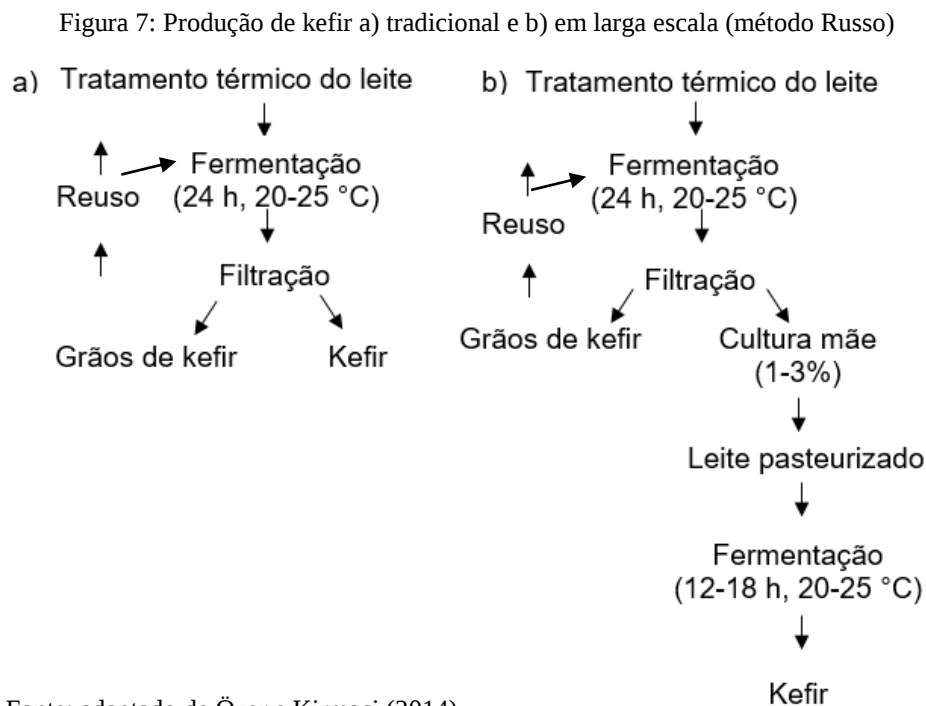
Fonte: Lopitz-Otsoa *et al.* (2006) e Lu *et al.* (2014).

A população microbiana encontrada em grãos de kefir tem sido citada como exemplo de comunidade simbiótica que não pode ser sintetizada artificialmente. Os grãos não se formam

espontaneamente quando as culturas puras dos organismos envolvido são colocadas em conjunto num tubo de ensaio. A composição da microbiota do leite fermentado pelo kefir varia de acordo com o meio de cultura e o método de produção (KANDYLIS *et al.*, 2016).

Özer e Kirmaci (2014) mencionam que existem vários métodos para a fabricação de kefir e técnicas modernas têm produzido um produto com as mesmas características que as do kefir tradicional (forma caseira).

Na fabricação tradicional o leite pasteurizado é inoculado com grãos de kefir (Figura 7). Após o tratamento térmico, o leite é inoculado quer com grãos de kefir quer com a cultura mãe (2-10%, p/ v). A fermentação é obtida a 20-25° C durante cerca de 24 h. Os grãos de kefir são então removidos por filtração e a bebida filtrada é refrigerada, a qual contém microrganismos vivos a partir dos grãos (cultura mãe).



Fonte: adaptado de Özer e Kirmaci (2014).

De acordo com método alternativo (também conhecido como o método Russo), a fermentação é realizada em duas etapas sucessivas. No primeiro passo, a cultura mãe é preparada tal como descrito no parágrafo anterior. Em seguida, a cultura mãe é adicionada ao leite pasteurizado (1-3%, v/ v). A segunda fermentação dura 12-18 horas a 20-25 °C (Figura 7). As vantagens do método Russo são estimular a atividade dos microrganismos e acelerar as alterações no leite durante a fermentação.

Outra alternativa para a fabricação do kefir é usar culturas puras definidas. Isto permite um melhor controle dos microrganismos envolvidos, maior facilidade de produção e qualidade mais consistente (ÖZER; KIRMACI, 2014).

Embora a organização global de microrganismos nos grãos não ter sido completamente elucidada, a microbiota inclui *Lactococcus*, *Lactobacillus*, bactérias ácido acéticas e leveduras (SATIR; GUZEL-SEYDIM, 2015). A quantidade microbiana de um grão de kefir é $\sim 10^8$ - 10^9 UFC/ mL de bactérias ácido lácticas, $\sim 10^5$ - 10^6 UFC/mL de leveduras, $\sim 10^5$ - 10^6 UFC/ mL de bactérias ácido acéticas, e provavelmente, fungos filamentosos (ÖZER; KIRMACI, 2014).

A relação entre microbiota do kefir varia dependendo da origem dos grãos. Entre as bactérias mais encontradas, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus acidophilus* são as espécies mais frequentemente isoladas dos grãos, já a levedura mais frequentemente isolada inclui as variedades de *Kluyveromyces marxianus* seguida pelo gênero *Saccharomyces* sp. (ÖZER; KIRMACI, 2014).

O polissacarídeo que envolve o grão, chama-se kefirano e é composto de uma unidade de um hexose repetido, possuindo, benefícios para a saúde (RIZK; MAALOUF; BAYDOUN, 2009).

O kefir tem atributos nutricionais diferenciados, tais como elevados teores de tiamina, riboflavina, vitamina B5 e vitamina C (o conteúdo da vitamina varia de acordo com a fonte do leite e dos microrganismos complementares), proteína e minerais. O kefir também contém uma maior quantidade de treonina, serina, alanina, lisina que o leite utilizado para a fermentação (FAO, 2013). Este alimento também é conhecido pelas ações terapêuticas de seus componentes.

2.3.1 Aspectos terapêuticos do kefir

As características benéficas para a saúde relacionadas ao kefir são atribuídas a proteínas, vitaminas, antioxidantes, minerais e certos compostos biogênicos. Os benefícios para a saúde associados com o kefir são a sua capacidade no espectro antibacteriano (CHIFIRIUC; CIOACA; LAZAR, 2011), efeito anticancerígeno (FAHMY; ISMAIL, 2015), efeito hipocolesterolêmico (FRIQUES *et al.*, 2015), atividade antimutagênica (LIU, J.-R.; CHEN; LIN, 2005), atividade antioxidante (LIU; CHEN; LIN, 2005). O kefir é capaz de

normalizar a microbiota intestinal e é altamente adequado para consumo por adultos normais e doentes, bem como lactantes (AHMED *et al.*, 2013).

Na Tabela 3, estão apresentados alguns efeitos terapêuticos e seus respectivos agentes responsáveis presentes no leite fermentado por grãos de kefir.

Além dos efeitos terapêuticos já mencionados, os microrganismos presentes no kefir apresentam a capacidade de produzir prebióticos (como o kefirano), que é um oligossacarídeo indigerível pelo consumidor e utilizado pela microbiota existente no trato gastrointestinal, servindo assim de matéria prima para seu crescimento (JOHN; DEESEENTHUM, 2015).

O kefirano é conhecido por oferecer melhorias no estado nutricional, além de benefícios para a saúde, tais como proteção contra carcinogênese, mutagênese, prevenção de lesões causadas pelos radicais livres, controle da flora intestinal e da resistência gastrintestinal (JOHN; DEESEENTHUM, 2015).

Bactérias e leveduras contidas no kefir são conhecidas pelas suas propriedades benéficas, e algumas cepas têm sido isoladas a partir de grãos de kefir com potencial probiótico; entre elas podem ser citadas BAL do gênero *Lactococcus* (BOLLA *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2015; ZANIRATI *et al.*, 2015), *Leuconostoc* (LEITE *et al.*, 2015; ZANIRATI *et al.*, 2015), *Oenococcus* (ZANIRATI *et al.*, 2015), *Lactobacillus* (GOLOWCZYC *et al.*, 2011; XIE; ZHOU; LI, 2012; BOLLA *et al.*, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2015; LIKOTRAFITI *et al.*, 2015; ZANIRATI *et al.*, 2015), e leveduras como: *Kluyveromyces marxianus* (BOLLA *et al.*, 2013; DIOSMA *et al.*, 2014), *Issatchenkia occidentalis* (DIOSMA *et al.*, 2014), *Saccharomyces unisporus* (DIOSMA *et al.*, 2014) e *Saccharomyces cerevisiae* (XIE; ZHOU; LI, 2012; BOLLA *et al.*, 2013; DIOSMA *et al.*, 2014).

Tabela 2. Efeitos terapêuticos do kefir e de seus componentes

Leite fermentado ou componentes	Ações terapêuticas	Tipo e/ou grupo de estudo	Referência
Grãos de kefir e kefirano	Atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante	<i>In vivo</i> /ratos Wistar	Rodrigues <i>et al.</i> (2005)
Leite fermentado	Aumenta a imunidade intestinal	<i>In vivo</i> / ratos Wistar	Thoreux e Schmucker (2001)
	Efeitos hipocolesterolemico	<i>In vivo</i> / hamsters	Liu <i>et al.</i> (2006)
	Auxilia o intestino, aumentando atividade enzimática e absorção de nutrientes	<i>In vivo</i> / ratos Wistar	Urdaneta <i>et al.</i> (2007)
	Proteção anticárie	<i>In vivo</i> / crianças	Cogulu <i>et al.</i> (2010)
	Eficiência na erradicação de <i>Helicobacter pylori</i> junto a terapia	<i>In vivo</i> / adultos	Bekar, Yilmaz e Gulten (2011)
	Antifúngico	<i>In vitro</i>	Ismaiel, Ghaly e El-Naggar (2011)
	Proteção frente a infecção por <i>Giardia intestinalis</i>	<i>In vivo</i> / camundongos	Franco <i>et al.</i> (2013)
	Auxilia na restauração endotelial dos vasos de animais hipertensos	<i>In vivo</i> / ratos Wistar	Friques <i>et al.</i> (2015)
	Efeito gastroprotetor em úlceras	<i>In vivo</i> / ratos Wistar	Fahmy e Ismail (2015)
	Retarda o crescimento de tumor mamário por regulações imunológicas	<i>In vivo</i> / camundongos	Moreno de LeBlanc, de <i>et al.</i> (2006)
Fração livre de células	Efeito antiproliferativo em Linfócitos infectadas com vírus	<i>In vitro</i> / cultura celular	Rizk, Maalouf e Baydoun (2009)
	Indução do apoptose em células de Linfócitos malignas	<i>In vitro</i> / cultura celular	Rizk, Maalouf e Baydoun (2011)
	Indução de apoptose de células cancerígenas gástricas	<i>In vitro</i> / cultura celular	Gao <i>et al.</i> (2013)
			Shahabi-Ghahfarrokhi <i>et al.</i> (2015)
Kefirano	Proteção contra raios UV	<i>In vitro</i>	
Peptídeos	Propriedades antimutagênica e antioxidante	<i>In vitro</i>	Liu, Chen e Lin (2005)
Lactobacilos	Antialérgico	<i>In vivo</i> / camundongos	Hong, Chen e Chen (2010)

Proteínas de Lactobacilos Microrganismos isolados	Efeito protetor contra invasão de <i>Shigella</i>	<i>In vitro/</i> cultura celular	Kakisu <i>et al.</i> (2013)
	Efeito anticolite	<i>In vivo/</i> camundongos	Wang <i>et al.</i> (2015)
	Regulação do metabolismo de glicose em obesos	<i>In vivo/</i> camundongos	Lin <i>et al.</i> (2016)
	Efeito antagônico frente a toxinas de <i>Clostridium difficile</i>	<i>In vitro/</i> cultura celular	Carasi <i>et al.</i> (2012)
	Efeito protetor contra infecção causada por <i>Clostridium difficile</i>	<i>In vivo/</i> hamsters	Bolla <i>et al.</i> (2013)

Fonte: O Autor (2016).

2.4 PROBIÓTICOS

A palavra probiótico deriva da língua grega, e significa "para a vida" (KANDYLIS *et al.*, 2016); a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2001 definiu probióticos os "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro" (FAO, 2013).

Nas duas últimas décadas, a pesquisa na área de probióticos tem alcançado grande progresso na seleção e caracterização de culturas probióticas específicas e confirmado os benefícios à saúde que lhes estão associados (BEENA DIVYA *et al.*, 2012).

Segundo Bongaerts e Severijnen (2016), o maior grupo de probióticos estudados são estirpes de bactérias ácido lácticas como as de lactobacilos, um número de estirpes de bifidobactérias, além de leveduras do gênero *Saccharomyces* (Tabela); também tem sido estudadas cepas Gram-negativas como a *Escherichia coli* Nissle 1917 (GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010).

Várias das espécies bacterianas probióticas comercializadas foi originalmente selecionada com base na sua estabilidade tecnológica (por exemplo, a resistência e a viabilidade durante o processamento e armazenamento de alimentos), ou numa variedade de fenótipos facilmente mensuráveis, tais como a capacidade de tolerar sais biliares, ou de sobreviver à passagem através do trato gastrointestinal. Estas características não estão necessariamente associadas com a capacidade de proporcionar benefícios à saúde humana. Entretanto, são requisitos comuns aos produtos probióticos, que estão passando por uma profunda transformação para elucidar os mecanismos pelos quais eles influenciam beneficemente a saúde humana (VENTURA; PEROZZI, 2011).

Tabela 3. Maiores grupos de probióticos *

Gênero	Tipo de metabolism	Espécies mais comuns
<i>Lactococcus</i>	Homolácteo obrigatório	<i>L. lactis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Homolácteo obrigatório	<i>L. salivarius</i>
	Heterolácteo facultative	<i>L. acidophilus</i>
	Heterolácteo obrigatório	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. bif fermentans</i>
<i>Bifidobacterium</i>	Heterolácteo obrigatório	<i>B. bifidum</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. infants</i>
<i>Saccharomyces</i>	Fermentador facultative	<i>S. boulardii</i> , <i>S. cerevisae</i>

*Os nomes em negrito indicam os seis principais agentes probióticos.

Fonte: Bongaerts e Severijnen (2016).

Conhecendo o metabolismo e as condições de crescimento pode-se escolher de forma mais eficaz o veículo (matriz alimentar ou farmacológica) que incorpora o probiótico; o grupo de indivíduos para qual estará disponível esse alimento (recém-nascidos, crianças, jovens, idosos, pessoas imunocomprometidas), já que, por exemplo, ácido lático e etanol causam intoxicação em recém nascidos (BONGAERTS; SEVERIJNEN, 2016); e o tipo de efeito terapêutico desejado; por isso que existem efeitos terapêuticos exclusivos de algumas cepas (GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010).

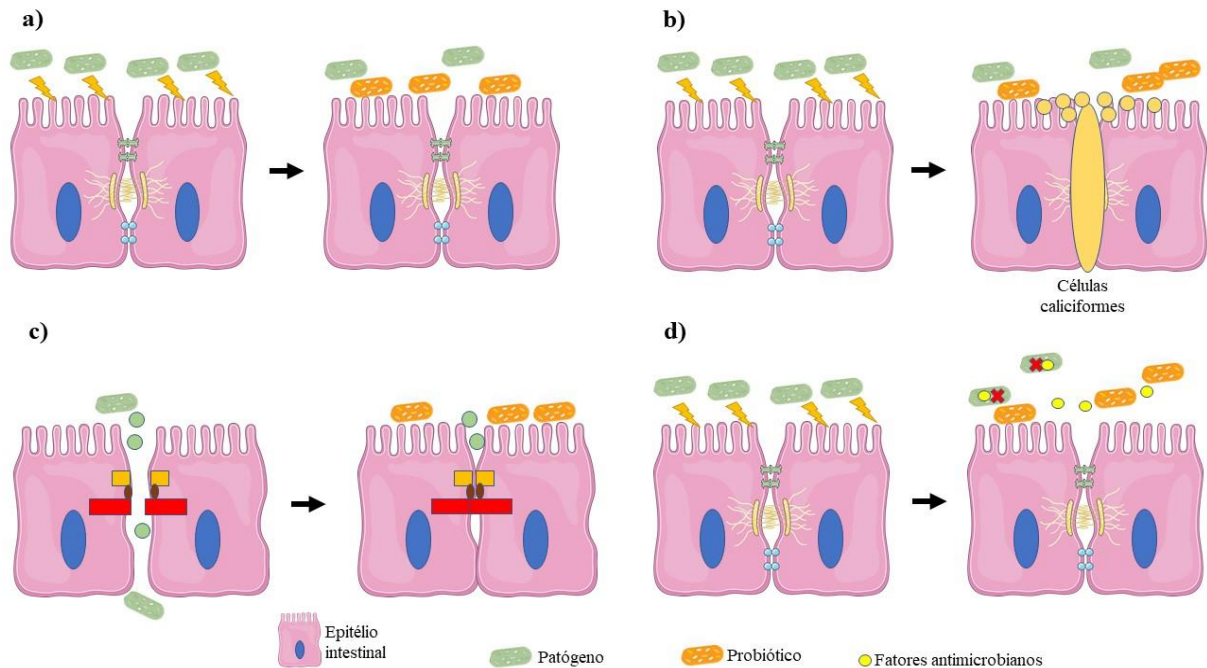
No entanto, tem de ser salientado que um probiótico não exhibe todos os benefícios, pelo menos não ao ponto em que poderia ser um remédio para a prevenção ou terapia de todos os tipos de doença (OELSCHLAEGGER, 2010). E alguns benefícios podem ser difundidos entre gêneros probióticos comumente estudados; outros podem ser frequentemente observados entre a maioria das cepas de uma espécie probiótica; outros podem ser raros e presente em apenas algumas estirpes de uma dada espécie (HILL *et al.*, 2014).

Foram relatados diferentes mecanismos para o efeito benéfico dos probióticos. Estes mecanismos diferem, de acordo com a estirpe específica, as doenças testadas, a manutenção das interações micróbio-hospedeiro apropriadas e exclusão de patógeno (Figura 8a), secreção de muco a partir de células caliciformes (Figura 8b), modulação da função de barreira epitelial (Figura 8c) e produção de fatores bactericidas (Figura 8d). Estes modos de ação probiótica têm toda a probabilidade de estarem envolvidos na defesa contra infecção, na prevenção do câncer e na estabilização ou reconstituição do equilíbrio fisiológico entre a microbiota intestinal e seu hospedeiro (OELSCHLAEGGER, 2010).

No entanto, para exercer efeitos terapêuticos, os microrganismos devem estar vivos e disponíveis em número elevado, geralmente superior a 10^8 a 10^9 células por grama de produto no momento do consumo (KANDYLIS *et al.*, 2016).

As áreas de benefícios de saúde que representam o maior mercado em termos de participação das vendas probióticas são a proteção imunológica e o conforto intestinal em geral na população adulta saudável. Seu sucesso, em certa medida, reflete o nível de evidência científica existente, mas é muito facilitado pela alta compreensão dos consumidores e pela procura por esses benefícios para a saúde. Novas aplicações de probióticos também estão emergindo (MAKINEN *et al.*, 2012).

Figura 8. Potenciais mecanismos de ação dos probióticos



Organismos probióticos podem proporcionar um efeito benéfico sobre as células epiteliais do intestino de várias maneiras. **a)** algumas espécies podem bloquear a entrada de patógenos nas células do epitélio, produzindo uma barreira física, referida como barreira de resistência à colonização. **b)** criar uma barreira de muco, causando a liberação de muco de células caliciformes. **c)** outros probióticos conservam a permeabilidade intestinal, aumentando a integridade de junções oclusivas intercelulares apical, por exemplo, por regulação positiva da expressão da zona de oclusão (uma proteína de firme junção), ou impedindo a redistribuição da proteína, deste modo, interrompem a passagem de moléculas para a lâmina própria. **d)** foi mostrado que algumas cepas probióticas têm capacidade de produzir fatores antimicrobianos.

Fonte: O Autor (2018).

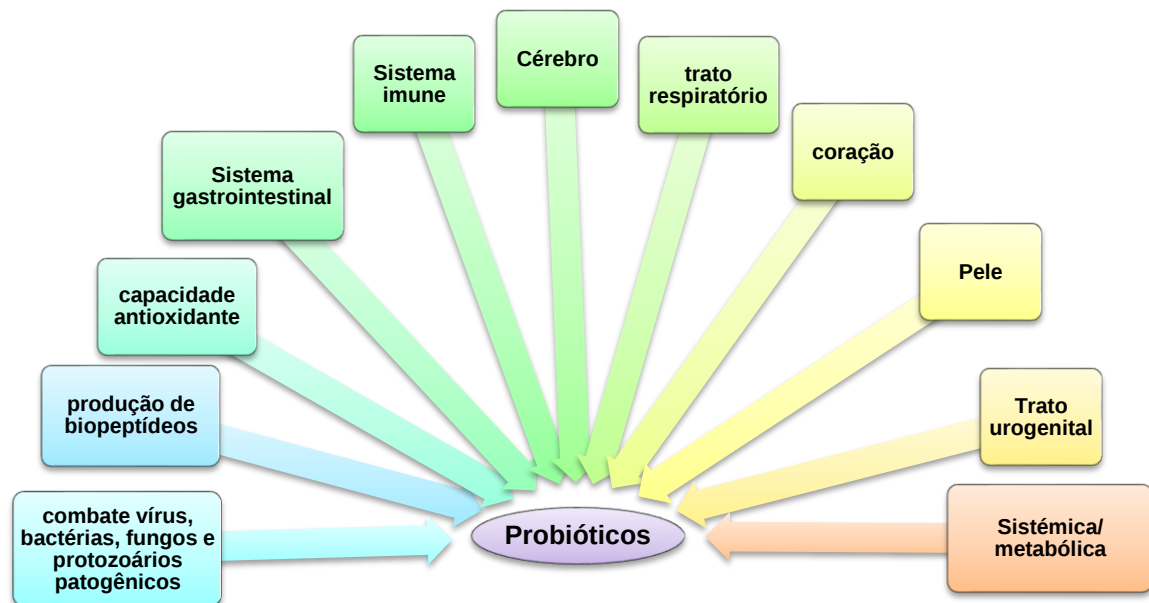
2.4.1 Aplicações terapêuticas atribuídas aos probióticos

Numerosos testes em animais e humanos têm demonstrado os benefícios para a saúde da utilização de cepas probióticas na prevenção, redução de riscos e gerenciamento de várias doenças (KUMAR *et al.*, 2016), como pode ser observado na Figura 9.

Estudos com probióticos têm crescido em todos os campos de estudo relacionado a saúde. Bactérias probióticas mostraram a capacidade de modulação de respostas cerebrais. Tillisch *et al.* (2013) observaram que essa comunicação existe e é modificável, mesmo em mulheres saudáveis. Uma análise mais aprofundada destas vias, em seres humanos, vai elucidar se essa microbiota sinaliza ao cérebro com um papel homólogo na modulação da sensibilidade à dor, capacidade de resposta ao estresse, humor ou ansiedade. Adicionado a isto, Davari *et al.*

(2013) comprovaram um aumento na capacidade sináptica em animais diabéticos que receberam o regime contendo probióticos.

Figura 9. Alvos terapêuticos potenciais para aplicação de probióticos



Fonte: O Autor (2016).

Em estudos similares, foi observado que essas bactérias podem reverter o autismo (REARDON, 2013); Schmidt (2015) encontrou correlações entre a saúde mental com a saúde intestinal. Ranjbar, Akbarzadeh e Homayouni (2016) mencionam o uso de probióticos em pacientes psiquiátricos, e Jones (2011) que probióticos ajudam no controle da ansiedade.

Microrganismos com habilidades probióticas têm sido estudados com relação a sua atuação no metabolismo, os mesmos têm mostrado capacidade de regular as taxas hematológicas e perfil lipídico, deixando-os normais (SALAHUDDIN; AKHTER; AKTER, 2013).

A ação dos probióticos no metabolismo tem relação ao combate à obesidade (ARORA; SINGH; SHARMA, 2013) e relação à perda de peso de seus consumidores (PARK; BAE, 2015); no entanto, Sonnenburg e Bäckhed (2016) comprovaram que o consumo diário de probióticos afeta moduladores no metabolismo, que em consequência ajuda na perda de peso.

A síndrome metabólica é aliviada pelo consumo de probióticos (KOVATCHEVA-DATCHARY; ARORA, 2013), esses microrganismos atuam na proteção da parede intestinal de pessoas mal nutridas (AZEVEDO, DE *et al.*, 2014). Uma recente revisão relata que os

probióticos atuam no combate à perda de massa muscular (TRIPATHI; MARATHE, 2015), e auxiliam na produção energética e manutenção da glicemia em pessoas que fazem exercícios de alta resistência (MACH; FUSTER-BOTELLA, 2016).

Estudos recentes comprovaram que os probióticos auxiliam no tratamento de infecções respiratórias (ALEXANDRE *et al.* 2014; DE ARAUJO, *et al.* 2015), como a asma (FELESZKO; JAWORSKA, 2010), e previnem processos alérgicos (VELEZ *et al.*, 2015), bem como participam no tratamento de doenças cardíacas (HANNING; LINGBECK; RICKE, 2016) e redução de colesterol (DALIRI; LEE, 2015).

A atuação de probióticos na área dermatológica está crescendo (FUCHS-TARLOVSKY; MARQUEZ-BARBA; SRIRAM, 2016), e tratamentos de acne, eczemas e candidíase cutânea (COLOMBO; ARENA, 2016) têm se mostrado eficazes. Ulcerações na pele de diabéticos têm sido tratadas com esses microrganismos (SONAL SEKHAR *et al.*, 2014). Prevenção de sequelas induzidas pela radiação (HAMAD; FRAGKOS; FORBES, 2013) e radioterapia (ABDOLLAHI, 2014) também fazem parte da atuação desses microrganismos.

A saúde oral, urogenital e ginecológica são campos de uso terapêutico dos probióticos (ZIYADI *et al.*, 2016), auxiliam tratamentos de infecções urinárias (ELKHIHAL *et al.*, 2015) e bom funcionamento dos rins (AKOGLU *et al.*, 2015), pois existem probióticos capazes de degradar oxalato de cálcio, que é prejudicial aos rins (ELLIS *et al.*, 2016).

A atuação mais conhecida dos probióticos é na área imunológica (VINDEROLA *et al.*, 2006; MAYNARD *et al.*, 2012; TRIPATHI; GIRI, 2014; HONDA; LITTMAN, 2016) e no tratamento de doenças gastrointestinais (RITCHIE; ROMANUK, 2012), tendo assim efeito gastroprotetor no tratamento de úlceras (FAHMY; ISMAIL, 2015), no tratamento de diarreias associadas a antibióticos (XIE *et al.*, 2015), no tratamento de enterocolite necrosante (FROST; CAPLAN, 2013; NEU, 2014), na prevenção de doenças inflamatórias intestinais (LEBLANC; LEBLANC, 2015) e câncer de cólon (SERBAN, 2014); somado a isso têm ação anti-inflamatória na doença de Crohn (FEDORAK *et al.*, 2015) e age de forma benéfica nos sintomas da intolerância a lactose (LULE *et al.*, 2016).

Probióticos aliviam os sintomas da doença hepática não alcoólica (MOHAMMADMORADI; JAVIDAN; KORDI, 2014), reduzem o teor de colesterol (DALIRI; LEE, 2015) e produzem ácido linoleico (O'SHEA *et al.*, 2012).

Os microrganismos probióticos são conhecidos pela sua capacidade antioxidante (AMARETTI *et al.*, 2013) e pela produção de biopeptídeos (SAADI *et al.*, 2015) ou outros metabólitos secundários (O'SHEA *et al.*, 2012) que combatem *Salmonella* sp. (CASTILLO *et*

al., 2012), *Pseudomonas aeruginosa* (MACHAIRAS *et al.*, 2015), *Clostridium difficile* (ALLEN, 2015; SPINLER; ROSS; SAVIDGE, 2016) e *Helicobacter pylori* (ANANIA *et al.*, 2016), também têm a capacidade de absorver toxinas fúngicas como a Aflatoxina (REDZWAN *et al.*, 2016).

O combate a protozoários causadores da giardíase (FRANCO *et al.*, 2013) e causadores da malária (NGWA; PRADEL, 2015) têm sido alvo de estudos desses microrganismos. Um iogurte probiótico tem auxiliado a parar a propagação do vírus da AIDS (PEPLOW, 2006).

Contudo o uso de medicamentos de probióticos deve ser indicado pelo médico, já que a suspensão abrupta da administração pode aumentar a susceptibilidade do patógeno hospedeiro através da indução de disbiose intestinal (LIU *et al.*, 2016).

Somado ao uso terapêutico os critérios de avaliação são muito importantes para que um microrganismo seja utilizado como probiótico.

2.4.2 Critérios de elegibilidade de um probiótico

Para se ter cepas probióticas funcionais, com benefícios para a saúde previsíveis e mensuráveis, um esforço rigoroso para seleção de estirpes é necessário. Os critérios de seleção para que bactérias ácido lácticas sejam usadas como "probióticos" segundo Sharma *et al.*, (2014) incluem:

- a) exercer um efeito benéfico sobre o hospedeiro;
- b) suportar as características físico-químicas do produto alimentar com contagens celulares elevadas e permanecer viáveis durante todo o período de vida útil;
- c) sobreviver durante a passagem através do trato gastrointestinal;
- d) aderir ao epitélio intestinal para colonizá-lo de forma temporária;
- e) produzir substâncias antimicrobianas e ter atividade antagônica contra bactérias patogênicas;
- f) estabilizar a microbiota intestinal e fornecer vários benefícios à saúde;
- g) gêneros capazes de colonizar humanos;
- h) ser estáveis em relação ao oxigênio, ácidos, enzimas e bile;
- i) ser segura, não ser patogênica, não-tóxica, não alérgica, não mutagênica e não deve levar a resistência aos antibióticos transmissível.

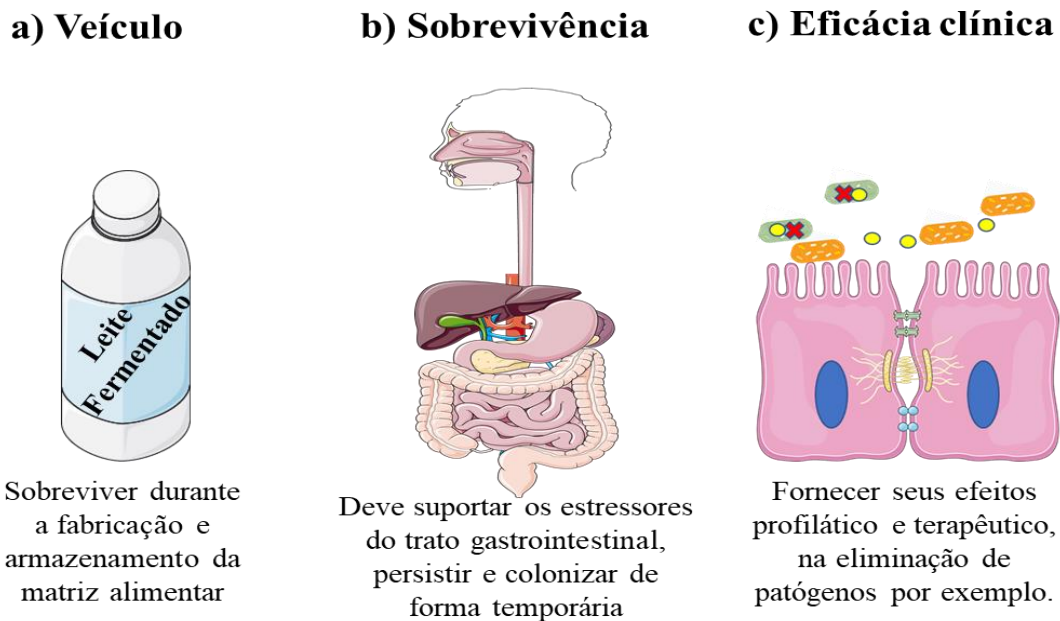
Os produtos probióticos devem conter um número suficiente de microrganismos até a data de validade (TRIPATHI; GIRI, 2014). Segundo Sleator e Hill (2008) os maiores

estresses que a estirpe probiótica enfrenta durante a produção do alimento e/ ou na formulação do comprimido (Figura 10-a) são a temperatura, pressão (no caso de secagem por spray-drying), e atividade de água (a_w). Uma estratégia comum observada nesses microrganismos é a resistência a agentes estressores, esses microrganismos para suportarem estas condições acumulam compostos protetores, denominados de solutos compatíveis, estes por sua vez tornam as estirpes fisiologicamente robustas (SLEATOR; HILL, C, 2008).

Estirpes fisiologicamente robustas são estáveis em relação ao oxigênio, ácidos, enzimas e bile, de tal modo que chegam ao intestino grosso, dependendo da característica da cepa, numa concentração de cerca de 10^7 células viáveis por grama de substrato (SHARMA *et al.*, 2014), (Figura 10-b).

Após chegar viável o microrganismo deve aderir, modular o ambiente intestinal estabilizando a microbiota, inibindo ou até mesmo eliminando os patógenos intestinais, fornecendo assim seus benefícios (Figura 10-c).

Figura 10. As etapas de estudo da viabilidade e desempenho de estirpes probióticas



Fonte: O Autor (2018).

No entanto para uma estirpe probiótica chegar a ser comercializada vários estudos são necessários. O teste para o potencial probiótico começa ao nível pré-clínico e inclui avaliações de resistência a antibióticos, a segurança e o seu potencial de eficácia. A utilização de sistemas *in vitro* para testar inicialmente, por exemplo, a capacidade antagônica de diferentes organismos probióticos, deve ser realizada antes de testar o agente *in vivo*. Por

exemplo, testando três cepas de *Lactobacillus* diferentes estudos *in vitro* indicaram que *L. paracasei* tem os menores efeitos estimulantes sobre as células dendríticas em comparação com *L. plantarum* e *L. rhamnosus* GG. Estas descobertas levaram ao teste da estirpe *L. paracasei* em camundongos com colite induzida (GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010).

2.4.2.1 Etapas de estudo para avaliação de um probiótico

Antes da sua avaliação, os probióticos devem ser caracterizados utilizando os seguintes critérios: (1) a capacidade para resistir a pH extremamente baixos, enzimas gástricas e intestinais, e sais biliares, (2) a capacidade de aderir às células epiteliais intestinais, (3) atividade antimicrobiana e (4) de segurança. A avaliação dos probióticos pode ser realizada em ensaios pré-clínicos (células e modelos animais) e níveis clínicos. Entre estes últimos, os estudos mais confiáveis para avaliar os benefícios terapêuticos de qualquer estirpe probiótica são randomizados e ensaios controlados com placebo (FONTANA *et al.*, 2013).

2.4.2.1.1 Matriz alimentar

Visando obter benefícios à saúde, as cepas probióticas geralmente exigem uma matriz específica para garantir a sobrevivência ideal em todo o trato gastrointestinal. Por exemplo, os probióticos têm sido formulados em matriz de chocolate (RAYMOND; CHAMPAGNE, 2015), sucos de frutas (SAITO *et al.*, 2014), sorvetes (MATIAS *et al.*, 2016), doces e barras de cereais (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). No entanto produtos lácteos convencionais como kefir, iogurtes e queijos são mais eficazes na manutenção da viabilidade dos probióticos, pois agem como um tampão, facilitando assim a passagem dos microrganismos através do TGI durante o processo digestivo (VIZOSO PINTO *et al.*, 2006).

2.4.2.1.2 Resistência a acidez e enzimas digestivas

Um dos grandes desafios que os probióticos têm de superar é a sua exposição a um pH ácido (~2) no estômago (SICILIANO; MAZZEO, 2012). Sistemas *in vitro*, incluindo incubações controladas em suco gástrico real ou simulado (pH 2,0 - 4,0; 70-180 min), têm sido usados, preferencialmente, na avaliação de novas cepas probióticas. Outros modelos complexos que simulam trânsito gastrointestinal também têm sido desenvolvidos. Além disso,

incubações de uma a quatro horas em meios químicos e/ ou enzimáticos em um intervalo de 1,5 - 3,0 pH também foram realizados (FONTANA *et al.*, 2013).

A falta ou a presença de uma matriz alimentar determina significativamente o perfil de pH ao qual a cepa probiótica está sujeita. Apesar de o efeito protetor inicial de pH dos alimentos poder sujeitar a cepa probiótica a condições de acidez inicialmente menos rigorosas, uma digestão mais demorada no estômago na presença de alimentos pode expor parte do probiótico administrado a condições de acidez por um período mais longo. Vários microrganismos probióticos têm sido selecionados por sua maior resiliência contra essas condições de acidez e novas metodologias estão disponíveis para possibilitar o encapsulamento de cepas probióticas para essa finalidade (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

2.4.2.1.3 Resistência aos sais biliares

Outro componente estressor é a presença de sais biliares, que podem comprometer as membranas dos microrganismos, devido à sua natureza anfifílica. As concentrações fisiológicas relevantes na faixa de bile humana são de 0,3 a 0,5%. Os ensaios *in vitro* são realizados em 0,3 - 0,7% de bile bovina (Oxgall) por 60-180 min. Probióticos mostram resistências altamente variáveis a ácidos e sais biliares, dependendo da espécie e da estirpe microbiana (FONTANA *et al.*, 2013).

A característica funcional de uma estirpe específica é sua capacidade de lidar com o estresse causado pela enzima hidrolase dos sais biliares. Essa enzima por meio de uma hidrólise, separa a glicina ou parte da taurina dos sais biliares conjugados, de tal modo a bile fornece menor capacidade bacteriostática (SICILIANO; MAZZEO, 2012). Essa característica é de especial importância para aprimorar a sobrevivência das cepas em todo o trânsito intestinal e foi proposta como um mecanismo que explica como os probióticos podem reduzir os níveis de colesterol no sangue (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

2.4.2.1.4 Colonização

As cepas probióticas também devem ter a capacidade de colonizar de forma transeunte o TGI. Essa propriedade pode ser dividida em um componente ecológico e em um componente da mucosa. Primeiramente, assim que um organismo probiótico sobrevive ao ácido gástrico e aos sais biliares do duodeno e, portanto, atinge o íleo e o cólon, tem a

possibilidade de se desenvolver em um ambiente menos drástico. Contudo, atinge um ambiente com uma abundância microbiana altamente significativa - o íleo e o cólon atingem concentrações bacterianas de quimo 10^7 e 10^{11} células/ mL, respectivamente. Obviamente, uma cepa probiótica pode ser considerada exterior à microbiota indígena residente e, a menos que nutrientes específicos sejam fornecidos ao probiótico na formulação do produto (um prébiotico por exemplo), a cepa deve entrar em competição com a comunidade microbiana residente por substratos disponíveis. Em termos ecológicos, o probiótico administrado deve ocupar uma posição funcional no ecossistema microbiano do intestino (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

2.4.2.1.5 Adesividade

A capacidade de aderir à camada de muco do hospedeiro e às células é uma característica integrante do probiótico, uma vez que é um pré-requisito para a colonização transitória, o estabelecimento de uma interação microrganismo-hospedeiro funcional para modular o sistema imunitário, antagonismo contra patógenos e a proteção do TGI (VALERIANO; PARUNGAO-BALOLONG; KANG, 2014).

Portanto, a adesão tem sido um dos principais critérios de seleção para novas cepas probióticas e tem sido relacionada com certos efeitos benéficos dos probióticos. Bactérias ácido lácticas probióticas exibem componentes proteicos de superfície que estão envolvidos na sua interação com as células intestinais epiteliais e muco. Além dos componentes proteicos, o processo de adesão microbiana de BAL também inclui interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ácido lipoteicóico e estruturas específicas, tais como apêndices externos cobertos por lectinas (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

A natureza hidrofóbica e a agregação das cepas microbianas podem ser avaliadas com um simples ensaio (MEIRA *et al.*, 2012), ao passo que uma adesão específica à mucosa pode ser mensurada com ensaios de adesão de curto prazo com mucinas derivadas do intestino (TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013). Contudo, a adesão específica dos microrganismos intestinais às mucinas do intestino é eficiente apenas para a formação de micro colônias e não garante uma colonização prolongada da camada da mucosa (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015).

Teste de adesão também são realizados em culturas de células (TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013); nos últimos anos a linha de células Caco-2 foi

utilizada extensivamente para determinar a capacidade de adesão. Estas células formam uma monocamada homogênea e criptas que se assemelha aos enterócitos humanos maduros do intestino delgado (FONTANA *et al.*, 2013).

Além das células Caco-2, a linha de células do cólon HT-29 também exibe características típicas de diferenciação dos enterócitos e tem sido usada para ensaios *in vitro* de adesão. No entanto, os resultados de modelos de adesão *in vitro* utilizando esta linhagem celular ou a sua combinação com outras linhagens são altamente variáveis; entre os estudos *in vitro* relatados por Fontana *et al.* (2013), os resultados da adesão de potenciais probióticos e/ou suas interações com agentes patogênicos no epitélio intestinal variam de acordo com a técnica e estirpes utilizadas.

2.4.2.1.6 Antagonismo a microrganismos patogênicos

Algumas propriedades de adesividade dos probióticos podem inibir a colonização por bactérias patogênicas. Lactobacilos e bifidobactérias foram capazes de inibir uma ampla gama de agentes patogênicos, incluindo *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, Rotavírus e *Listeria monocytogenes* (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

Os probióticos podem atuar através de uma variedade de mecanismos, incluindo a produção de substâncias antimicrobianas, estimulação do sistema imunitário e concorrência com patógenos por nutrientes e locais de adesão (FONTANA *et al.*, 2013). Esta última baseia-se numa interação probiótico-bactéria mediada por competição por nutrientes disponíveis e por locais de adesão nas mucosas. Para obter uma vantagem competitiva, os probióticos também podem modificar o seu ambiente para torná-lo menos adequado para os seus concorrentes, com produção de substâncias antimicrobianas, como ácidos orgânicos de baixo peso molecular (<1000 Da) e bacteriocinas (> 1000 Da) (BERMUDEZ-BRITO *et al.*, 2012).

2.4.2.1.7 Avaliação de segurança (testes de resistência a antibióticos)

A resistência aos antibióticos tornou-se um importante problema de saúde pública e está atraindo o interesse de profissionais de saúde e de pesquisa em todo o mundo. A principal preocupação é o aumento da resistência aos antibióticos e o potencial de propagação de genes de resistência a bactérias patogênicas (SHARMA *et al.*, 2014).

Encontraram-se estirpes de *Lactobacillus* de origem láctea resistentes aos antibióticos (TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013; KUMAR; KUMAR, 2015), no entanto estes estudos justificam a resistência a antibióticos como uma resistência intrínseca e não-transferível; entretanto, Tian *et al.* (2014) apontaram que os probióticos seguros não têm os genes de resistência.

Outro teste de segurança realizado é a verificação se a estirpe probiótica produz DNAase e coagulase, e também qual tipo de hemólise o microrganismo apresenta (ALMEIDA JÚNIOR *et al.*, 2015).

2.4.2.1.8 Estudos dos atributos funcionais

2.4.2.1.8.1 Atividade antioxidante

Antioxidantes são geralmente fornecidos pela dieta, mas alguns probióticos são capazes de atuar como antioxidante (ARCHER; HALAMI, 2015). A microbiota do hospedeiro precisa tolerar o estresse oxidativo endógeno e exógeno. A atividade antioxidante por meio de microrganismos atua protegendo a microbiota do hospedeiro do ataque dos radicais livres quando esses probióticos colonizam e se propagam no TGI (REN *et al.*, 2014). Por outro lado, os microrganismos que produzem fatores antioxidantes desempenham um papel na prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes e úlceras do TGI. Atualmente, um grande número de estirpes de bactérias ácido lácticas e leveduras (CHEN *et al.*, 2010) tem sido investigado para as suas propriedades antioxidantes.

Os mecanismos antioxidantes de probióticos podem ser atribuídos a captura de radicais livres, de quelante de metais, a inibição de enzimas, e atividade de redução e inibição de autooxidação de ascorbato (AMARETTI *et al.*, 2013). Atividades metabólicas probióticas podem ter um efeito antioxidante através da eliminação de compostos oxidantes ou a prevenção da sua geração no intestino (AMARETTI *et al.*, 2013). Estes ensaios de atividade antioxidante em microrganismos probióticos têm sido realizados por vários métodos, como DPPH (MEIRA *et al.*, 2012), ABTS (VIRTANEN *et al.*, 2007) e Ácido Linoleico (CHEN, P. *et al.*, 2014), os quais utilizam a cepa intacta, seus metabólitos extracelulares ou intracelulares.

2.4.2.1.8.2 Produção da enzima β -Galactosidase

A intolerância à lactose pode ser tratada por meio de microrganismos que produzem a enzima que hidrolisa a lactose, a β -galactosidase (JENA *et al.*, 2013). Essa produção é mais conhecida dentro do gênero *Lactobacillus*, com atividades hidrolase e transglicosilase vantajosas, dos pontos de vista tecnológico e de saúde. Esta enzima é intracelular e lançada para o meio extracelular por bactérias íntegras, ou pode agir quando é liberada pelo rompimento das células bacterianas no TGI (MEIRA *et al.*, 2012).

A matriz alimentar probiótica, como iogurte ou leites fermentados, pode ser melhor tolerada pela má absorção da lactose por causa da β -galactosidase presente nos microrganismos do alimento que produzem esta enzima no intestino delgado. Além disso, o derivado lácteo leva mais tempo para passar através do sistema digestivo que o leite, permitindo assim a discriminação mais eficaz de lactose (PRENTICE, 2014).

Deste modo, o uso de modelos *in vitro* é necessário para selecionar as estirpes mais promissoras. Assim, ensaios clínicos em humanos são a ferramenta definitiva para estabelecer funcionalidade do probiótico (FONTANA *et al.*, 2013)

Microrganismos probióticos, quando inseridos numa matriz alimentar como o leite, crescem devido à fermentação, e este processo envolve um número de vias metabólicas responsáveis de geração de metabólitos, que contribuem significativamente para as propriedades química, bioquímica e nutricional dos produtos fermentados. A capacidade desses microrganismos de produzir enzimas proteolíticas torna-os potenciais produtores de peptídeos bioativos, que podem ser liberados durante a fabricação de produtos fermentado (DE CASTRO; SATO, 2015).

2.5 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

A pesquisa de peptídeos tem sido um importante e diversificado campo de estudo dentro da bioquímica há muitas décadas (ZHANG *et al.*, 2018). Os peptídeos bioativos (PBAs) constituem-se de moléculas pequenas com peso inferior a 10 kDa e podem estar presentes em alimentos como componentes naturais criptografados nas sequências de aminoácidos das proteínas, e são liberados e/ou ativados por hidrólise enzimática, hidrólise microbiana e digestão intestinal (BASILICATA *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2016).

Os PBAs representam uma classe de moléculas muito procuradas na atualidade por pessoas que estão na constante busca por compostos saudáveis capazes de melhorar e manter

o estado de bem-estar e para prevenir o aparecimento de patologias degenerativas crônicas (BASILICATA *et al.*, 2018).

Por definição, PBAs são peptídeos derivados de proteínas alimentares que possuem propriedades farmacológicas benéficas além da nutrição normal e adequada (HARTMANN; MEISEL, 2007). Numa revisão, foram relatados vários estudos sobre PBAs utilizando fontes de proteínas marinhas (peixe, salmão, ostra, macroalgas, lulas, ouriço-do-mar, camarão e cavalo-marinho); plantas (soja, lentilhas, grão de bico, ervilha, feijão, aveia, trigo, sementes de cânhamo, canola e linhaça); e animais (proteínas do leite - caseína e soro de leite, ovo e músculo da carne) (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

A busca e seleção por proteínas alimentares como fontes de PBAs são realizadas com base em dois critérios principais: (1) uso de abundantes proteínas subutilizadas ou subprodutos de alimentos ricos em proteínas e (2) utilização de proteínas contendo sequências peptídicas específicas ou resíduos de aminoácidos de interesse farmacológico particular (UDENIGWE; ALUKO, 2012). Embora esses critérios sejam individualmente importantes, a combinação das duas abordagens pode levar à seleção estratégica de proteínas que podem produzir altos rendimentos de potentes sequências peptídicas definidas (NIELSEN *et al.*, 2017; UDENIGWE; FOGLIANO, 2017).

A atividade dos PBAs depende de sua composição e da sequência de resíduos de aminoácidos, e alguns deles são conhecidos por exibir propriedades multifuncionais (DE CASTRO; SATO, 2015). Estas moléculas podem exibir, entre outras, propriedades antimicrobiana, antioxidantes, hipotensivas, imunomoduladoras, antitrombóticas ou opióides e, conseqüentemente, exercer efeitos, atuando nos sistemas nervoso, digestivo, cardiovascular e imunológico (HAFEEZ *et al.*, 2014).

Alguns peptídeos na fase de ensaios clínicos mostraram resultados muito promissores para o tratamento de doenças cardiovasculares, infecciosas e metabólicas. Os PBAs têm importantes vantagens competitivas em relação aos medicamentos tradicionais devido as seguintes razões: 1) Eles têm alta especificidade para os seus tecidos alvo, resultando em pouca ou nenhuma toxicidade, e mesmo baixas concentrações podem ser efetivas. Esta característica é extremamente importante para o tratamento de doenças crônicas; 2) compostos químicos sintéticos que normalmente são usados como as drogas geralmente têm um efeito cumulativo sobre o organismo. As substâncias sintéticas podem representar um problema ambiental devido à sua excreção, ainda na forma ativa. Em contraste, os peptídeos

bioativos possuem pouca ou nenhuma acumulação no organismo e são facilmente degradados no ambiente (DE CASTRO; SATO, 2015).

Em particular, o leite e os produtos lácteos são considerados como a fonte de potentes peptídeos capazes de modular positivamente as funções fisiológicas e metabólicas e, assim, exercer efeitos benéficos sobre saúde humana (CAPRIOTTI *et al.*, 2016).

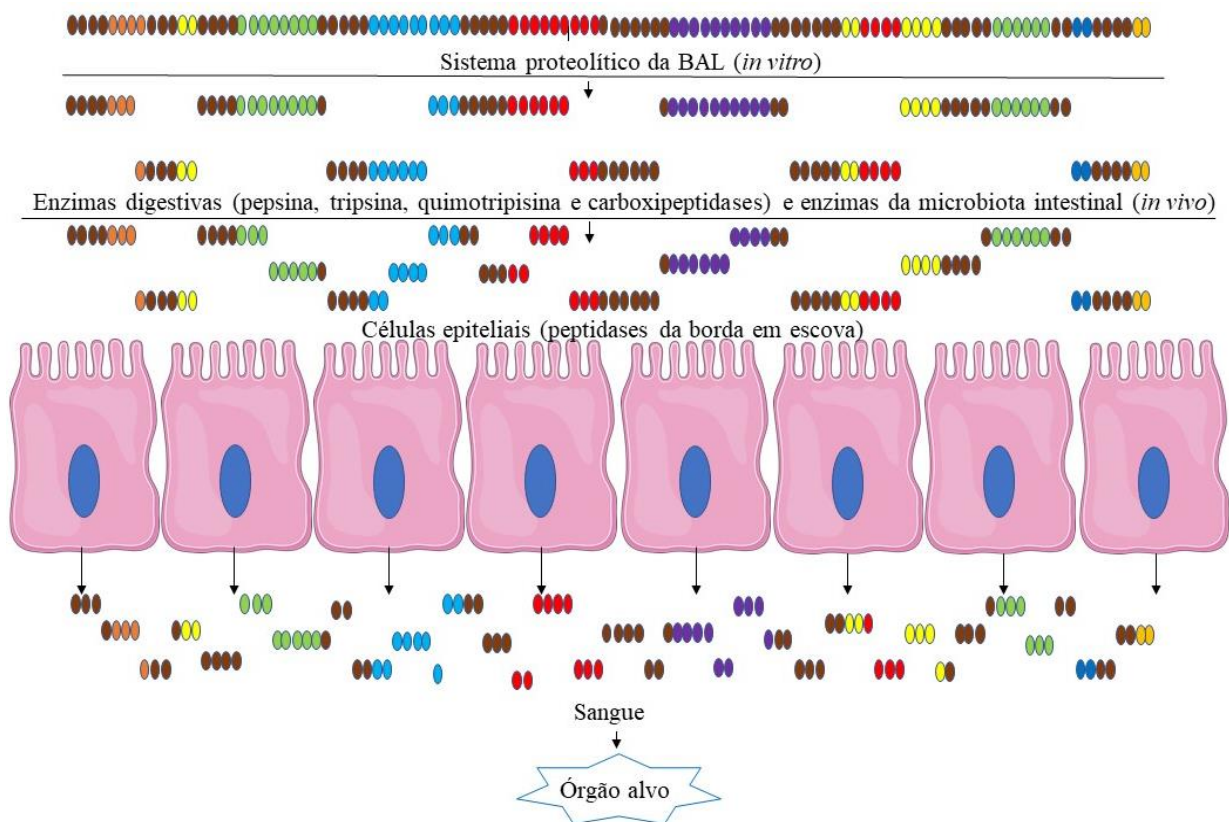
2.5.1 Peptídeos bioativos de leite

O leite contém aproximadamente 3,5% de proteína, dos quais 80% e 20% correspondem a caseína e proteínas de soro de leite, respectivamente. As caseínas são classificadas como α -, β - e κ -caseínas e nas proteínas do soro são encontradas α -lactoglobulina, β -lactoglobulina e α -lactoalbumina e várias proteínas menores com diferentes tipos de atividades como enzimas, propriedades de ligação mineral e imunoglobulinas (MOHANTY *et al.*, 2016).

Peptídeos bioativos derivados do leite geralmente são compostos de 2-20 aminoácidos por molécula (MOHANTY *et al.*, 2016), salvo em alguns casos que podem consistir em mais de 20, e geralmente são classificados em pequenos peptídeos (menos de 7 aminoácidos, os mais ativos, mas difíceis de analisar por abordagens proteômicas convencionais), peptídeos médios (7-25 aminoácidos) e peptídeos grandes (mais de 25 aminoácidos) (CAPRIOTTI *et al.*, 2016).

A liberação *in vivo* de PBAs envolve a digestão gastrointestinal (com enzimas digestivas como pepsina, tripsina, quimotripsina e peptidases da borda em escova intestinal) bem como enzimas derivadas da microbiota humana (Figura 11). Por outro lado, a produção *in vitro* dessa classe de moléculas inclui a hidrólise enzimática da proteína alimentar por enzimas endógenas presentes na matriz alimentar (Figura 11), bem como pela proteólise que ocorre durante o processamento de alimentos ou por ação de culturas “*starters*” como por exemplo os *Lactobacillus* spp. ou por enzimas proteolíticas isoladas de microrganismos (SÁNCHEZ; SAAVEDRA; CHIRALT, 2014).

Figura 11: Hidrolise de proteínas dos derivados lácteos pelo sistema proteolítico de bactérias ácido lácticas ou por várias enzimas digestivas durante o processo de digestão, que resulta na liberação de peptídeos bioativos



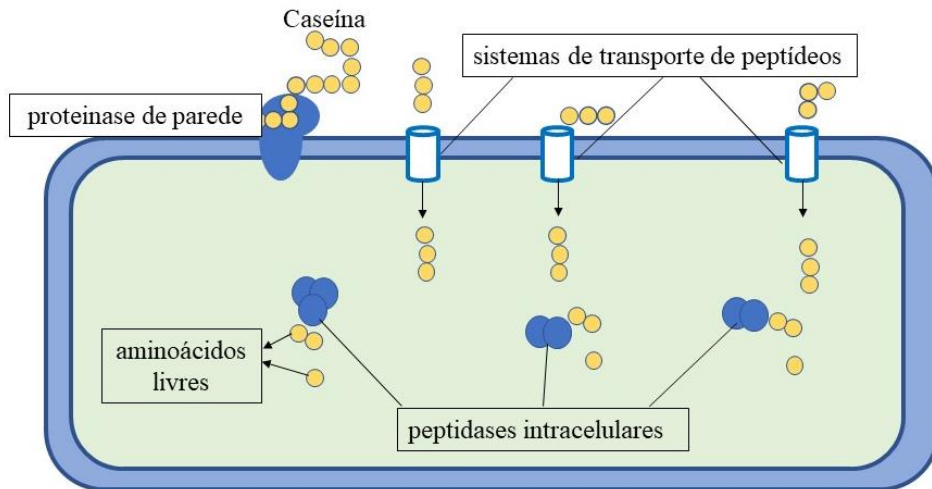
Fonte: O Autor (2018).

2.5.1.1 Liberação de peptídeos bioativos do leite por fermentação

Como o leite contém apenas pequenas quantidades de aminoácidos e peptídeos curtos, as bactérias ácido lácticas dependem de um sistema proteolítico complexo para obter aminoácidos essenciais a partir de caseínas, por exemplo, durante seu crescimento. Este sistema proteolítico especializado compreende três componentes principais (Figura 12): (1) uma proteinase associada à parede celular que está envolvida no primeiro passo da degradação da caseína; (2) sistemas de transporte de peptídeos para permitir a absorção dos peptídeos resultantes, e (3) várias peptidases intracelulares que degradam os peptídeos em fragmentos mais curtos e aminoácidos (SAAVEDRA *et al.*, 2013).

Este sistema proteolítico é necessário para o crescimento da BAL e também contribui para o desenvolvimento de sabor e textura dos produtos fermentados e produção de PBAs (MOHANTY *et al.*, 2016).

Figura 12: Representação esquemática do sistema proteolítico de bactérias ácido lácticas



Fonte: O Autor (2018).

Vários peptídeos anti-hipertensivos produzidos durante a fermentação do leite apresentaram uma forte atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina I (ECA), uma dipeptidil-carboxipeptidase que desempenha um papel importante na regulação da pressão arterial dentro do sistema renina angiotensina induzindo no sangue aumento de pressão (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014).

Kemgang *et al.* (2016) produziram um leite fermentado com o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* S1K3, e em seus resultados observação que o consumo deste produto protege ratos de adoecerem depois de serem contaminados por salmonela; eles atribuíram o melhoramento de mecanismos de proteção imune da mucosa intestinal aos peptídeos gerados no leite durante o processo fermentativo.

Peptídeos encontrados em frações menores de 3kDa de leite fermentado por estirpes de *L. plantarum* apresentaram múltiplas atividades biológicas tais como anti-inflamatórias, anti-hemolíticas, antioxidante, antimutagênica e antimicrobiana (AGUILAR-TOALÁ *et al.*, 2017).

Culturas mistas utilizadas na fermentação de leites também produziram potentes peptídeos bioativos. Chaves-López *et al.* (2014) quando produziram o leite fermentado utilizando bactérias e leveduras isoladas a partir de kumis, encontraram em seus resultados um extrato peptídico com atividade anti-hipertensiva com EC_{50} de 30,63 µg/mL.

O kefir como cultura probiotica complexa também tem sido útil na geração de PBAs durante a fermentação de leites. No estudo de Lima *et al.* (2017b), após a extração da fase aquosa de peptídeos de um leite de ovelha fermentado por grãos de kefir, observaram que estes extratos apresentaram atividades antioxidantes e antimicrobianas. Dallas *et al.* (2016) estudaram o perfil de PBAs formados a partir da fermentação do leite bovino por kefir, em seus resultados identificaram 29 peptídeos funcionais - incluindo funções antibacterianas, anti-hipertensivas, opiáceas e antioxidantes - derivados de α s1-, α s2-, β - e κ -caseína. Sete peptídeos funcionais desse estudo também estavam presentes no estudo de Ebner *et al.* (2015) que também estudaram o efeito do kefir na proteólise de leite bovino; o adicional deste estudo é que nele foram observados os fragmentos peptídicos e suas bioatividades foram encontradas também nos grãos e no leite bovino fresco.

2.5.2 Obtenção de peptídeos bioativos por simulação da digestão ou hidrólise enzimática

Saber se os peptídeos potencialmente bioativos resistem ao processo de digestão, ou identificar quais novos PBAs são liberados de um determinado produto através da digestão, é importante para o desenvolvimento de novos produtos lácteos com benefícios para a saúde (KOPF-BOLANZ *et al.*, 2014).

Atividades de PBAs testadas a partir de extratos alimentícios e peptídeos bioativos em experimentos gastrointestinais são duas importantes fatores que precisam ser considerados (JIN *et al.*, 2016). Como exemplo, a lactoquinina, um peptídeo resultante da clivagem da β -lactoglobulina, β -Lgf (142-148) que exibiu atividade inibitória *in vitro* contra a enzima conversora de angiotensina (ECA), demonstrou-se insuficientemente estável contra proteases do trato gastrointestinal. E após a simulação da digestão, a atividade residual anti-ECA foi completamente reprimida quando o peptídeo foi incubado com sangue humano, provando que proteinases e peptidases de soro degradam ainda mais os peptídeos circulantes (PICARIELLO *et al.*, 2010).

Os peptídeos bioativos podem ser liberados durante a digestão gastrointestinal pela ação de enzimas digestivas como a pepsina, tripsina ou quimotripsina. As proteínas dietéticas sofrem desnaturação na presença de ácido clorídrico secretado pelas células parietais do estômago. Este ácido, ativa o pepsinogênio e converte-o em sua forma ativa, a pepsina. A pepsina atua em proteínas metabolizando-as em peptídeos e aminoácidos. A digestão

gastrointestinal permite a consequente ação das enzimas presentes no intestino delgado, tais como tripsina ou quimotripsina, que são responsáveis pela hidrólise de proteínas (MOHANTY *et al.*, 2016).

Nas digestões gastrointestinais, as enzimas apresentam certas preferências para as proteínas do leite. Segundo o estudo de Jin *et al.* (2016) a β -caseína foi a proteína que liberou mais peptídeos durante a digestão gastrointestinal de um iogurte. O número de peptídeos liberados de caseínas foi consistente com o trabalho de Dupont *et al.* (2010) que relatam que a ordem de liberação de caseína em ensaios gastrointestinais é β -CN > α s1-> α s2-CN > κ -CN. As enzimas intestinais eram propensas a digerir β -CN, enquanto a clivagem da proteína κ -CN é preferida pelas bactérias ácido lácticas. A fermentação ajuda a pré- hidrolisar κ -CN que não é facilmente hidrolisado nos ensaios gastrointestinais (JIN, Y. *et al.*, 2016).

Vários PBAs (isto é, antibacterianos, imunomoduladores, anti-hipertensivo e opióides) são conhecidos por liberados de caseína e/ou soro de leite, proteínas por digestão gastrointestinal (HARTMANN; MEISEL, 2007; PICARIELLO *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2016; MOHANTY *et al.*, 2016).

A hidrólise enzimática é uma das técnicas mais rápidas, mais seguras e mais facilmente controladas para a produção de PBAs e pode ser usada para melhorar as propriedades funcionais e biológicas das proteínas, além de agregar valor aos subprodutos com baixo valor comercial (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; CORRÊA *et al.*, 2014; MEIRA *et al.*, 2012). As proteases catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e podem atuar sobre as ligações éster e amida. Todas as proteases têm um certo grau de especificidade para o substrato, geralmente com base na sequência de aminoácidos que circundam diretamente a ligação que é clivada (UDENIGWE; FOGLIANO, 2017).

A especificidade enzimática e as condições de hidrólise (pH, temperatura, tempo) influenciam o tamanho e as sequências de aminoácidos nas cadeias peptídicas, bem como a quantidade de aminoácidos livres, que podem afetar a atividade biológica dos hidrolisados (SARMADI; ISMAIL, 2010).

Na revisão de Saavedra *et al.* (2013) foi citado um peptídeo de 25 aminoácidos derivado da digestão da lactoferrina por pepsina, que apresentou uma excelente atividade antimicrobiana. A digestão da α -lactalbumina por pepsina, tripsina ou quimotripsina resulta na produção de PBAs com ambas as atividades imunomoduladoras e antimicrobianas contra bactérias, vírus e fungos.

O composto bioativo derivado do soro de leite é o tripeptídeo Ile-Pro-Ala, liberado da hidrólise de β -lactoglobulina, que pode atuar como inibidor de dipeptidil peptidase-4, reduzindo os níveis de glicose e estimulando a insulina (BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015). Outros tripeptídeos derivados da β -caseína Ile-Pro-Pro e Val-Pro-Pro, por ação de uma protease encontrada em *L. helveticus*, apresentaram capacidade anti-hipertensiva quando testados em ratos naturalmente hipertensos (MIYAZAKI *et al.*, 2017).

A literatura atual mostra que os peptídeos derivados de hidrolisados enzimáticos de proteínas alimentares possuem notáveis atividades multifuncionais relevantes para o sustento da saúde humana (NIELSEN *et al.*, 2017). Esta área de pesquisa está crescendo continuamente com a descoberta de novos alvos de doenças moleculares. Embora existam muitas informações sobre os vários PBAs derivados de proteínas alimentares, os futuros esforços de pesquisa devem ser direcionados para a avaliação de efeitos de promoção da saúde *in vivo*, biodisponibilidade e farmacocinética em indivíduos humanos, elucidação dos mecanismos moleculares de ação e em geral possível uso como agentes promotores da saúde em sistemas alimentares (UDENIGWE; ALUKO, 2012).

3 OBJETIVOS

Geral

Caracterizar os microrganismos, a bioquímica e a funcionalidade do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir após o processo de digestão *in vitro*.

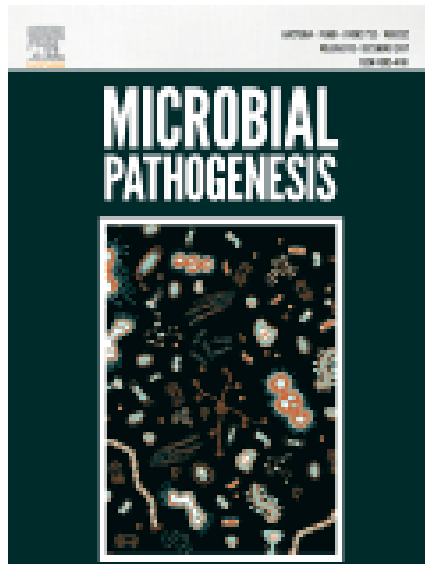
Específicos

- Produzir o leite fermentado utilizando como matéria prima leite UHT e leite de ovelhas mestiças da raça Bergamácia e grãos de kefir segundo a Patente BR 10 2013 015842-9;
- Realizar a digestão *in vitro* do leite UHT e leite de ovelha fermentado pelos grãos de kefir;
- Examinar os efeitos do processo de digestão *in vitro* dos leites fermentados sobre a composição microbiana e os peptídeos gerados a partir deste produto;
- Isolar bactérias e leveduras após o processo de digestão *in vitro* e avaliar as propriedades probióticas destes microrganismos;
- Caracterizar e identificar os microrganismos isolados após o processo de digestão *in vitro*;
- Avaliar a capacidade antagônica dos microrganismos isolados, na inibição de bactérias patogênicas;
- Estimar a atividade antioxidante dos microrganismos isolados após o processo digestivo;
- Verificar se os microrganismos isolados produzem a enzima β -galactosidase e quantificar a atividade enzimática;
- Observar a capacidade de adesão dos microrganismos isolados por meio de testes de auto-agregação, hidrofobicidade e adesão em células epiteliais de intestino de camundongos;
- Verificar o perfil peptídico dos peptídeos extraídos antes e após o processo de digestão *in vitro* por eletroforese monodimensional (SDS-PAGE);
- Extrair os peptídeos do leite fermentado após processo de digestão *in vitro* por ultrafiltração;
- Identificar o perfil dos peptídeos extraídos por ultrafiltração a partir dos eventos de digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir por espectrometria de massas (Maldi-ToF) e comparar com a literatura os principais íons observados;
- Avaliar as atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e anti-hemolítica dos peptídeos extraídos por ultrafiltração do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir durante os eventos de digestão *in vitro*.

4 PUBLICAÇÕES

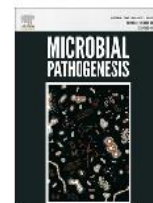
4.1 CAPÍTULO I

Artigo publicado na revista “Microbial Pathogenesis”



Fator de impacto: 2,009 (2016)

Qualis B2 em Ciências Biológicas I



Saccharomyces cerevisiae from Brazilian kefir-fermented milk: An *in vitro* evaluation of probiotic properties

Meire dos Santos Falcão de Lima^a, Karoline Mirella Soares de Souza^b,
Wendell Wagner Campos Albuquerque^b, José Antônio Couto Teixeira^c,
Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{a,b}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,b,*}

^a Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil

^b Department of Morphology and Animal Physiology (DMFA), University Federal Rural of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil

^c Center of Biological Engineering, University of Minho, Campus of Gualtar, Braga, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2017

Received in revised form

17 March 2017

Accepted 2 May 2017

Available online 4 May 2017

Keywords:

Kefir

In vitro digestion

Probiotic

Yeast

Saccharomyces cerevisiae

ABSTRACT

The therapeutic use of probiotics for supporting the antibiotic action against gastrointestinal disorders is a current trend and emerging applications have gained popularity because of their support for various microbiological activities in digestive processes. Microorganisms isolated from kefir with great probiotic properties, in addition to high resistance to harsh environmental conditions, have been widely researched. Administration of probiotic yeasts offers a number of advantages, when compared to bacteria, because of particular characteristics as their larger cell size. In the present study, 28 strains of *Saccharomyces cerevisiae* were isolated, after *in vitro* digestion of kefir-fermented milk, and identified by molecular based approaches. A screening was performed to determine important quality requirements for probiotics including: antagonistic and antioxidant activities, β -galactosidase synthesis, autoaggregation, surface hydrophobicity and adhesion to epithelial cells. The results showed strains: with antagonistic activity against microbial pathogens such as *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; able to produce β -galactosidase; with antioxidant activity levels higher than 90%; with hydrophobicity activity and autoaggregation ability (evaluated by adhesion test, where all the strains presented adhesion to mice ileal epithelial cells). These findings are relevant and the strains are recommended for further *in vivo* studies as well as for potential therapeutic applications.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Probiotics are live microorganisms which, when administered in suitable doses, provide benefits to human and animal health [1]. To act in a positive way, probiotics need to be alive to create a symbiotic balance in the host's digestive tract [2], what emphasizes the importance of the microbial viability during the gastrointestinal transit, mainly in case of oral administration.

Microbial survival rate depends on the administration regimen, thereby the use of synbiotic matrices for probiotic application and maintenance of microbial viability has become significant [3]. A well known matrix for distribution of probiotics is the kefir, a fermented milk obtained by incubation of milk with kefir grains

(protein and polysaccharide matrix containing bacteria and yeasts) [4].

Microorganisms in the kefir grains proliferate and produce enzymes and other biogenic elements causing physicochemical changes in the environment. For this reason, kefir has been increasingly applied to medical benefits, since it represents a great source of natural probiotics and can be easily digested. Another particular characteristic of kefir is that its grains can be recovered after fermentation, making the process profitable [5].

Among the most common probiotics used, some species of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* and the yeast *Saccharomyces boulardii* have been often reported [6]. Yeasts are particularly promising because they are not affected by antibacterial agents [7], and this property is relevant since some therapies combine the administration of probiotics with antibiotics in the treatment of gastrointestinal infections. The use of yeasts is also advantageous because their genetic material can not be transferred

* Corresponding author. Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos 52171-900, Recife, PE, Brazil.

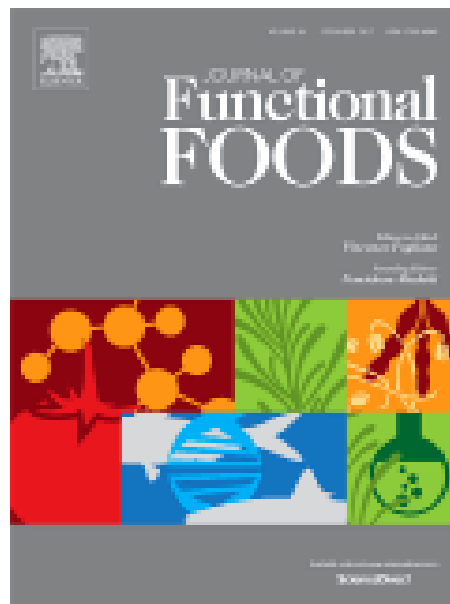
E-mail address: anaporto@dmfa.ufrpe.br (A.L.F. Porto).

4.1.1 Resumo

O uso terapêutico de probióticos para apoiar a ação antibiótica contra distúrbios gastrointestinais é a tendência atual e as aplicações emergentes ganharam popularidade por causa de seu apoio a várias atividades microbiológicas em processos digestivos. Os microrganismos isolados a partir de fármacos com excelentes propriedades probióticas, além de alta resistência a condições ambientais severas, foram amplamente pesquisados. A administração de leveduras probióticas oferece uma série de vantagens, em comparação com as bactérias, devido a características particulares para o tamanho de células maiores. No presente estudo, isolaram-se 28 cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, após a digestão *in vitro* de leite fermentado com kefir, estas cepas foram identificadas por análises fisiológicas e genéticas. Foi realizada uma triagem para determinar os requisitos de qualidade importantes de probióticos, incluindo: atividades antagônicas e antioxidantes, síntese de β -galactosidase, auto-agregação, hidrofobicidade superficial e adesão às células epiteliais. Os resultados mostraram cepas com atividade antagonista contra patógenos microbianos tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*; capaz de produzir β -galactosidase; com níveis de atividade antioxidante superiores a 90%; com atividade de hidrofobicidade e capacidade de auto-agregação (avaliada por teste de adesão, onde todas as cepas apresentaram adesão a células epiteliais ileais de camundongos). Esses achados são relevantes e as cepas são recomendadas para estudos *in vivo* adicionais, bem como para possíveis aplicações terapêuticas.

4.2 CAPÍTULO II

Artigo enviado para a revista “Journal of Functional Foods”



Fator de impacto: 3,144 (2016)

Qualis A2 em Ciências Biológicas I

Leite de ovelha fermentado por kefir: um produto que é fonte de *Lactobacillus rhamnosus* probióticos

Meire dos Santos Falcão de Lima¹, Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{1,2}, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{1,2,*}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

² Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos (LABTECBIO). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Recife, Brasil.

*Autor Correspondente: Ana Lúcia Figueiredo Porto, Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos 52171-900, Recife-PE, Brasil. Fone: +55.81.3320.6345. E-mail: ana.porto@pq.cnpq.br

4.2.1 Resumo

Três lactobacilos foram isolados após digestão *in vitro* de leite de ovelha fermentado por grãos de kefir e identificados como *Lactobacillus rhamnosus*. Os ensaios caracterizaram essas cepas como probióticas, uma vez que toleraram pH ácido e sais biliares; são suscetíveis a antibióticos; possuem atividades antagonista, atividade antioxidante, presença de enzima β -galactosidase e outros testes revelaram capacidade de adesão. Todas as cepas apresentaram atividade antioxidante e sobreviveram em diferentes pH e na concentração de 0.30% de sais biliares. Essas cepas podem ser consideradas seguras porque eram suscetíveis aos antibióticos testados; e possuem atividade antagônica a patógenos e elevada atividade de β -galactosidase. Quanto aos critérios de adesão (hidrofobicidade e auto-agregação), destacou-se *L. rhamnosus* Lb16, que também aderiu às células do epitélio intestinal de camundongos. Estas descobertas importantes contribuem para o estudo de probióticos isolados de leite de ovelha fermentado por grãos de kefir. A análise de *L. rhamnosus* Lb16 pode ajudar a indústria de laticínios a aumentar os potenciais benefícios para a saúde humana de seus produtos.

Palavras Chave: kefir, leite de ovelha, digestão *in vitro*, probióticos, *Lactobacillus rhamnosus*.

4.2.2 Introdução

Os pedidos dos consumidores por produtos alimentares saudáveis que previnem doenças aumentaram no início do século XXI (GUERIN *et al.*, 2017). Estes modernos consumidores esperam que seus produtos alimentícios melhorem sua saúde, os alimentos que promovem a saúde além da nutrição básica são definidos como "alimentos funcionais" (Marino *et al.*, 2017). O conceito de alimentos funcionais inclui alimentos ou ingredientes alimentares que contêm: probióticos, prebióticos e simbióticos, ou compostos bioativos, como antioxidantes, minerais, vitaminas e peptídeos ativos (MATEJČEKOVÁ; LIPTÁKOVÁ; VALÍK, 2017).

Kefir é um exemplo de um alimento funcional que é caracterizado como probiótico (Zheng *et al.*, 2013). É um produto lácteo fermentado originário do norte do Cáucaso. O nome kefir é derivado da palavra turca keyif, que significa “boa sensação” porque é dito que as pessoas que bebem se sentem bem depois (LEITE *et al.*, 2015).

O Kefir é feito por microrganismos fermentadores, bactérias ácidas lácticas (BAL), bactérias ácido acéticas e leveduras, que atuam em simbiose, em um polissacarídeo complexo formando os grãos de kefir (DALLAS *et al.*, 2016). Esta bebida pode fornecer cepas benéficas com características probióticas. Diz-se que esta bebida incita vários tipos de atividade que inclui a de proteção à saúde, e que as pessoas que consomem o kefir em sua dieta vivem muito mais tempo (ZHENG *et al.*, 2013). Foi afirmado que o kefir reduz os sintomas de intolerância à lactose, estimula o sistema imunológico, reduz os níveis de colesterol e tem propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas (GUZEL-SEYDIM *et al.*, 2011). Além disso, contribui para equilibrar a microbiota intestinal (URDANETA *et al.*, 2007) e a atividade antimicrobiana contra microrganismos patogênicos (CHIFIRIUC; CIOACA; LAZAR, 2011; LEITE *et al.*, 2015).

Esta bebida de kefir pode ser formulada com vários tipos de leite (SATIR; GUZEL-SEYDIM, 2016). No entanto, para essa formulação, o leite de ovelha é considerado um produto de alta qualidade devido aos seus ácidos graxos de cadeia curta (que proporcionam fácil digestão) e tem uma alta quantidade de sólidos totais (VARGA; SÜLE; NAGY, 2014). Assim, o leite de ovelha fermentado pelo kefir pode ser um "transportador" alimentar de probióticos.

Para um microrganismo ser considerado probiótico, ele deve resistir às condições de fabricação de alimentos. Da mesma forma, que esses microrganismos sejam viáveis e funcionais quando inseridos na matriz alimentar (SUMERI *et al.*, 2010), eles também devem

ser resistentes a fluidos no trato gastrointestinal (trato GI), ou seja, devem ser capaz de tolerar o ácido e a ação de enzimas digestivas, como pepsina e pancreatina, e sais biliares (XIE; ZHOU; LI, 2012); e para exercer sua atividade probiótica, um número suficiente de bactérias precisa ser viável quando atingir o intestino (GUERIN *et al.*, 2017), a fim de conferir benefícios ao hospedeiro (GOLOWCZYC *et al.*, 2011). A capacidade de os microrganismos sobreviver e crescer depende em grande parte de sua capacidade de se adaptar a ambientes em mudança (SUMERI *et al.*, 2010), enquanto a possível resistência que podem ter aos antibióticos é sua principal característica indesejável (BOTTA *et al.*, 2014).

Outros atributos que um probiótico deve possuir variam desde sua capacidade de interagir positivamente com os microrganismos em humanos, ou até serem antagônicos contra microrganismos patogênicos (HARZALLAH; BELHADJ, 2013), ou combater radicais livres gerados durante o processo digestivo (AMARETTI *et al.*, 2013), e auxiliar na digestão da lactose por apresentar a enzima β -galactosidase (MEIRA *et al.*, 2012).

Lactobacilos juntamente com Bifidobacteria são bem conhecidos por seus efeitos probióticos (AMARETTI *et al.*, 2013), enquanto *Lactobacillus* spp. são considerados Geralmente Considerados Seguros (GRAS) (ARCHER; HALAMI, 2015), já que têm sido utilizados como cultura fermentadora há cerca de 8.000 anos (DUNNE *et al.*, 2012) e é conhecido há séculos que eles promovem a boa saúde e previnem doenças em humanos (KUMAR; KUMAR, 2015).

Além de que, pesquisas sobre cepas que expressam características únicas que podem aumentar ou trazer benefícios à saúde estão sendo realizadas pela caracterização de produtos lácteos fermentados naturais, como o kefir. Esse produto tradicional pode ser uma fonte interessante de linhagens de BAL com propriedades funcionais específicas (LEITE *et al.*, 2015). Assim, este estudo propõe o isolamento de cepas de *Lactobacillus* spp. com características probióticas. As cepas serão isoladas após a simulação da digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado pelos grãos de kefir. O potencial probiótico dos microrganismos serão avaliados quanto à resistência a ácidos, resistência à bile, susceptibilidade a antibióticos, antagonismo contra patógenos microbianos, atividade antioxidante, produção de enzimas β -galactosidase. Suas propriedades adesivas (hidrofobicidade, auto-agregação e adesão a células epiteliais intestinais).

4.2.3 Material e métodos

4.2.3.1 Leite de ovelha fermentado

O leite de ovelha foi adquirido em uma fazenda na cidade de Vitória de Santo Antão - PE/ Brasil. A qualidade das amostras de leite foi medida no Laboratório de Progene da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Brasil). Os grãos de kefir foram obtidos de um domicílio particular em Pernambuco (Brasil), e o leite de ovelha foi fermentado de acordo com o método de Lima *et al.* (2017).

4.2.3.2 Digestão *in vitro* de leite fermentado

O leite de ovelha fermentado com kefir foi usado em um experimento para simular a digestão *in vitro* com uma contagem inicial de bactérias lácticas de $8,5 \times 10^8$ UFC/ mL. A simulação *in vitro* da digestão humana foi realizada com base no método de Saito *et al.* (2014) adaptado por Lima *et al.* (2017), diluindo o leite fermentado (suspensão de kefir) 1: 1 em solução eletrolítica estéril, 0,6% (p/ v) de pepsina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), que foi então incubada por 5 min em 37 °C. Em seguida, o pH foi ajustado para pH 2,0 usando diferentes volumes de soluções de HCl (1M e 5M), para ter um controle rígido de pH. Após 90 min de incubação, 1,5 mL da solução foram colhidos por centrifugação e depois lavados duas vezes com solução salina com fosfato tamponada (PBS pH 7,4) estéril, e ressuspensos com 1,5 mL de sais biliares a 1% (p/ v) (Merck, Darmstadt, Alemanha) em tampão PBS, pH 8. A solução foi finalmente diluída numa secreção duodenal artificial (pH 8,0) consistindo em: tampão PBS, 0,3% (p/ v) de sais biliares e 0,1% (p/ v) de pancreatina (Sigma-Aldrich , St. Louis, EUA). Após 90 min de incubação a 37 °C, uma alíquota de 100 µL foi pipetada para fora e diluída em série em solução aquosa de peptona a 0,1% e placa espalhada em ágar MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha) suplementada com 200 mg/ L de Cicloxemida (C104450 Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) para determinar a UFC/ mL.

4.2.3.3 Purificação e identificação de bactérias do ácido láctico resistentes à digestão

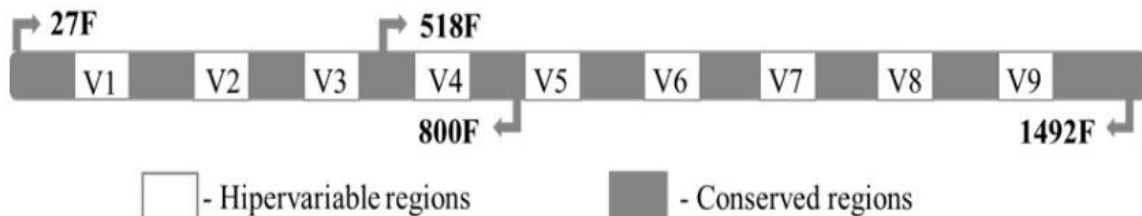
Após os procedimentos de digestão *in vitro*, foram obtidas de cada placa de Petri, após o período de crescimento, 24 cepas, que foram cultivadas pelo método pour-plate e incubadas a 37 °C por 48 horas em Agar MRS suplementado com Cicloxemida (200 mg/ L) para inibir o crescimento de leveduras. Este procedimento de purificação das colônias, foi realizado duas

vezes, sendo as colônias submetidas à coloração de Gram e ao teste de catalase. Posteriormente, após confirmar que todas as colônias eram Gram positivas e catalase negativas, e com morfologia em forma de bastonete, foram então denominadas *Lactobacillus* spp. Após a realização de testes de resistência a antibióticos (dados não mostrados), três linhagens com diferentes perfis de resultados (Lb2, Lb16 e Lb24) foram selecionadas para realizar este estudo.

A identificação molecular dos três *Lactobacillus* spp. foi realizada. A análise molecular baseou-se nos seguintes passos: 1) Purificação do DNA. Um perfurador foi usado para tirar uma amostra de 2 mm da cultura de células armazenada em um Micro Cartão Indicador FTATM (GE Healthcare, EUA). Os ácidos nucleicos foram purificados usando o FTA Purification Reagent (GE Healthcare, EUA). 2) Após a purificação do DNA, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de um segmento do gene 16S rDNA contendo as regiões variáveis V1 a V9 (Figura 1) foi amplificada. 3) Os produtos da PCR: O sequenciamento de DNA Sanger (sentido e anti-sentido) dos produtos amplificados foi purificado e analisado em gel de agarose. 4) Um kit BigDye Terminator 3 (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado para alinhar sequências e gerar a sequência de consenso e os fragmentos foram sequenciados no analisador de DNA 3730XL (Applied Biosystems, EUA). 5) As sequências geradas foram alinhadas usando o software Sequencer 5.0 (GeneCodes, EUA), para obter a sequência de consenso usando o banco de dados BLAST NCBI (Centro Nacional de Informações de Biotecnologia) correspondente. Todos estes procedimentos foram realizados pela empresa STAB VIDA (Oeiras, Portugal).

Figura 1. Representação esquemática do gene 16S rDNA bacteriano e a localização de primers de sequenciamento. Um produto de PCR inicial de 1465 pares de bases é amplificado a partir do DNA bacteriano com os iniciadores 27F e 1492R. O amplicon resultante é sequenciado usando os quatro primers representados.

A sequência de consenso é obtida a partir do conjunto que cobre toda a região amplificada



Fonte: STAB VIDA (2017).

4.2.3.4 Cepas bacterianas e meios de cultura

As cepas indicadoras: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 6057, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus* ATCC 33019, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella enterica* serovarTyphimurium ATCC 14028, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, que foram mantidas na coleção de cultura do laboratório, foram usados como cepas indicadoras de atividade antagonista. As culturas de lactobacilos foram cultivadas e mantidas em meio MRS (Himedia, Mumbai, Índia), enquanto as estirpes indicadoras foram armazenadas em meio de infusão cérebro-coração (BHI) (Himedia, Mumbai, Índia) como estoques de glicerol a -20 °C até análise posterior. Antes da análise, as culturas foram propagadas em seus respectivos meios uma vez.

4.2.3.5 Tolerância a ácidos e bile

Os três isolados foram investigados quanto à tolerância ao sal biliar, seguindo o método de Vinderola e Reinheimer (2003) adaptado por Kumar e Kumar (2015). Por breves instantes, foram adicionados 0,2 mL de cada suspensão de inóculo isolado ($\sim 10^8$ UFC/ mL) a 10 mL de caldo MRS contendo diferentes concentrações de sal biliar (0,15; 0,30 e 0,45% p/v) e caldo MRS sem sal biliar como controle e incubado a 37 °C durante 24 h. A absorbância foi registrada a 600 nm em um espectrofotômetro UV/ Visível BEL Photonics 2000 UV (Bel Photonics do Brasil Ltda., Osasco, SP, Brasil), após incubação e comparado com o controle. Os isolados de *Lactobacillus*, que apresentarem resistência superior a 50% a 0,3% (p/v) de sais biliares, serão considerados resistentes à bile, pois este é o limiar mínimo acima do qual uma cultura é considerada probiótica.

A capacidade dos isolados de tolerar os valores de pH ácido foi determinada conforme descrito por Sieladie *et al.* (2011). Por breves instantes, 1 mL de inóculo ($\sim 10^8$ UFC/ mL) de cada isolado foi transferido para 10 mL de caldo MRS a pH 2, 3 e 5 respectivamente e a amostra foi removida após 24 h de incubação a 37 °C e a absorbância das amostras foi medida a 600 nm, contra o controle (pH 7,0). Isolados mostrando resistência superior a 50% em pH 3 foram considerados cepas tolerantes a ácidos. A percentagem de tolerância aos sais biliares e pH ácido foram calculados de acordo com as Equações (1) e (2), respectivamente

$$(1) \quad \% \text{ Tolerância aos sais biliares} = \frac{\text{amostra em caldo MRS com bile}}{\text{amostra em caldo MRS broth sem bile}} \times 100$$

$$(2) \quad \% \text{ Tolerância ao pH ácido} = \frac{\text{pH } 2; 3; 5}{\text{pH } 7} \times 100$$

4.2.3.6 Ensaio de resistência à antibióticos

O teste de susceptibilidade antibiótica das cepas de *Lactobacillus* spp. foram realizadas pelo método de difusão em disco preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) com algumas modificações. As culturas bacterianas com 24 h de crescimento foram utilizadas com aproximadamente 10^8 UFC/ mL. As suspensões foram semeadas em placas de agar MRS usando *swab*. Discos antibióticos contendo cefalexina (30 µg), gentamicina (30 µg), rifampicina (5 µg), penicilina G (10 U), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg) e clindamicina (2 µg) foram colocados na superfície das placas e incubados a 37 °C por 24 h sob incubadora microbiológica em condições aeróbicas. Todos os discos de antibióticos foram comprados da Laborclin (São Paulo, Brasil). Os halos de inibição de todos os discos de antibiótico foram medidos em duplicata.

4.2.3.7 Atividade antagônica

O espectro antagonista de *Lactobacillus* spp. foi avaliado pelo teste *spot-on-the-lawn*, de acordo com Tulini *et al.* (2013), utilizando cepas de patógenos indicadoras. Cinco microlitros de uma cultura crescida durante a noite em caldo MRS foram colocados sobre um disco de papel de filtro (6 mm) em placas de agar MRS. Após incubação a 37 °C por 24 h sob condições aeróbicas, as placas foram cobertas com 7 mL de ágar BHI mole (1 por cento de ágar bacteriológico p/ v, Himedia) semeado com a cepa indicadora (10^7 UFC/ mL), seguido de incubação a 37 °C durante 24 h. Halos de inibição <11 mm, foram indicativos de que os lactobacilos não apresentavam antagonismo; halos 11-13 mm, mostram que a cepa indicadora possui suscetibilidade intermediária e halos > 13 mm, mostram que a cepa indicadora é suscetível à cepa de lactobacilo (TULINI *et al.*, 2013).

4.2.3.8 Atividade antioxidante

Para avaliar a atividade antioxidante, realizada um teste de redução percentual do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) com o protocolo descrito por Gil-Rodríguez, Carrascosa e Requena (2015). Resumidamente, 1 mL de cultura de lactobacilos em caldo

MRS foi colhido por centrifugação (14.560 g durante 5 min a 4 °C), lavado duas vezes com uma solução estéril de PBS pH 7,4 e o sedimento resultante foi então ajustado para aproximadamente 10^8 UFC/ mL em 1 mL da mesma solução. A suspensão de células (800µL) foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 1 mL de uma solução de DPPH a 2 mM em metanol. A mistura foi submetida à vórtex e depois incubada durante 30 min temperatura ambiente no escuro. Os tubos de reação foram centrifugados (14.560 g durante 5 min a 4 °C) e 300 µL do sobrenadante foram transferidos para placas de 96 poços a fim de medir a absorbância a 517 nm num leitor de microplacas. Uma curva padrão de DPPH foi obtida usando concentrações conhecidas de 0 a 60 µM em intervalos de 10 µM. A porcentagem de redução do DPPH foi calculada da seguinte forma:

$$(3) \quad \%AA = \{[Abs_i - (Abs_s - Abs_b)]/Abs_i\} \times 100$$

onde Abs_i é a absorbância inicial (soluções metanólicas + DPPH), Abs_s é a absorbância da mistura (amostra + DPPH) e Abs_b é o valor de absorbância da amostra em branco.

4.2.3.9 Atividade da enzima β -galactosidase

O substrato *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo (ONPG) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi usado para determinar a atividade β -galactosidase como descrito por Nagy *et al.*, (2001). Extratos livres de células foram preparados por sonicação (sonicador, Bandelin electronic; Berlin, Alemanha) para romper as células. Resumidamente, 1 mL de culturas de lactobacilos cultivados durante a noite em caldo MRS foi colhido por centrifugação (14.560 g durante 10 min a 4 °C), lavado duas vezes com tampão fosfato 1 mM, pH 7,0 e ressuspensão no mesmo tampão. A suspensão celular foi sonicada a uma amplitude de vibração de aproximadamente 30% durante 6 minutos, em intervalos de 30s ligados e 30s desligados. Os detritos celulares foram separados por centrifugação a 14.560 g durante 10 min a 4 °C. Os extratos celulares foram mantidos em gelo até incubação (durante 30 min a 37 °C).

A mistura reacional continha 50 µL de amostra, e 50 µL de ONPG a 3 mM em tampão de fosfato 1 mM, pH 7,0. A reação foi parada através da adição de 200 µL de carbonato de sódio a 1 mM. A absorbância das amostras foi medida a 405 nm num leitor de microplacas. Uma curva padrão de *o*-nitro-fenol (ONP, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi obtida usando concentrações conhecidas de ONP, de 0,05 a 2 µM em intervalos de 0,05 µM, calculados usando um coeficiente de extinção de 4,0143 mmol/ cm. Uma unidade enzimática foi definida

como uma atividade específica (proteína U/ mg): 1 U é equivalente a 1 μ M de ONP produzido por minuto.

4.2.3.10 Hidrofobicidade da superfície celular *in vitro*

Os isolados foram selecionados quanto à hidrofobicidade da superfície celular, utilizando o método de adesão bacteriana ao hidrocarboneto (xileno), baseado em Rosenberg, Gutnick e Rosenberg (1980). Resumidamente, os isolados de lactobacilos foram crescidos durante a noite a 37 °C em caldo MRS, lavados com solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS, pH 7,2), colhidos e ressuspensos no mesmo tampão. A suspensão foi então ajustada para aproximadamente 10⁸ UFC/ mL (absorbância a 600 nm = A1). Alíquotas (3 mL) das suspensões bacterianas foram adicionadas a 1 mL de xileno. A solução foi misturada usando um misturador de vórtex durante 60 s. Os tubos foram deixados em repouso a 37 °C durante 2 horas para separar as duas fases. A fase aquosa foi cuidadosamente removida e mediu-se a absorbância a 600 nm da fase aquosa (A). O Índice de Hidrofobicidade (HPBI) foi calculado da seguinte forma:

$$(4) \quad \%HPBI = [(A1 - A2)/A1] \times 100$$

Isolados com um HPBI maior que 70% foram arbitrariamente classificados como em Pringsulaka *et al.* (2015), como sendo altamente hidrofóbico; os isolados com HPBI entre 50 e 70% foram classificados como moderados; e isolados com HPBI menores que 50% foram classificados como de baixa hidrofobicidade. Alta hidrofobicidade tem sido sugerida como um indicador de boa capacidade de adesão.

4.2.3.11 Ensaio de auto-agregação

Uma triagem preliminar de cepas potencialmente aderentes deve ser realizada para identificar sua capacidade de auto-agregação e hidrofobicidade superficial. Como descrito por Meira *et al.* (2012), as cepas de lactobacilos foram coletadas por centrifugação (14.560 g por 10 min a 4 °C), lavadas duas vezes e ressuspensas em tampão fosfato 1 mM (pH 7,2). Os ensaios de auto-agregação foram realizados a 20-25°C em tampão fosfato 1 mM (pH 7,2). Em todos os ensaios, a concentração inicial de microrganismos foi padronizada para absorbância a 600 nm = 0,25 aproximadamente. O ensaio de auto-agregação foi realizado da seguinte forma: as suspensões de células bacterianas (3 mL) foram incubadas a 37 °C, e os valores de absorbância a 600 nm da camada superior foram medidos em diferentes intervalos de tempo

(2, 16, 20 e 24 h) em um espectrofotômetro UV / Visível (Bel Photonics, Osasco, Brasil). A porcentagem de agregação (% A) foi calculada como sugerido por Golowczyc *et al.* (2009):

$$(5) \quad \%A_t = [1 - (Abs_t/Abs_i)] \times 100$$

onde Abs_i corresponde a absorbância inicial da suspensão microbiana e Abs_t corresponde a absorbância no tempo *t*.

4.2.3.12 Ensaio de aderência *in vitro* em células epiteliais

A adesão dos lactobacilos às células epiteliais ileais de camundongos, foi avaliada utilizando camundongos albinos suíços machos e fêmeas com oito semanas de idade (30-40 g de peso corporal). Eles foram alimentados com uma dieta balanceada convencional (16% de proteína, 56% de carboidratos, 2% de gordura, 5,3% de celulose e 5% de vitaminas e minerais) e água da torneira *ad libitum* para melhorar sua adaptação. Três a quatro ratinhos foram alojados por gaiola de policarbonato, com aparas de madeira macia como leito, num espaço com ar condicionado a 23-25 °C, umidade do ar de 50-60% e sob um ciclo de 12 h claro/ escuro. Seus intestinos foram coletados imediatamente após a eutanásia de acordo com os princípios éticos de experimentação animal do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e a aprovação prévia do Comitê de Estudos de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (protocolo número 23076.017009/ 2012-13).

As células epiteliais foram preparadas conforme descrito por Mäyrä-Mäukinen, Mnninen e Gyllenberg (1983), conforme aperfeiçoado por Kumar e Kumar (2015). Um pequeno segmento de íleo de camundongos *Mus musculus* foi aberto, lavado duas vezes com PBS esterilizado (1 mM, pH 7,2) e incubado em PBS a 4 durante 30 min para remover o muco superficial. As células epiteliais foram raspadas com a borda de uma lâmina de microscópio, depois suspensas em PBS e examinadas microscopicamente para assegurar a remoção de bactérias aderentes. Além disso, 1 mL de cada inoculo bacteriano (10⁸ UFC/ mL) e a suspensão de células epiteliais foram misturados, incubados a 37 °C e agitados num agitador a 40 rpm durante 30 min. A adesão das estirpes foi estudada microscopicamente após terem sido coradas com Gram e após o ensaio ter sido revestido com ouro. Micrografias das células com *Lactobacillus* spp. foram obtidos com um microscópio eletrônico de varredura (Tescan, VEGA 3, Brno, República Checa).

4.2.3.13 Análise estatística

A análise de variância One-way (ANOVA) foi usada para analisar os dados. Múltiplas comparações foram realizadas com o teste de Tukey. Todas as análises estatísticas foram realizadas Statistica software (version 8.0, Statsoft Inc., 2008). A significância estatística foi estabelecida em $P < 0,05$ e os resultados expressos como média $\pm$ DP (desvio padrão).

4.2.4 Resultados

4.2.4.1 Identificação das bactérias ácido lácticas resistentes à digestão

O efeito das sucessivas passagens através da saliva artificial e da fase gástrica reduziu o número de colônias para $1,1 \cdot 10^6$ UFC/ mL, enquanto a fase pancreática e os sucos do duodeno reduziram a viabilidade para $2,5 \cdot 10^5$ UFC/ mL. Portanto, apenas vinte e quatro *Lactobacillus* spp. Os microrganismos que sobreviveram a este modelo *in vitro*, dos quais, três foram selecionados (de acordo com o item 2.3) para um estudo mais aprofundado de suas características probióticas.

Após purificação, avaliação de suas características morfológicas e fisiológicas; e identificação de sua taxonomia molecular, três espécies (Lb2, Lb16 e Lb24) foram identificadas com base em 100% de identidade de sequências 16S de rDNA, como *Lactobacillus rhamnosus* quando comparadas a sequências de bancos de dados (acesso do GenBank nº. CP020464.1).

4.2.4.2 Tolerância a acidez e bile

A sobrevivência de *Lactobacillus* spp. ao ácido é importante para suportar o estresse inicial do baixo pH do estômago. As taxas de sobrevivência de três estirpes sob diferentes valores de pH são mostradas na Tabela 1. Todas as estirpes foram cultivadas e testadas para diferentes pH, mas as taxas de sobrevivência a pH 2 apresentaram uma significância diferente. A cepa *L. rhamnosus* Lb16 apresentou uma resistência significativamente maior ($p < 0,05$) ao pH ácido quando comparada às demais cepas. Em pH 3 e pH 5 não houve diferença significativa entre os dados, mas todas as cepas apresentaram tolerância sob pH 5.

Tabela 1 Percentagem de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* resistentes ao ácido e bile depois de 24h de incubação a 37°C em caldo MRS

Cepas	Tolerância ao ácido (%) [#]			Tolerância à bile (%) [#]		
	pH 2	pH 3	pH 5	0.15%	0.30%	0.45%
Lb2	1,13 ± 0,01 ^a	1,15 ± 0,06 ^a	100,00 ± 14,88 ^a	77,89 ± 18,57 ^a	21,23 ± 6,30 ^a	0,69 ± 0,07 ^a
Lb16	2,20 ± 0,06 ^b	1,33 ± 0,01 ^a	96,88 ± 14,21 ^a	84,56 ± 14,68 ^a	41,46 ± 3,50 ^b	0,15 ± 0,01 ^b
Lb24	1,37 ± 0,01 ^a	1,22 ± 0,01 ^a	98,86 ± 0,41 ^a	69,00 ± 0,61 ^b	21,03 ± 0,40 ^a	0,96 ± 0,01 ^a

[#] Todos os valores são mostrados como a média ± D.P. de três experimentos replicados.

^{a, b} valores na mesma coluna seguidos de diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes (p<0,05).

Fonte: O Autor (2017).

Os resultados da tolerância aos sais biliares após a incubação durante 24 h estão apresentados na Tabela 1. Todas as estirpes testadas sobreviveram na presença de 0,15% de sais biliares. As cepas de *L. rhamnosus* Lb2 e *L. rhamnosus* Lb16 apresentaram significativamente (p <0,05) maior tolerância nessa concentração do que a outra. A cepa *L. rhamnosus* Lb16 apresentou o melhor resultado (41,46%) quando submetida a estresse devido a 0,30% de sais biliares. As três cepas de *L. rhamnosus* testadas não apresentaram tolerância a 0,45% dos sais biliares após incubação por 24h a 37°C.

4.2.4.3 Susceptibilidade a antibióticos

A susceptibilidade antibiótica de todos os isolados foi avaliada pelo método de difusão em disco, e os resultados mostraram que as estirpes selecionadas de *L. rhamnosus* Lb2, *L. rhamnosus* Lb16 e *L. rhamnosus* Lb24 mostraram-se suscetíveis a todos os agentes antimicrobianos analisados (tetraciclina, gentamicina, rifampicina, cefalexina, clindamicina, ciprofloxacina, ampicilina e penicilina), com a exceção de que Lb24 não foi testado para clindamicina (dados não mostrados).

4.2.4.4 Atividade antagônica

A capacidade de inibir patógenos microbianos é uma propriedade fundamental de um isolado usado como probiótico. As três cepas deste estudo inibiram o crescimento de todos os patógenos microbianos testados e os resultados são apresentados na Tabela 2. As estirpes *L. rhamnosus* Lb2, *L. rhamnosus* Lb16 e *L. rhamnosus* Lb24 possuem antagonismo semelhante

contra: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC29665, *Bacillus cereus* ATCC 33019, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633. As estirpes *L. rhamnosus* Lb2 e *L. rhamnosus* Lb16 têm antagonismo contra *Enterococcus faecalis* ATCC 6057 e *Listeria innocua* ATCC 33090, mas a estirpe *L. rhamnosus* Lb24 não tem atividade contrária a estes microrganismos indicadores.

Tabela 2 Atividade antagonista de cepas de *Lactobacillus* isolados após uma simulação de digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado por kefir, contra vários patógenos

Cepas indicadoras	Isolado com IZD [#]		
	Lb2	Lb16	Lb24
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	26,7 ± 1,0 ^a	28,7 ± 0,4 ^a	28,0 ± 2,8 ^a
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 29665	18,4 ± 3,6 ^a	22,3 ± 0,4 ^a	15,7 ± 1,7 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6057	18,4 ± 0,6 ^a	20,4 ± 0,2 ^a	–
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 33019	16,7 ± 0,1 ^a	16,4 ± 1,0 ^a	16,3 ± 6,0 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	21,0 ± 1,3 ^a	18,7 ± 2,2 ^a	18,4 ± 1,0 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16,7 ± 3,4 ^a	16,3 ± 0,2 ^a	25,7 ± 4,4 ^a
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	22,4 ± 3,0 ^a	22,0 ± 1,3 ^a	–
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	22,4 ± 0,2 ^a	28,4 ± 0,2 ^b	37,0 ± 0,1 ^c
<i>Salmonella enteric</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	17,0 ± 0,7 ^a	32,0 ± 0,1 ^c	25,0 ± 6,7 ^b

DZI = Diâmetro de Zona de Inibição, – = sem inibição.

[#] Todos os valores são mostrados como a média (mm) ± D.P. de três experimentos replicados.

^{a, b, c} Valores na mesma linha seguida de diferentes letras sobrescritas apresentam resultados significativamente diferentes (p < 0,05).

Fonte: O Autor (2017).

Os resultados de antagonismos nas linhagens *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium ATCC 14028 são significativamente (p < 0,05) diferentes quando comparados entre si, *L. rhamnosus* Lb24 e *L. rhamnosus* Lb16 apresentaram a maior zona de inibição contra *L. monocytogenes* (37,0 ± 0,1 mm) e *S. enterica* sorovar Typhimurium (32,0 ± 0,1 mm), respectivamente. Todas as cepas indicadoras foram testadas quanto ao antagonismo e, como resultado, a cepa *L. rhamnosus* Lb16 apresentou os melhores resultados de antagonismo.

4.2.4.5 Atividade antioxidante

Todas as cepas exibiram atividade antioxidante (Tabela 3), os percentuais médios encontrados foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes para cada cepa. A maior atividade neste estudo foi observada em *L. rhamnosus* Lb24 ($19,15 \pm 1,71\%$), seguida por *L. rhamnosus* Lb16 ($8,11 \pm 0,67\%$) e *L. rhamnosus* Lb2 ($3,91 \pm 1,38\%$). No entanto, o teste de atividade antioxidante não é um pré-requisito para estudos de características probióticas. É apenas um teste adicional, então esses resultados caracterizam outra propriedade funcional das cepas estudadas.

Tabela 3 Atributos funcionais de cepas de *Lactobacillus* spp. isoladas após simulação de digestão *in vitro* de leite de ovelha fermentado

<i>Lactobacillus</i> sp.	Atividade antioxidante DPPH [#] (%)	β -galactosidase* (U/ mg)	Hidrofobicidade [‡] (%)
Lb2	$3,91 \pm 1,38^a$	$57,73 \pm 18,96^a$	$54,66 \pm 4,36^a$
Lb16	$8,11 \pm 0,67^b$	$39,90 \pm 10,98^a$	$94,19 \pm 1,73^b$
Lb24	$19,15 \pm 1,71^c$	$38,33 \pm 3,86^a$	$78,06 \pm 2,72^c$

[#], ^{*}, [‡] Todos os valores são mostrados em médias (mm) $\pm$ D.P. de três experimentos replicados.

^a, ^b, ^c Valores na mesma coluna seguidos de diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Fonte: O Autor (2017).

4.2.4.6 Atividade β -galactosidase

Todos os isolados produziram β -galactosidase após 24 h de incubação a 37 °C (Tabela 3). Os resultados da atividade da β -galactosidase são significativamente semelhantes entre as três linhagens. Estes produziram uma média de 45,32 U/ mg de β -galactosidase. Assim, os resultados deste estudo exibem o potencial de leite de ovelha fermentado em kefir para adicionar à saúde humana, uma vez que ajuda os seres humanos a digerir lactose.

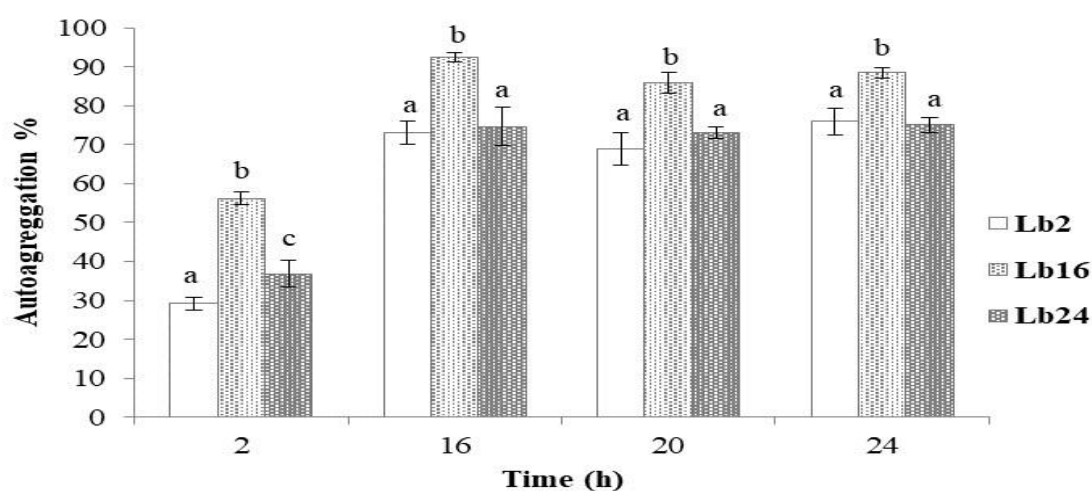
4.2.4.7 Hidrofobicidade de superfície celular *in vitro*

A análise da hidrofobicidade da superfície celular deste estudo revelou que as cepas de *Lactobacillus* eram moderadas e altamente hidrofóbicas (Tabela 3). As linhagens com maior hidrofobicidade foram *L. rhamnosus* Lb16 ($94,19 \pm 1,73\%$). No entanto, segundo Pringsulaka *et al.* (2015), a cepa *L. rhamnosus* Lb24 ($78,06 \pm 2,72\%$) também apresenta características de alta hidrofobicidade. *L. rhamnosus* Lb2 foi o isolado que apresentou hidrofobicidade moderada ($54,66 \pm 4,36\%$).

4.2.4.8 Ensaio de auto-agregação

Com relação aos índices de auto-agregação, as cepas exibiram, em duas horas de avaliação, taxas que variaram entre $29,19 \pm 1,70\%$ e $56,21 \pm 1,58\%$, sendo esta última pertencente a cepa *L. rhamnosus* Lb16. Além disso, diferentes tempos de avaliação 16h, 20h a 24h não mostraram resultados significativamente diferentes para as cepas de *L. rhamnosus* Lb2 e *L. rhamnosus* Lb24 (Figura 2). A cepa *L. rhamnosus* Lb16 apresentou significativa ($p < 0,05$) auto-agregação em todos os tempos testados. Estes valores foram $92,41 \pm 1,24\%$ às 16h, $85,86 \pm 2,69\%$ às 20h e $88,51 \pm 1,31\%$ às 24h.

Figura 2. Os resultados do ensaio de auto-agregação de cepas de *Lactobacillus* sp. obtidos após uma simulação de digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir. Cepas Lb2 (branco), Lb16 (cinza escuro) e Lb24 (cinza claro). Os dados são expressos como média $\pm$ DP ($n = 3$). Letras diferentes (a, b e c) representam diferenças significativas ($P < 0,05$).

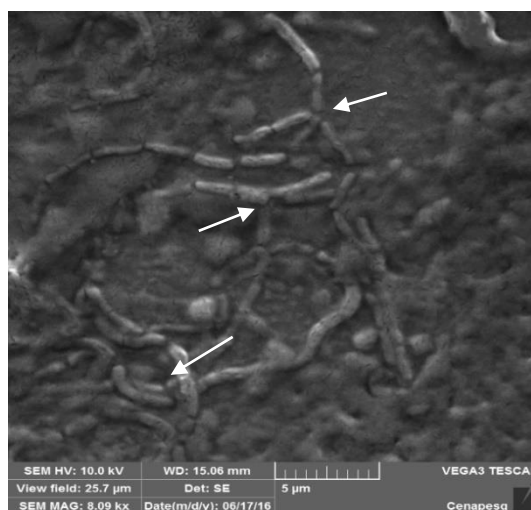


Fonte: O Autor (2017).

4.2.4.9 Ensaio de aderência em células epiteliais *in vitro*

Um critério importante para a seleção de um microrganismo para o uso de probióticos é avaliar se o microrganismo pode aderir à mucosa intestinal. Como mencionado por Jamaly, Benjouad e Bouksaim (2011), os isolados de bactérias com mais de 15 células aderidas por célula epitelial foram considerados positivos no teste de agregação. Portanto, todas as cepas de *L. rhamnosus* deste estudo foram consideradas positivas e os resultados da adesão *in vitro* às células epiteliais são mostrados na Figura 3.

Figura 3. Resultados da adesão de cepas de *Lactobacillus rhamnosus* obtidas após uma digestão *in vitro* de leite de ovelha fermentado, com células epiteliais intestinais raspadas de camundongos albinos Suíços, *L. rhamnosus* Lb16, visualizadas por microscopia eletrônica de varredura. A seta aponta para o local das células aderidas.



Fonte: O Autor (2017).

4.2.5 Discussão

A seleção de potenciais probióticos é o foco da presente pesquisa, muitas BAL oriundas de alimentos fermentados foram escolhidas por causa de suas funções fisiológicas. Esses critérios de seleção incluem o potencial do microrganismo em sobreviver e colonizar o trato gastrointestinal (trato GI) e sua capacidade de promover suas propriedades funcionais e de saúde (REN *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2014). Neste estudo, o leite de ovelha fermentado por grãos de kefir foi produzido e foi realizada a digestão simulada deste produto. Após o processo digestivo, 24 cepas de *Lactobacillus* spp. foram isoladas (dados não mostrados), três estirpes destas, foram escolhidas para o estudo das suas características probióticas e os resultados foram comparados com a literatura existente. As três estirpes de lactobacilos foram identificadas como *Lactobacillus rhamnosus*.

Os resultados de tolerância a pH ácido de isolados de *L. rhamnosus* foram resistentes a pH 5 comparados a outro estudo, que mostrou resultados de linhagens de *L. rhamnosus* resistentes a pH 3 acima de 50% (KUMAR; KUMAR, 2015). As cepas não resistiram a pH baixo porque tiveram contato com o meio ácido por 24 horas. Outros estudos (JENA *et al.*, 2013; TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; REN *et al.*, 2014; ARCHER; HALAMI, 2015) demonstraram que esse contato com o ácido tem duração máxima de 3 horas. A capacidade dos lactobacilos de sobreviverem ao baixo pH permanece controversa (REN *et al.*, 2014). A tolerância ao ácido varia amplamente entre as cepas

probióticas, e a resistência nativa ao ácido gástrico é uma propriedade probiótica rara (JENSEN *et al.*, 2012; CAILLARD; LAPOINTE, 2017). Alimentos, particularmente aqueles com efeito tamponante (produtos lácteos), atuam como protetores para a sobrevivência e passagem de bactérias através do trato ácido (BEGLEY; GAHAN, HILL, 2005; VIZOSO PINTO *et al.*, 2006). O leite tem um efeito protetor sobre os microrganismos fermentadores e, assim, suporta a sobrevivência de bactérias no ambiente ácido do estômago (Elli *et al.*, 2006). Assim, como as bactérias sobreviveram a uma simulação da digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado pelo kefir e não resistiram em grande quantidade após o experimento de pH no meio de cultura MRS sozinho, isso demonstra que, neste contexto, mesmo cepas que não são capazes de sobreviver em pH baixo *in vitro* pode exibir viabilidade substancial quando consumido junto com leite (TUO *et al.*, 2013b). Este estudo mostrou que as cepas de *L. rhamnosus* têm tolerância ao suco gástrico simulado. Nossos resultados estão de acordo com esses relatórios e sugerem que os isolados persistem e subsequentemente passam pelo trato gastrointestinal.

A tolerância ao estresse gástrico é um dos pré-requisitos primários da funcionalidade probiótica, pois as cepas ingeridas precisam sobreviver ao ambiente hostil do trato gastrointestinal. Todos os dias cerca de 2,5 L de suco gástrico são secretados, criando assim um pH de 1,5 e pH de 3 a 5 pós-alimentação (COTTER; HILL, 2003). Subsequentemente, o microrganismo também precisa superar os efeitos dos sais biliares. O fígado humano segrega quase um litro de bile no intestino delgado em uma concentração total que varia entre 0,5 e 0,3% em média (BEGLEY; GAHAN; HILL, 2005). Ser tolerante aos sais biliares é um dos critérios que qualquer cepa microbiana deve satisfazer se for usada como cultura probiótica. Portanto, a presença de bile no intestino afeta a viabilidade das bactérias probióticas. Por conseguinte, Vinderola e Reinheimer (2003), consideraram que as estirpes BAL são resistentes à bile apenas quando apresentam resistência $\geq 50\%$ a 0,3% (p/ v) de sais biliares. Neste contexto, apenas a linhagem *L. rhamnosus* Lb16 possui resistência moderada aos sais biliares. Em um estudo semelhante, Kumar e Kumar (2015), nas mesmas condições do presente estudo, avaliaram a tolerância aos sais biliares de 12 *Lactobacillus* sp. cepas isoladas de produtos lácteos, oito das quais eram resistentes com taxas variando entre 60 e 70% quando colocadas em contato com sais biliares na concentração de 0,3%. Isso pode ser porque essas espécies de *Lactobacillus* podem ser diferentes das cepas aqui estudadas. Tulini, Winkelströter e Martinis (2013) perceberam que os sais biliares não afetaram o crescimento de *L. paraplantarum* isolado de um queijo artesanal semiduro brasileiro, assim podemos

concluir que a resistência está relacionada com as espécies de linhagens estudadas. Em contraste ao suco gástrico simulado, todas as cepas examinadas neste estudo conseguiram sobreviver melhor nos sucos simulados do intestino delgado. A maioria dos estudos até agora mostrou que a maioria das cepas sobreviveu bem nessas condições (TULINI; WINKELSTRÖTER, MARTINIS, 2013; TUO *et al.*, 2013; LIKOTRAFITI *et al.*, 2014; ARCHER; HALAMI, 2015), o que sugere potencial recuperação dos níveis iniciais enquanto passam pelo intestino delgado.

Investigar a susceptibilidade aos antibióticos é uma característica comum de avaliação de bactérias probióticas seguras (KUMAR; KUMAR, 2015). A transmissão de genes de resistência a antibióticos (resistência transmissível) de cepas probióticas para bactérias potencialmente patogênicas é uma questão séria de segurança (REN *et al.*, 2014). A importância de avaliar o padrão de perfil de resistência a antibióticos de novos isolados é que isso restringe o uso de culturas probióticas contendo genes de resistência a antibióticos transferíveis (ZHENG *et al.*, 2013). Em nosso estudo, nenhuma das cepas selecionadas foi resistente aos antibióticos testados e essas cepas são consideradas seguras, de acordo com os achados de Tian *et al.* (2014). Outros estudos descobriram que as cepas de *Lactobacillus* de origem láctea são resistentes a antibióticos (VIZOSO PINTO *et al.*, 2006; TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013; ZHENG *et al.*, 2013; KUMAR; KUMAR, 2015; ZANIRATI *et al.*, 2015). No entanto, esses estudos justificam a resistência aos antibióticos, como uma resistência intrínseca e intransferível. Tian *et al.* (2014) apontaram que os probióticos seguros não possuíam os genes resistentes, pois estes poderiam antagonizar a colonização nos locais das mucosas do intestino. Além disso, cepas probióticas são benéficas principalmente porque os isolados são dominantes e podem regular o equilíbrio do intestino, e podem produzir ácido lático e bacteriocina para inibir a proliferação de patógenos.

Segundo Santos *et al.* (2003), os lactobacilos são utilizados na prevenção e no tratamento de distúrbios gastrointestinais. Esses microrganismos atuam de duas maneiras diferentes: com a produção de substâncias antimicrobianas (ácido lático, peróxido de hidrogênio e/ ou outras moléculas antibacterianas, como bacteriocina (TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013) e por inibição competitiva da ligação enteropatogênica às células epiteliais. No presente estudo, a atividade antagonista de todos os isolados inibiu os patógenos microbianos e os resultados demonstraram que todas as cepas inibiram as bactérias Gram positivas (*E. faecalis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*) e bactérias Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* serovar

Typhimurium) Santos *et al.* (2003) e Zanirati *et al.* (2015), avaliando a atividade antagônica do *Lactobacillus* isolado do kefir, relataram resultados semelhantes aos do presente estudo, e outros estudos também avaliaram a atividade antimicrobiana de cepas de lactobacilos de origem láctea (TULINI; WINKELSTRÖTER; MARTINIS, 2013; REN *et al.*, 2014; ARCHER; HALAMI, 2015; KUMAR; KUMAR, 2015), de animais (JENA *et al.*, 2013) e de humanos (LEE *et al.*, 2011; REN *et al.*, 2014; ARCHER; HALAMI, 2015), mas eles não observaram cepas com tais um amplo espectro de atividade (maior ou igual a seis linhagens indicadoras) como neste estudo. Assim, pode-se inferir que a fonte de isolamento de *L. rhamnosus* está diretamente relacionada à sua atividade e que a capacidade antagônica de cepas derivadas do leite de ovelha fermentado pelo kefir é maior que a de outras fontes.

A atividade de eliminação de radicais é um atributo funcional das bactérias probióticas, o que é indicativo de sua natureza antioxidante (ARCHER; HALAMI, 2015). Isto foi avaliado pelo ensaio de eliminação de radicais DPPH. Os antioxidantes naturais que protegem o corpo dos danos dos radicais livres e reduzem a incidência de doenças crônicas, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. helveticus* e *L. rhamnosus*, possuem capacidade antioxidante e são considerados probióticos de sucesso (MISHRA *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2017). Esses microrganismos com comprovada capacidade antioxidante desempenham um papel fundamental na prevenção de diversas doenças, como doenças cardiovasculares, diabetes e úlceras do trato gastrointestinal (KAUSHIK *et al.*, 2009). Todas as cepas de *Lactobacillus* deste estudo exibiram atividade antioxidante. Os resultados mostraram uma média de 10,39%. Um exemplo que explica por que diferentes métodos mudam os resultados é dado por Meira *et al.*, (2012). Eles usam dois métodos para avaliar a atividade antioxidante de cepas de *Lactobacillus* de queijo ovino regional brasileiro, mas não observaram tal atividade quando o ensaio foi realizado pelo método DPPH, mas encontraram essa atividade quando usaram o método do ácido linoléico. Ren *et al.* (2014) encontraram atividade antioxidante capturando o radical hidroxila variando entre 10,37% e 94,26% dos *Lactobacillus* isolados de alimentos fermentados e do intestino humano. Além disso, Lin e Chang (2000) mencionam que o extrato intracelular, dependendo do método, pode apresentar uma maior porcentagem de atividade antioxidante do que as células intactas. Dependendo da produção de enzimas ou compostos na superfície das células, essas células microbianas podem exibir diferentes naturezas de atividade antioxidante (WANG *et al.*, 2009).

A má digestão da lactose e/ ou a intolerância podem ser tratadas usando bactérias de produtos lácteos fermentados que contêm a enzima β -galactosidase que é responsável pela

hidrólise da lactose (JENA *et al.*, 2013). Esta enzima é produzida pela maioria dos lactobacilos com atividades de hidrolase e transglicosilase, o que é vantajoso do ponto de vista tecnológico e de saúde (MEIRA *et al.*, 2012b). Essa enzima é intracelular e parece agir, quando é liberada após a quebra das células bacterianas durante o trânsito intestinal (MONTANARI; ZAMBONELLI; GRAZIA, 2000), portanto o extrato intracelular foi utilizado no presente estudo. Todas as cepas de *Lactobacillus* mostraram a atividade da β -galactosidase, e os resultados para as linhagens *L. rhamnosus* Lb2, *L. rhamnosus* Lb16 e *L. rhamnosus* Lb24 foram significativos ($p < 0,05$). Esta enzima também foi encontrada em outros estudos que utilizaram cepas de *Lactobacillus* isoladas de produtos fermentados, laticínios e fezes (VIZOSO PINTO *et al.* 2006; MEIRA *et al.* 2012; JENA *et al.*, 2013). Vinderola e Reinheimer (2003) avaliaram a atividade da β -galactosidase em *Lactobacillus* e *Lactococcus* de origem comercial e laticínios, mas este último microrganismo não apresentou β -galactosidase, sugerindo que entre os LAB, o gênero *Lactobacillus* tem maior chance de apresentar essa enzima (MONTANARI; ZAMBONELLI; GRAZIA, 2000). E a presença da β -galactosidase ganhou importância para aplicações potenciais, como para culturas probióticas na indústria de laticínios ou como produtoras de galactoligossacarídeos como ingredientes prebióticos (USTOK; TARI; HARSA, 2010). Além disso, eles podem ser úteis para minimizar os efeitos da insuficiência de lactase (DE VRESE *et al.*, 2001).

A hidrofobicidade é um critério importante que permite que os probióticos se liguem e residam nos intestinos do hospedeiro por um período (KAUSHIK *et al.*, 2009), e conferem uma vantagem competitiva para a manutenção bacteriana no trato gastrointestinal (VINDEROLA; REINHEIMER, 2003). Uma maior hidrofobicidade é mostrada quando as superfícies das células microbianas apresentam material glico-proteináceo na superfície celular (KOS *et al.*, 2003), que poderia atuar como um potencial mediador nas etapas iniciais envolvidas na adesão (GREENE; KLAENHAMMER, 1994). Uma alta hidrofobicidade de Lb16 foi encontrada neste estudo (94,19%). Este valor é superior ao de outros estudos que utilizaram cepas de *Lactobacillus* e xileno para análise: 57,6% (ARCHER; HALAMI, 2015) 59,0% (REN *et al.*, 2014), 70,9% (KOS *et al.*, 2003), 77,0 % (ZANIRATI *et al.*, 2015), 88,0% (MEIRA *et al.*, 2012). Patel *et al.* (2009) relataram que a hidrofobicidade da superfície bacteriana e a capacidade de auto-agregação estão diretamente correlacionadas; a hidrofobicidade pode ser um dos determinantes da auto-agregação.

A agregação entre microrganismos da mesma cepa é de considerável importância em vários nichos ecológicos (JENA *et al.*, 2013). A agregação de bactérias pode atingir uma

massa adequada para formar biofilmes ou aderir às superfícies mucosas do hospedeiro e, assim, usar suas funções (GRZEŚKOWIAK *et al.*, 2011). A capacidade de auto-agregação das cepas de *Lactobacillus* no presente estudo seguiu o mesmo comportamento dos lactobacilos estudados por Meira *et al.* (2012), ou seja, os valores aumentaram ao longo do tempo de incubação e os resultados foram mais aparentes de 16 h até o período final de incubação. Entretanto, nossos resultados foram maiores para o Lb16 (84,39%) do que o encontrado por Meira *et al.* (2012) após 24h de ensaio (79,8%). Outros trabalhos apresentaram menores percentuais de auto-agregação, sendo 47,2% (Jena *et al.*, 2013), 46% (REN *et al.*, 2014), 56% (BOTTA *et al.*, 2014), 62% (ARCHER; HALAMI, 2015). Assim, relacionando os resultados da hidrofobicidade com o da auto-agregação, pode-se inferir que as cepas do nosso estudo possuem características de adesão maiores que as da literatura. De acordo com as considerações de Ren *et al.* (2014), essas cepas de *Lactobacillus* possuem uma grande chance de adesão em células epiteliais.

Os resultados de hidrofobicidade e auto-agregação, com as cepas deste estudo, mostraram aderência às células intestinais de camundongos. Estes resultados foram considerados positivos de acordo com as considerações de Jamaly, Benjouad e Bouksaim (2011), que mencionam a eficiência de adesão de pelo menos 15 bactérias por célula epitelial. De fato, a adesão é um pré-requisito para a colonização. Kotzamanidis *et al.* (2010) mencionam que a capacidade dos *Lactobacillus* de aderir às células epiteliais do hospedeiro foi sugerida como benéfica para os probióticos, porque esta associação íntima transitória é administrada para trocar mediadores entre a bactéria e o sistema imune do hospedeiro e a bactéria compete com patógenos entéricos para sítios de ligação.

Estudos com avaliação probiótica de *Lactobacillus* isolados de kefir já foram conduzidos (GOLOWCZYC *et al.*, 2011; ZHENG *et al.*, 2013). No entanto, este trabalho é uma contribuição importante para o estudo de probióticos isolados após a simulação da digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir. Este leite fermentado apresenta um diferencial devido às suas características peculiares (contém maiores teores de sólidos e maior quantidade de nutrientes que o leite de cabras e vacas), o que propiciou o isolamento de cepas resistentes e outras condições gastrointestinais de características probióticas.

4.2.6 Conclusão

Três cepas de *Lactobacillus rhamnosus* foram isoladas de leite de ovelha fermentado por grãos de kefir após o processo de digestão *in vitro* e estas cepas apresentam propriedades adequadas para a aplicação de probiótico. A estirpe *L. rhamnosus* Lb16 destaca-se das demais por apresentar características globais que se destacaram frente às demais linhagens (por exemplo, atividade antagonista). Este estudo indica que a cepa de *L. rhamnosus* Lb16 analisada pode ser útil na produção de alimentos lácteos para potenciais benefícios para a saúde humana.

4.2.7 Agradecimentos

Os autores agradecem à Dr^a. Milena Fernandes da Silva que nos auxiliou nos cálculos estatísticos e à estudante de doutorado Rebeca Melo por sua ajuda na análise dos intestinos de camundongos, ambos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil; e a aluna de doutorado Maria Edna Gomes de Barros, pelas fotografias histológicas realizadas no Laboratório de Histologia (DMFA-UFRPE) e pelo Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ-UFRPE) para a análise de MEV deste estudo.

4.2.8 Referencias

- AMARETTI, A.; NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant properties of potentially probiotic bacteria: *in vitro* and *in vivo* activities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 809–17, 2013.
- ARCHER, A. C.; HALAMI, P. M. Probiotic attributes of *Lactobacillus fermentum* isolated from human feces and dairy products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n.19, p. 8113–8123, 2015.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625–651, 2005.
- BOTTA, C.; LANGERHOLC, T.; CENCIC, A.; COCOLIN, L. *In vitro* Selection and Characterization of New Probiotic Candidates from Table Olive Microbiota. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e94457, 2014.
- CAILLARD, R.; LAPOINTE, N. *In vitro* Gastric Survival of Commercially Available Probiotic Strains and Oral Dosage Forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 125–127, 2017.

- CHIFIRIUC, M. C.; CIOACA, A. B.; LAZAR, V. *In vitro* Assay of the Antimicrobial Activity of Kephir against Bacterial and Fungal Strains. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 433–435, 2011.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved atandard. In: **Clinical and Laboratory Standars Institute**, 9 ed. CLSI: Pennsylvania USA, 2012, p. 11–36.
- COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 429–453, 2003.
- DALLAS, D. C.; CITERNE, F.; TIAN, T.; SILVA, V. L. M.; KALANETRA, K. M.; FRESE, S. A.; ROBINSON, R. C.; MILLS, D. A.; BARILE, D. Peptidomic Analysis Reveals Proteolytic Activity of Kefir Microorganisms on Bovine Milk Proteins. **Food Chemistry**, v. 197, p. 273–284, 2016.
- DE VRESE, M.; STEGELMANN, a; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-Compensation for Lactase Insufficiency. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 421S–429S, 2001.
- DUNNE, J.; EVERSLED, R. P.; SALQUE, M.; CRAMP, L.; BRUNI, S.; RYAN, K.; BIAGETTI, S.; DI LERNIA, S. First Dairying in Green Saharan Africa in the Fifth Millennium BC. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 390–394, 2012.
- ELLI, M.; CALLEGARI, M. L.; FERRARI, S.; BESSI, E.; CATTIVELLI, D.; SOLDI, S.; MORELLI, L.; FEUILLERAT, N. G.; ANTOINE, J. M. Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5113–5117, 2006.
- GIL-RODRÍGUEZ, A. M.; CARRASCOSA, A. V.; REQUENA, T. Yeasts in Foods and Beverages: *In vitro* Characterisation of Probiotic Traits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1156–1162, 2015.
- GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; DE LOS ANGELES SERRADELL, M.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* Isolated from Kefir Grains: Evidence for Lectin-like Activity of Bacterial Surface Proteins. **The Journal of dairy research**, v. 76, n. 1, p. 111–6, 2009.
- GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G. L.; ABRAHAM, A. G. Cellular Injuries of Spray-Dried *Lactobacillus* Spp. Isolated from Kefir and Their Impact on Probiotic Properties. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 3, p. 556–60, 2011.
- GREENE, J. D.; KLAENHAMMER, T. R. Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to

- Human Caco-2 Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4487–4494, 1994.
- GRZEŚKOWIAK, Ł.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; GUEIMONDE, M. Manufacturing Process Influences Properties of Probiotic Bacteria. **The British journal of nutrition**, v. 105, n. 6, p. 887–94, 2011.
- GUERIN, J.; PETIT, J.; BURGAIN, J.; BORGES, F.; BHANDARI, B.; PERROUD, C.; DESOBRY, S.; SCHER, J.; GAIANI, C. *Lactobacillus rhamnosus* GG Encapsulation by Spray-Drying: Milk Proteins Clotting Control to Produce Innovative Matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 193, p. 10–19, 2017.
- GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; ERTEKIN-FILIZ, B.; SEYDIM, A. C. Effect of Different Growth Conditions on Biomass Increase in Kefir Grains. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 3, p. 1239–42, 2011.
- HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics , Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. In: **Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes health**. INTECH, 2013, p. 197–216.
- JAMALY, N.; BENJOUAD, A.; BOUKSAIM, M. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Known Popular Traditional Moroccan Dairy Products. **British Microbiology Research Journal**, v. 1, n. 4, p. 79–94, 2011.
- JENA, P. K.; TRIVEDI, D.; THAKORE, K.; CHAUDHARY, H.; GIRI, S. S.; SESHADRI, S. Isolation and Characterization of Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Rat Fecal Microbiota. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 6, p. 407–416, 2013.
- JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* Testing of Commercial and Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 216–222, 2012.
- KAUSHIK, J. K.; KUMAR, A.; DUARY, R. K.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.; BATISH, V. K. Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8099, 2009.
- KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; ŠIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOŠIĆ, S. Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981–987, 2003.
- KOTZAMANIDIS, C.; KOURELIS, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N.; YIANGOU, M. Evaluation of Adhesion Capacity, Cell Surface Traits and

- Immunomodulatory Activity of Presumptive Probiotic *Lactobacillus* Strains. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2–3, p. 154–63, 2010.
- KUMAR, A.; KUMAR, D. Characterization of *Lactobacillus* Isolated from Dairy Samples for Probiotic Properties. **Anaerobe**, v. 33, p. 117–123, 2015.
- LEE, J.; YUN, H. S.; CHO, K. W.; OH, S.; KIM, S. H.; CHUN, T.; KIM, B.; WHANG, K. Y. Evaluation of Probiotic Characteristics of Newly Isolated *Lactobacillus* Spp.: Immune Modulation and Longevity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 80–86, 2011.
- LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V. M. F.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic Potential of Selected Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Brazilian Kefir Grains. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 6, p. 3622–3632, 2015.
- LIKOTRAFITI, E.; VALAVANI, P.; ARGIRIOU, A.; RHOADES, J. *In vitro* Evaluation of Potential Antimicrobial Synbiotics Using *Lactobacillus kefir* Isolated from Kefir Grains. **International Dairy Journal**, v. 45, p. 23–30, 2015.
- LIMA, M. S. F.; SOUZA, K. M. S.; ALBUQUERQUE, W. W. C.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, A. L. F. *Saccharomyces Cerevisiae* from Brazilian Kefir-Fermented Milk: An *in vitro* Evaluation of Probiotic Properties. **Microbial pathogenesis**, v.110, p. 670-677, 2017.
- LIN, M. Y.; CHANG, F. J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n. 8, p. 1617–1622, 2000.
- MARINO, M.; INNOCENTE, N.; CALLIGARIS, S.; MAIFRENI, M.; MARANGONE, A.; NICOLI, M. C. Viability of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in Structured Emulsions Containing Saturated Monoglycerides. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 51–59, 2017.
- MATEJČEKOVÁ, Z.; LIPTÁKOVÁ, D.; VALÍK, L. Functional Probiotic Products Based on Fermented Buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 35–41, 2017.
- MÄYRÄ-MÄUKINEN, A.; MNNINEN, M.; GYLLENBERG, H. The Adherence of Lactic Acid Bacteria to the Columnar Epithelial Cells of Pigs and Calves. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 2, p. 241–245, 1983.
- MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Spp. Isolated from Brazilian Regional Ovine Cheese. **The**

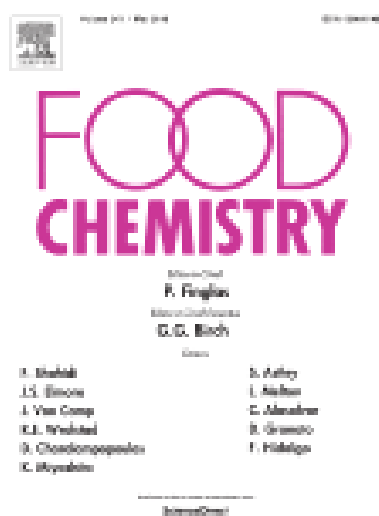
- Journal of dairy research**, v. 79, n. 1, p. 119–127, 2012.
- MISHRA, V.; SHAH, C.; MOKASHE, N.; CHAVAN, R.; YADAV, H.; PRAJAPATI, J. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 14, p. 3615–3626, 2015.
- MONTANARI, G.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L. Release of β -galactosidase from *Lactobacilli*. **Food Technology and Biotechnology** v. 38, n. 2, p. 129–133, 2000.
- NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 2001.
- PATEL, A. K.; AHIRE, J. J.; PAWAR, S. P.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Comparative Accounts of Probiotic Characteristics of *Bacillus* Spp. Isolated from Food Wastes. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 505–510, 2009.
- PRINGSULAKA, O.; RUEANGYOTCHANTHANA, K.; SUWANNASAI, N.; WATANAPOKASIN, R.; AMNUEYSIT, P.; SUNTHORNTHUMMAS, S.; SUKKHUM, S.; SARAWANEEYARUK, S.; RANGSIRUJI, A. *In vitro* Screening of Lactic Acid Bacteria for Multi-Strain Probiotics. **Livestock Science**, v. 174, p. 66–73, 2015.
- REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; LIU, C.; LIU, H.; WANG, M.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.; JIN, N. *In vitro* Evaluation of the Probiotic and Functional Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Food and Human Intestine. **Anaerobe**, v. 30, p. 1–10, 2014.
- ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 29–33, 1980.
- SAITO, V. S. T.; DOS SANTOS, T. F.; VINDEROLA, C. G.; ROMANO, C.; NICOLI, J. R.; ARAÚJO, L. S.; COSTA, M. M.; ANDRIOLI, J. L.; UETANABARO, A. P. T. Viability and Resistance of *Lactobacilli* Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, M208-M2013, 2014.
- SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; MARQUINA, D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* Spp. Isolated from Kefir. **Systematic and applied microbiology**, v. 26, n. 3, p. 434–437, 2003.
- SATIR, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. How Kefir Fermentation Can Affect Product Composition? **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 1–7, 2016.

- SIELADIE, D. V.; ZAMBOU, N. F.; KAKTCHAM, P. M.; CRESCI, A.; FONTEH, F. Research Article Probiotic Properties of Lactobacilli Strains Isolated From Raw Cow Milk in the Western Highlands of Cameroon. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 12–28, 2011.
- SUMERI, I.; ARIKE, L.; STEKOLŠTŠIKOVA, J.; UUSNA, R.; ADAMBERG, S.; ADAMBERG, K.; PAALME, T. Effect of Stress Pretreatment on Survival of Probiotic Bacteria in Gastrointestinal Tract Simulator. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1925–1931, 2010.
- TANG, W.; XING, Z.; LI, C.; WANG, J.; WANG, Y. Molecular Mechanisms and *in vitro* Antioxidant Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1642–1649, 2017.
- TIAN, P.; XU, B.; SUN, H.; LI, X.; LI, Z.; WEI, P. Isolation and Gut Microbiota Modulation of Antibiotic-Resistant Probiotics from Human Feces. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 405–412, 2014.
- TULINI, F. L.; WINKELSTRÖTER, L. K.; DE MARTINIS, E. C. P. Identification and Evaluation of the Probiotic Potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, a Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Semi-Hard Artisanal Cheese. **Anaerobe**, v. 22, p. 57–63, 2013.
- TUO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; AI, L.; ZHANG, Y.; HAN, X.; YI, H. Study of Probiotic Potential of Four Wild *Lactobacillus rhamnosus* Strain. **Anaerobe**, v. 21, p. 22–27, 2013.
- URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal Beneficial Effects of Kefir-Supplemented Diet in Rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 10, p. 653–658, 2007.
- USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and Thermal Properties of β -Galactosidase Enzymes Produced by Artisanal Yoghurt Cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114–1120, 2010.
- VARGA, L.; SÜLE, J.; NAGY, P. Survival of the Characteristic Microbiota in Probiotic Fermented Camel, Cow, Goat, and Sheep Milks during Refrigerated Storage. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 4, p. 2039–44, 2014.
- 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**, v. 36, n. 9–10, p. 895–904, 2003.
- VIZOSO PINTO, M. G.; FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H.

- Lactobacillus* Spp. with *in vitro* Probiotic Properties from Human Faeces and Traditional Fermented Products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 205–214, 2006.
- WANG, A. N.; YI, X. W.; YU, H. F.; DONG, B.; QIAO, S. Y. Free Radical Scavenging Activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and Its Antioxidative Effect on Growing-Finishing Pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1140–1148, 2009.
- XIE, N.; ZHOU, T.; LI, B. Kefir Yeasts Enhance Probiotic Potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The Positive Effects of Coaggregation between the Two Strains. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 394–401, 2012.
- ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO, M.; SANDES, S. H. D. C.; NICOLI, J. R.; NUNES, Á. C.; NEUMANN, E. Selection of Lactic Acid Bacteria from Brazilian Kefir Grains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70–76, 2015.
- ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, Y.; NIU, C.; YANG, Z.; LI, S. Potential Probiotic Characterization of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Inner mongolia “Hurood” cheese. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 225–235, 2014.
- ZHENG, Y.; LU, Y.; WANG, J.; YANG, L.; PAN, C.; HUANG, Y. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69868, 2013.

4.3 CAPÍTULO III

Artigo a ser enviado para a revista “Food Chemistry”



Fator de impacto:4,529 (2016)

Qualis A2 em Ciências Biológicas I

Digestão *in vitro* é um método interessante para liberar peptídeos bioativos da matriz alimentar como um leite de ovelha fermentado por kefir?

Meire dos Santos Falcão de Lima^{a,b,c}, Karoline Mirella Soares de Souza^{b,c}, Júlia Furtado Campos^d, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,b,c} Maria Taciana Holanda Cavalcanti^{a,b,c,*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Brasil.

^b Centro Analítico de Pesquisa (CENAPESQ), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Recife, Brasil.

^c Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos (LABTECBIO). Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) - Recife, Brasil.

^d Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, Brasil.

*Autor Correspondente: Maria Taciana Holanda Cavalcanti, Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos 52171-900, Recife-PE, Brasil. Fone: +55.81.3320.6345 E-mail: mtcvsoares@yahoo.com.br

4.3.1 Resumo

A digestão *in vitro* desempenha um papel importante na formação e degradação de peptídeos bioativos. Esses peptídeos bioativos podem ser formados pela fermentação do leite, por exemplo, ou por hidrólise enzimática. Kefir é uma bebida fermentada usada para promover a saúde, pode ser produzido com diversos tipos de leite, como o leite de ovelha. O objetivo desta pesquisa é produzir um leite de ovelha fermentado por meio de grãos de kefir, observar, extrair e avaliar o perfil peptídico e as propriedades bioativas (antioxidante, antimicrobiana, anti-hipertensiva e anti-hemolítica) destes, durante os eventos de uma simulação de digestão *in vitro*. No perfil peptídico, foram identificados 60 peptídeos, destes 12 com atividades biológicas já relatadas. Um fragmento (661.8 Da) persistiu após os tratamentos enzimáticos da simulação de digestão. As atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e anti-hemolítica foram observadas e apresentaram resultados positivos em um intervalo de 5 a 0,625 mg/ mL. A fração peptídica após a digestão pancreática demonstrou o melhor conjunto

de bioatividades. O destaque deste estudo é a importância do uso do tratamento enzimático para simular a digestão *in vitro*, e assim liberar peptídeos bioativos. Os resultados indicam que estes peptídeos multifuncionais têm um potencial valioso e a identificação das sequências exatas de aminoácidos conferindo as bioatividade, podem permitir a síntese e purificação de peptídeos bioativos para sua aplicação. Podendo ser empregados como compostos dietéticos bioativos, para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos, assim como, seus isolamentos para uma indústria de biotecnologia.

Palavras-chave: Peptídeos bioativos; leite de ovelha; leite fermentado; kefir; digestão *in vitro*; peptídeos multifuncionais.

4.3.2 Introdução

A digestão gastrointestinal desempenha um papel importante na formação e degradação de peptídeos bioativos (DALLAS *et al.*, 2016). Estudos *in vivo* são importantes e fornecem resultados mais robustos, porém, são mais caros e demorados. Portanto, ensaios *in vitro* são mais interessantes para uma triagem inicial sobre a formação e atividade de peptídeos bioativos (CONTRERAS *et al.* 2013). A hidrólise secundária com pepsina e extratos pancreáticos tem sido aplicada para mimetizar condições gastrointestinais e avaliar a estabilidade do peptídeo bioativo (QUIRÓS *et al.*, 2009).

Os resultados e as bioatividades dos peptídeos em ensaios gastrointestinais são dois fatores importantes que precisam ser considerados (PICARIELLO *et al.*, 2013). Os peptídeos bioativos podem sofrer transformações fisiológicas que determinam sua biodisponibilidade e atividade no organismo. De fato, a digestão gastrointestinal desempenha um papel importante na formação e degradação de peptídeos bioativos (CONTRERAS *et al.*, 2013).

Os poderes antimicrobianos de uma proteína isolada do soro, submetida a hidrólises, por várias enzimas gastrointestinais foram demonstrados por Théolier *et al.* (2013). Estes autores descobriram que os hidrolisados de pepsina tiveram atividade antibacteriana significativa contra *Listeria ivanovii* HPB28 e *Escherichia coli* MC4100, os resultados para outras enzimas proteolíticas não apresentaram atividade. Contreras *et al.* (2013) identificaram os peptídeos inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) após digestões pancreáticas, no entanto, esses peptídeos não foram detectados no iogurte e são, provavelmente, gerados por enzimas gastrointestinais.

Jin *et al.* (2016) também consideram que a fermentação é uma abordagem atrativa para gerar peptídeos funcionais à saúde a partir de proteínas do leite usando microrganismos. Em contraste, os peptídeos bioativos pré-liberados e os fragmentos inativos no leite fermentado não possuem a mesma bioatividade quando digeridos por enzimas em testes gastrintestinais.

Um leite fermentado com uma tradição muito longa em nutrição humana é o kefir (EBNER *et al.*, 2015), esta bebida originada há milhares de anos nas montanhas do Cáucaso, ainda é consumida em todo o mundo (ARYANA; OLSON, 2017); para a produção deste produto é necessário que os grãos de kefir - cerca de 50 espécies de bactérias do ácido lático e leveduras vivem em um complexo simbiótico coberto por uma camada composta de proteínas e polissacarídeos (MACORI; COTTER, 2018) - sejam incubados com leite sob condições aeróbicas (DALLAS *et al.*, 2016).

A produção de kefir envolve várias vias metabólicas, uma delas é a proteólise, que leva à produção de peptídeos bioativos que influenciam positivamente a saúde humana (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014). Estes peptídeos gerados durante a fermentação ocorrem pelo sistema proteolítico de bactérias ácido-láticas (BAL) e leveduras. Inicialmente as proteases ligadas à parede celular da BAL promovem a hidrólise inicial da caseína do leite em oligopeptídeos; após a transferência dos oligopeptídeos para o citoplasma, as peptidases intracelulares atuam e terminam o processo de hidrólise para converter oligopeptídeos em aminoácidos livres e/ ou peptídeos de baixo peso molecular (DE CASTRO; SATO, 2015). Por outro lado, as espécies de leveduras também possuem proteases intracelulares e extracelulares (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014).

Consideráveis pesquisas têm sido realizadas na investigação de peptídeos de origem do leite bovino, mas pouco se conhece sobre peptídeos de proteínas do leite de outras espécies, como ovelhas (MROS *et al.*, 2017). Em um estudo proteômico de Ha *et al.* (2015), embora o proteoma de soro de ovelha tenha apresentado algumas semelhanças com o da vaca, um número considerável de diferenças foi identificado, sugerindo que o leite de ovelha pode conter diferentes bioatividades já conhecidas ou diferentes bioatividades ainda não encontradas para o leite de vaca.

Um estudo recente (LIMA *et al.*, 2017b) identificou peptídeos bioativos extraídos de leite de ovelha fermentado com grãos de kefir no Brasil, as propriedades antioxidantes e antimicrobianas desses peptídeos foram observadas durante toda a vida de prateleira. Assim, o objetivo desta pesquisa é produzir um leite de ovelha fermentado por meio de grãos de kefir, observar o perfil peptídico, extrair e avaliar propriedades bioativas (antioxidante,

antimicrobiana, anti-hipertensiva e anti-hemolítica) destes, durante os eventos de uma simulação de digestão *in vitro*.

4.3.3 Material e métodos

4.3.3.1 Materiais e reagentes

Os produtos químicos, reagentes e enzimas usados neste estudo, foram de grau analítico e adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, EUA), Himedia (Mumbai, Índia), Merck (Darmstadt, Alemanha) ou Fluka (Buchs, Suíça).

Toda a água usada nos experimentos foi purificada usando um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, MA, EUA). A ultrafiltração foi realizada através de uma membrana AMICON (Millipore).

4.3.3.2 Leite de ovelha fermentado

O leite de ovelha foi comprado da fazenda na cidade de Vitória de Santo Antão - PE/ Brasil. A qualidade das amostras de leite foi determinada usando um Bentley Combi 2300 (Bentley Instruments Incorporated, Chaska, MN, EUA) para determinar a contagem de células somáticas e determinar os componentes do leite em um único dispositivo. Os grãos de kefir foram obtidos de um domicílio particular em Pernambuco (Brasil). O leite fermentado foi realizado pelo mesmo método descrito anteriormente por Lima *et al.* (2017).

4.3.3.3 Ensaio de digestão *in vitro*

A simulação da digestão *in vitro* foi realizada de acordo com o método descrito por Kopf-bolan *et al.* (2012), com algumas modificações. Essa metodologia consistiu nas seguintes etapas: 1) Inicialmente 2,25 mL do leite fermentado foram homogeneizados com 3 mL de solução salivar e agitados por 5 min. 2) Em seguida, 6 mL da solução de suco gástrico e pepsina foram adicionados e agitados por 120 min. 3) Subsequentemente, 6 mL de suco pancreático e pancreatina foram adicionados e agitados por 60 minutos. 4) Finalmente, 3mL de suco biliar e bile foram adicionados e agitados por outros 60 minutos. Durante todos os estágios do experimento foram incubados em Shaker a 37 °C e 100 rpm.

As soluções de cada etapa foram preparadas conforme descrito na Tabela 1. Amostras foram coletadas aos 5 min (digestão inicial = ID), 125 min (digestão gástrica = GD) e 245

min (digestão pancreática = PD), durante cada coleta, as amostras foram imediatamente identificadas, colocadas em gelo e armazenadas a -20 ° C.

Tabela 1. Preparação das diferentes soluções para a simulação da digestão *in vitro*

		Saliva	Suco Gástrico	Suco Pancreático	Suco Biliar
Composto	Estoque (g/L)	Volume(mL)	Volume(mL)	Volume(mL)	Volume(mL)
KCl	46.72	10	28	5.4	5.4
KH ₂ PO ₄	68	20	0.9	0.8	17.8
NaHCO ₃	168	----	6.5	----	----
NaHCO ₃	84	4	----	----	9.5
NaHCO ₃	42.5	----	----	42.5	----
NaCl	120	1	10	8	8
Urea	22.5	10	0.3	2.4	5.2
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆	30	1	2	1.1	1.1
NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	187.7	----	----	----	10
Para ajuste do pH:	Estoque (mol/L) (%)	Volume(mL)	Volume(mL)	Volume(mL)	Volume(mL)
NaOH	5 -	---	---	---	4
NaOH	1 -	4	---	0.5	---
HCl	1 -	1	---	0.3	1
HCl	- 32	---	3	---	---
		pH 6.8 ± 0.2*	pH 2.0 ± 0.5*	pH 8.1 ± 0.2*	pH 8.2 ± 0.2*
Composto	Estoque (g/L)	Volume(μL)	Volume(μL) ^Φ	Volume(μL) [‡]	Volume(μL) [†]
Pepsin	625	----	4	----	----
Pancreatin	360	----	----	50	----
Bile	300	----	----	----	300

* O volume final da solução foi completado até 500 mL com água destilada e congelado a -20 ° C.

Φ Por mL de suco gástrico: adicionado diretamente antes da digestão.

‡ Por mL de suco Pancreático: adicionado diretamente antes da digestão.

† Por mL de suco biliar: adicionado diretamente antes da digestão.

Fonte: O Autor (2018).

4.3.3.4 Eletroforese SDS-PAGE

O Kit de determinação de proteínas por ácido biciconínico (BCA) (ThermoFisher Scientific Inc., Rockford, IL, EUA) foi utilizado para quantificar a quantidade de proteínas durante os eventos da digestão e utilizou-se Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão de referência.

Leite de ovelha pasteurizado (PSM); leite de ovelha fermentado por (SMK), submetidos à digestão gástrica parcial (GD) e à digestão total pancreática (DP) foram

separados de acordo com seus pesos moleculares em eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli, (1970).

Quantidades iguais de proteínas (30 µg) foram separadas por eletroforese (SDS-PAGE; 15% de poliacrilamida) após as diferentes fases de digestão. Para comparação, foram utilizados, juntamente com a amostra, um kit de calibração de peso molecular como marcadores (6,5-200 kDa, Sigma-Aldrich®, MO, EUA).

Os géis foram corados com 0,25% de azul brilhante Coomassie R250 em 25% em metanol e 10% de ácido acético. Para a descoloração o excesso de corante foi removido com 25% de metanol e 10% de mistura de ácido acético ou submetidos a coloração com prata.

4.3.3.5 Separação das amostras de peptídeos por ultrafiltração

As amostras de peptídeos utilizadas foram submetidas a ultrafiltração cuja porosidade (*cut off*) foi de 3,0 kDa. Posteriormente, essas amostras foram centrifugadas a 7.500xg por 40 minutos a 4 °C, resultando em duas frações proteicas: peptídeos contidos no retentado (> 3,0 kDa) e no permeado (<3,0 kDa). Somente a fração permeada foi utilizada para análise de Maldi-ToF-ToF e para ensaios de atividade biológica.

As concentrações dos peptídeos permeados SMK, ID, GD e PD utilizados para atividades biológicas foram de 5, 2,5, 1,25 e 0,625 mg/ mL. Todas as determinações foram realizadas pelo menos em triplicata (n = 3).

4.3.3.6 Análises das amostras de peptídeos por Maldi-ToF-ToF

Os perfis de peptídeos foram analisados por espectrometria de massas do tipo Maldi-ToF-ToF, utilizando um espectrômetro de massa Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com um laser 355 nmNd: YAG. A amostra foi misturada com solução de matriz compreendendo 10 mg/ mL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico em 50% de acetonitrila com 0,1% de ácido trifluoroacético. Subsequentemente, 0,5 µL desta mistura foram aplicados sobre uma placa de MALDI (aço moído MTP 384, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) e secos à temperatura ambiente. Os espectros de massa foram adquiridos em modo de reflexão positiva utilizando uma tensão de aceleração de 19 kV e uma frequência de laser de 100 Hz. A faixa de detecção de íons m/z foi de 0,5 a 3,0 kDa. A calibração da escala tempo-massa e a fragmentação dos íons parentais foi feita com uma mistura externa de 12 peptídeos (Bruker Daltonics). Os resultados foram exportados e plotados usando o

software Flex Control, e os espectros foram processados usando o software Flex Analysis One (Versão 3.0, Bruker Daltonics).

4.3.3.7 Determinação da atividade antimicrobiana

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos peptídicos foram usadas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 obtidas de nossa coleção de culturas. Todas as cepas foram preparadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas aerobicamente a 37 °C por 18-24 h.

Cada amostra liofilizada, foi diluída em água destilada estéril, centrifugada a 1000g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para os ensaios. Todos os experimentos foram realizados em uma placa de 96 poços, onde cada cavidade recebeu o inóculo da estirpe, preparado de acordo com o padrão de 0,5 µL ($1,5 \times 10^5$ UFC/ mL) em caldo BHI e amostras para um volume final de 100 µL. Os controles utilizados foram os seguintes: para os peptídeos (controle de cada alíquota de amostra + meio de cultura líquido), para o ensaio (cada alíquota de amostra + meio de cultura líquido + cada estirpe bacteriana), para controle positivo (cada estirpe bacteriana + meio de cultura líquido) e para controle negativo (cada estirpe bacteriana + meio de cultura líquido + 10 µg / mL de ciprofloxacina). A microplaca foi incubada a 37 °C por 18-24 h. A atividade antimicrobiana foi detectada por espectrofotometria Uv-Vis a uma absorbância de 595 nm (LM-LGC Biotechnology, São Paulo, Brasil). Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade antimicrobiana.

4.3.3.8 Ensaio antioxidante usando o método DPPH

A atividade de eliminação de radicais DPPH foi determinada pela aplicação do método desenvolvido por Brand-Williams, Cuvelier e Berset, (1995) com algumas modificações. Em tubos de Eppendorf, 25 µL de cada extrato foram misturados a 975 µL de uma solução de DPPH-metanol (25 mg/ L) preparada diariamente. Por causa da turbidez dos extratos, os brancos foram preparados após a mistura de 25 µL de cada concentração de peptídeo com 975 µL de metanol. A reação ocorreu por 2h no escuro à temperatura ambiente, posteriormente estes tubos foram centrifugados a 8000xg por 5 min a 4°C, e a absorbância do sobrenadante foi lida a 515nm utilizando um espectrofotômetro. A concentração de DPPH no meio reacional foi calculada a partir de uma curva de calibração $[DPPH] = ((0,0108x -$

0,0049) / 0,998) determinada pela regressão linear. O ácido ascórbico foi usado como controle positivo. Os resultados foram expressos em (% DPPH) e EC₅₀.

4.3.3.9 Determinação da atividade inibitória de ECA

A atividade inibitória da enzima conversora de angiotensina dos extratos de peptídeos foi avaliada *in vitro* pelo método de Cushman e Cheung (1971), com algumas modificações de acordo com Meira *et al.* (2012). Este método utiliza a enzima conversora da angiotensina (ECA) e o substrato Hippuril-Histidil-Leucine (HHL), que produz o ácido hipúrico. A quantidade de ácido hipúrico produzido foi usada para determinar a atividade anti-hipertensiva. Um volume de 20 µL de cada amostra em diferentes concentrações foi adicionado a 100 µL de solução de substrato tamponado (HHL 5 mM em tampão HEPES-HCl 50 mM contendo NaCl 300 mM, pH 8,3, 37 °C). A reação foi iniciada após a adição de 40 µL de ECA (0,1 U/ mL), e foi realizada a 37 °C por 30 min, posteriormente interrompida pela adição de 150 µL de HCl 1M. Em seguida, o ácido hipúrico liberado foi extraído com 1 mL de acetato de etila e a fase orgânica foi transferida para um tubo de vidro para ser removido por evaporação. O resíduo foi dissolvido em 800 µL de água destilada e a solução teve sua absorbância medida a 228 nm. A atividade inibidora da ECA foi expressa em percentagem, utilizando a seguinte fórmula: % de inibição = $(A - B) / (A - C) \times 100$; onde A é a absorbância sem amostra, B é a absorbância sem ECA, e C é a absorbância na presença tanto de ECA como de amostra. A atividade dos peptídeos também foi expressa como a concentração de proteína necessária para inibir 50% da atividade da ECA (EC₅₀). O captopril (1mM) foi utilizado como um controle positivo do inibidor da ECA neste ensaio.

4.3.3.10 Ensaio anti-hemolítico

Os eritrócitos do sangue humano foram obtidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação com Animais e com as normas internacionais estabelecidas pelo Guia Nacional de Atenção e Notícia de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde, e aprovadas pelo processo CEUA-UFPE N ° 23076.017009/ 2012 -13.

A capacidade inibitória dos peptídeos na hemólise dos eritrócitos foi realizada de acordo com Tenore *et al.* (2015). As células de eritrócitos humanos (HEC) foram separadas do plasma por centrifugação a 1200xg por 10 min a 4 °C, e lavadas três vezes com solução

salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1 M, pH 7,4. Em seguida, suspensão de eritrócitos (0,2 mL, 20% v/ v, dissolvido com PBS), foi misturado com cada concentração de peptídeo e agitado suavemente e incubado a 37 °C durante 30 min. No final da incubação, adicionou-se 0,2 mL de H₂O₂ 100 mM em solução de PBS. A mistura foi ainda incubada a 37 °C durante 2 h. Após incubação, a mistura foi diluída com 3,2 mL de PBS (pH 7,4). Após centrifugação a 1200xg durante 10 min a 4 °C, a absorbância do sobrenadante foi lida a 540 nm. Água foi usada como controle. A inibição da hemólise dos eritrócitos foi calculada como $(1 - A_{\text{amostra}} 540 / A_{\text{controle}} 540) \times 100\%$.

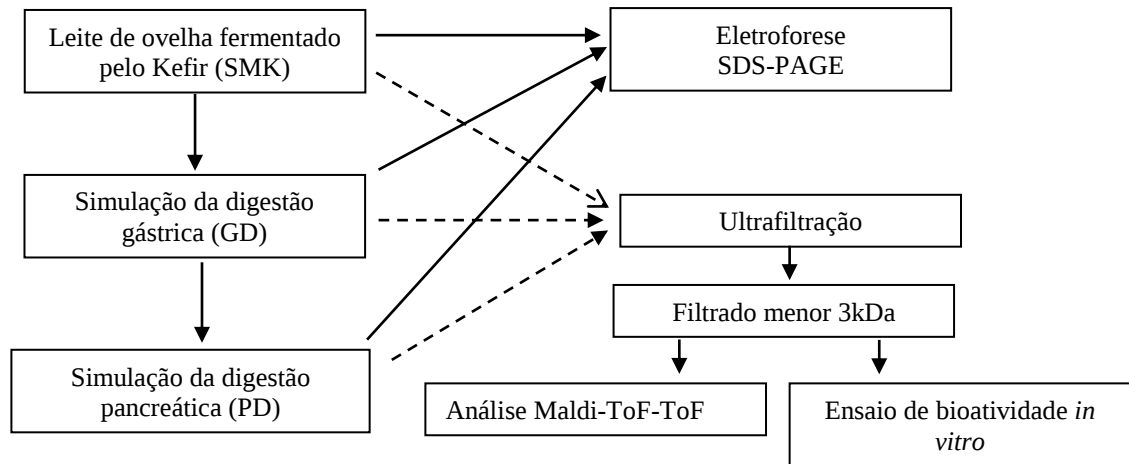
4.3.3.11 Análise Estatística

As tabelas de frequência de dados experimentais (%) são mostradas como a média de múltiplos ensaios ($\pm$ desvio padrão, quando indicado). As análises foram realizadas pelo software Microsoft Excel 2010 (Microsoft, Redmond, EUA).

4.3.4 Resultados e discussão

A figura 1 mostra o esquema da estratégia utilizada para identificar peptídeos e realizar ensaios de bioatividade das amostras: leite de ovelha pasteurizado (SM); Leite de ovelha fermentado por kefir retirado no início da digestão (SMK), parcialmente digerido (GD) e totalmente digerido (PD). O leite fermentado foi sequencialmente incubado com pepsina a pH 2.0 para mimetizar o ambiente gástrico e depois com um pool de pancreatina e sais biliares em pH 8,1 para simular a digestão pancreática. As frações do leite fermentado, em cada etapa da digestão foram ultrafiltradas; as frações de filtrado menores que 3kDa foram analisadas por espectrometria de Maldi-ToF e suas bioatividades *in vitro* foram avaliadas (antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e toxicidade).

Figura 1. Visão geral esquemática da estratégia analítica para identificar peptídeos do leite de ovelha fermentado em kefir na digestão gastrointestinal simulada

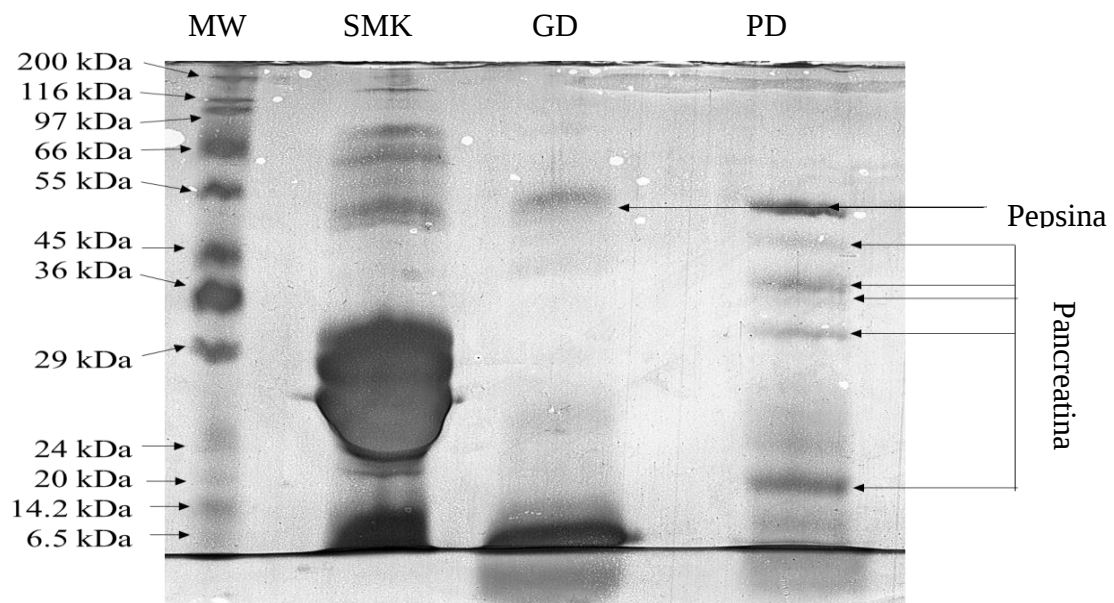


Fonte: O Autor (2018.)

4.3.4.1 Degradação das proteínas durante a digestão gastrointestinal simulada

O leite de ovelha fermentado em Kefir durante a simulação da digestão foi analisado por SDS-PAGE para determinar o grau de hidrólise das proteínas do leite, e o resultado é mostrado na Fig. 2.

Figura 2. Eletroforese SDS-PAGE (gel de poliacrilamida 15%) de proteínas de leite de ovelha fermentado em kefir durante a digestão *in vitro*: linha 2 - fase inicial (SMK), linha 3- fase gástrica (GD), linha 4- após total digestão (PD), linha 1- padrão de peso molecular (6,5-200 kDa)



Fonte: O Autor (2018).

As bandas resultantes do leite de ovelha fermentado por kefir (linha 2), indicaram que as proteínas do leite de ovelha não foram completamente hidrolisadas pelas bactérias ácido lácticas ou pelas leveduras durante a fermentação do kefir. Essas bandas de acordo com Ha *et al.* (2015) e Vincenzetti *et al.* (2008) podem corresponder a: lactoferrina (80,0 kDa); soro albumina (66,0 kDa); imunoglobulina (60,0 kDa); a banda difusa com um peso molecular variando de 36,0 a 23,0 kDa corresponde a frações de caseína; α -lactoglobulina (22,0 kDa), α -lactalbumina (14 kDa) e lisozima (10,0 kDa).

As bandas remanescentes (linha 3) após digestões gástricas indicam que a pepsina hidrolisa o conteúdo principal das proteínas do leite deixando um pouco das caseínas. Após a sequencial digestão pelas enzimas pancreáticas, a banda que correspondia às caseínas desapareceu. Proteínas de caseína em leite fermentado ou iogurte são totalmente hidrolisadas após a digestão pancreática, este padrão de hidrólise em SDS-PAGE foi semelhante ao de relatos anteriores (DUPONT *et al.*, 2010; JIN *et al.*, 2016).

Os resultados de Kopf-Bolan *et al.* (2014), em que vários produtos lácteos foram avaliados durante uma simulação de digestão, entre eles o kefir, observaram que após a fase gástrica as principais proteínas do leite, como caseínas, α -lactalbumina e soro albumina bovina foram completamente degradadas em fragmentos abaixo do limite de separação para eletroforese em gel, sendo um perfil observado no presente estudo.

Assim, a formação de peptídeos de baixo peso molecular ou a ocorrência de hidrólise total do substrato, com liberação de resíduos de aminoácidos, está de acordo com o comportamento esperado para as enzimas (pepsina e pancreatina) utilizadas nas reações de hidrólise em seus pH ótimo (DALLAS *et al.*, 2016).

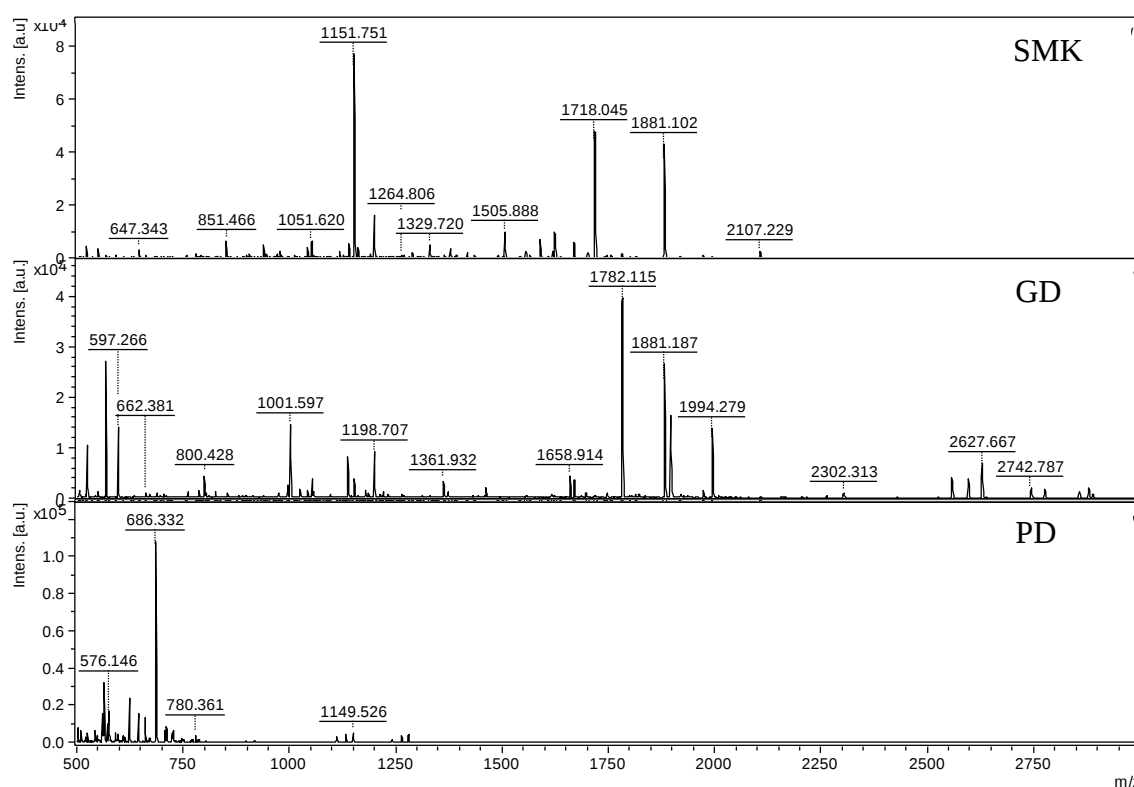
Como observado na eletroforese durante as fases gástrica e pancreática, foram gerados peptídeos de pesos moleculares abaixo de 6,5 kDa (Linha 3 e 4). Para recuperar esses peptídeos, identificá-los e proceder como atividades biológicas, realizou-se a ultrafiltração nas frações SMK, GD e PD. Assim, a condução do estudo ocorreu com os peptídeos com o peso molecular abaixo de 3kDa.

4.3.4.2 Perfil peptídico dos digeridos do leite de ovelha fermentado por kefir

Cerca de 1500 peptídeos bioativos foram identificados em kefir bovino, refletindo a atividade proteolítica dos grãos de kefir (Dallas *et al.*, 2016). No entanto, nos últimos anos, um número crescente de peptídeos bioativos têm sido relatados em produtos lácteos de pequenos ruminantes, como ovelhas (SIMSEK *et al.*, 2017; TAGLIAZUCCHI *et al.*, 2017).

As amostras dos peptídeos com peso molecular abaixo de 3kDa de digeridos gástricos e pancreáticos de leite de ovelha fermentado foram analisadas por espectrometria de Maldi-ToF-ToF. Como pode ser visto na Figura 3, os perfis peptídicos eram diferentes. A fração do leite fermentado foi a que apresentou o maior número de peptídeos. Após a fase gástrica, devido à clivagem das proteínas de alto peso molecular do leite pela pepsina foram encontrados peptídeos com peso molecular mais alto (acima de 2000 Da). Na fração pancreática havia peptídeos de baixo peso molecular, o maior de 1280Da correspondendo a um conjunto de 12 aminoácidos.

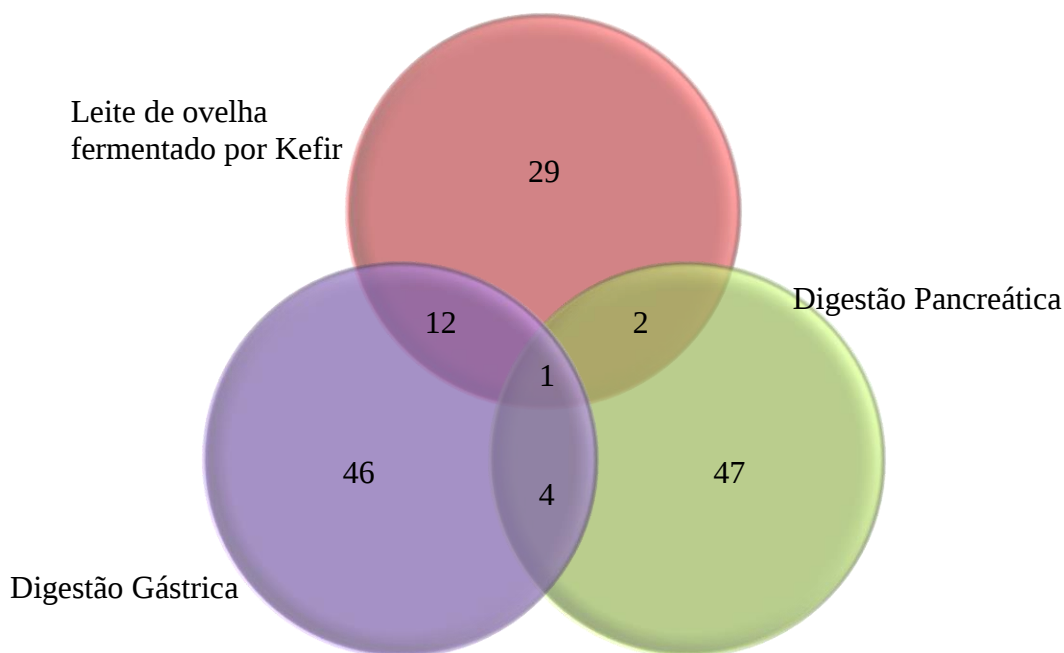
Figura 3. Perfil de espectrometria por Maldi-ToF-ToF do leite de ovelha fermentado pelo kefir (SMK), digerido gástrico (GD) e digerido pancreático (PD) entre 0.5 e 3kDa



Fonte: O Autor (2018).

O número de peptídeos identificados é mostrado na Fig. 4. Um total de 44, 63 e 54 peptídeos únicos foram identificados nas digestões de ovelha, gástrica e pancreática fermentadas em kefir, respectivamente.

Figura 4. Diagrama Venn do número de peptídeos identificados em leite de ovelha fermentado em kefir, digestão gástrica e digestão pancreática numa faixa entre 0,5 e 3 kDa



Fonte: O Autor (2018).

A digestão pancreática gerou os peptídeos mais exclusivos. Um total de 12 peptídeos de leite de ovelha fermentados em kefir sobreviveram na digestão gástrica. Um total de 5 e 3 peptídeos no digerido pancreático sobrepôs-se ao digerido gástrico e ao leite de ovelha fermentado em kefir, respectivamente. Apenas um peptídeo (661,8 Da) foi identificado em leite de ovelha fermentado em kefir, digestão gástrica e pancreática, este foi considerado como peptídeo sobrevivente da simulação da digestão gastrointestinal neste estudo. O peptídeo resistente à digestão de acordo com a literatura (GOULDSWORTHY; LEAVER; BANKS, 1996; MØLLER; RATTRAY; ARDÖ, 2013) pode corresponder ao fragmento NLLRF α_{S1} -CN(f19-23). Um total de 134 peptídeos observados no espectro de massa, e destes 60 foram identificados quando comparados com a literatura (Tabela 2).

Os peptídeos identificados originados a partir da α_{S1} -caseína (α_{S1} -CN), α_2 -caseína (α_2 -CN), β -caseína (β -CN), κ -caseína (κ -CN), β -Lactoglobulina (β -Lg), α -Lactalbumin (α -La) e β -Lactoglobulina (β -Lg). Entre os fragmentos peptídicos identificados após o processo de digestão *in vitro*, 12 são derivados das caseínas (4, 3, 3 e 2 a partir da β -CN, α_{S1} -CN, α_2 -CN, κ -CN, respectivamente) e 2 derivados a partir da α -lactalbumina (α -La).

Tabela 2. Perfis peptídicos de leite de ovelha fermentado por kefir (SMK), digestão gástrica (GD) e digestão pancreática (PD). As sequências são mostradas no código de letra única e as massas peptídicas são dadas em Da

Fragmento da Proteína	Sequência de amino ácido	Massa	SMK	GD	PD	Referencia
β -Lg (f143–146)	LPMH	508.041		•		(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)
α s1-CN f(168–172)	PLGTQ	514.088			•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -CN f(159–163)	PQSVL	542.116			•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -CN f(169–173)	KVLPV	554.169			•	(SIMSEK <i>et al.</i> , 2017)
β -La f(71–75)	IIAEK	573.201			•	(CHOBERT <i>et al.</i> , 2005)
β -CN f(209–220)	PVLGPVRGPFPI	624.203			•	(MEIRA <i>et al.</i> , 2012)
α s1-CN f(174–179)	PDAPSF	636.213			•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s2-CN f(177–181)	PQYLK	647.341	•		•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
κ -CN f(19–24)	SDKIAK	661.800	•	•	•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -Lg f(9–14)	GLDIQK	672.020		•		(CHOBERT <i>et al.</i> , 2005)
α s2-CN f(72 – 77))	ITVDDK	689.363		•	•	(SIMSEK <i>et al.</i> , 2017)
β -CN f(100–105)	ETMVPK	703.982		•		(SIMSEK <i>et al.</i> , 2017)
α s1-CN f(183–189)	PNPIGSE	712.353			•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s2-CN f(177–182)	PQYLKT	748.317			•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(17–22)	NENLLR	758.419	•			(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -CN f(157–163)	FPPQSVL	786.303		•	•	(FERNÁNDEZ-TOMÉ <i>et al.</i> , 2017)
α s1-CN f(173–179)	YPDAPSF	800.429		•		(TAGLIAZUCCHI <i>et al.</i> , 2017)
β -CN f(132–138)	NLHLPLP	803.425		•		(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
α s2-CN f(202–207)	PYVRYL	809.456		•		(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -CN f(75–82)	PPLTQTPV	851.470	•			(JIN <i>et al.</i> , 2016)
κ -CN f(156–163)	PPEINTVQ	897.592			•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(25–32)	VAPFPEVF	905.524	•			(CONTRERAS <i>et al.</i> , 2013; JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(166–173)	YVPLGTQY	939.581	•			(JIN <i>et al.</i> , 2016)
κ -CN f(43–50)	YQQKPVAL	945.553	•			(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(15–22)	VLNENLLR	970.605	•			(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -Lg f(f46–54)	LKPTPEGDL	974.605		•		(LACROIX; LI-CHAN, 2014)
β -CN f(183–190)	RDMPIQAF	977.532	•			(EBNER <i>et al.</i> , 2015) / (YAMAMOTO; AKINO; TAKANO, 1994)
β -CN f(167–175)	QSKVLPVPQ	994.643		•		(JIN <i>et al.</i> , 2016)
κ -CN f(45–53)	QKPVALINN	995.672		•		(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -Lg f(9–18)	GLDIQKVAGT	1.001.596		•		(CHOBERT <i>et al.</i> , 2005; BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015; ARRUTIA; RUBIO; RIERA, 2016)
β -Lgf(71–79)	IIAEKTIP	1.012.671	•			(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)
β -CN f(83–91)	VVPPFLQPE	1.024.599		•		(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -CN f(133–141)	LHLPLPLLQ	1.042.569	•	•		(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(17–24)	NENLLRFF	1.052.705	•	•		(EBNER <i>et al.</i> , 2015)

β -CN f(85-93)	PPFLQPEVM	1.056.590	•	•	(FERNÁNDEZ-TOMÉ <i>et al.</i> , 2017)
β -CN f(43-51)	DELQDKIHP	1.094.754		•	(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
α s1-CNf(15e23)	VLNENLLRF	1.117.692		•	(MØLLER; RATTRAY; ARDÖ, 2013)
β -CN f(83-92)	VVPPFLQPEI	1.137.695		•	(SIMSEK <i>et al.</i> , 2017)
β -CN f(199-209)	GPVRGPFPIIV	1.151.780	•	•	(FERNÁNDEZ-TOMÉ <i>et al.</i> , 2017)
α s2-CN f(100-109)	YQGPIVLNPW	1.185.725		•	(JIN <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(23-32)	FFVAPFPEVF	1.198.707		•	(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -Lg f(149-159)	LAFNPTQLEGQ	1.212.650		•	(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)
α s1-CN f(25-35)	VAPFPEVFGKE	1.219.671		•	(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -La f(125-135)	TPEVDNEALEK	1.242.590		•	(CHOBERT <i>et al.</i> , 2005)
κ -CN f(51-60)	INNQFLPYPY	1.268.731	•		(JIN, 2016)
β -CN f(152-163)	PPTVMFPPQSVL	1.311.753		•	(JIN, 2016)
β -Lg f(46-57)	LKPTPEGDLEIL	1.329.723	•		(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)
α s1-CN f(133-144)	EPMIGVNQELAY	1.363.880	•		(JIN <i>et al.</i> , 2016)
β -CN f(129-140)	DVENLHLPLPLL	1.371.941		•	(FERNÁNDEZ-TOMÉ <i>et al.</i> , 2017)
α -La f(41-53)	VQNNDSTEYGLF	1.505.891	•		(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)
β -CN f(193-206)	YQEPVLGPVRGPFPP	1.555.858	•		(GOULDSWORTHY; LEAVER; BANKS, 1996; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2016)
β -CN f(195-209)	EPVLGPVRGPFPIIV	1.589.965	•		(MØLLER; RATTRAY; ARDÖ, 2013)
β -Lg f (149-162)	LSFNPTQLEEQCHI	1.658.896		•	(ARRUTIA; RUBIO; RIERA, 2016)
β -CN f(192-206)	LYQEPVLGPVRGPFPIIL	1.668.987	•	•	(GOULDSWORTHY; LEAVER; BANKS, 1996; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2016)
β -CN f(143-156)	WMHQPHQPLPPTVM	1.696.880		•	(FERNÁNDEZ-TOMÉ <i>et al.</i> , 2017)
α s2-CN f(194-207)	IQPKTKVIPYVRYL	1.718.045	•	•	(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -CN f(193-208)	YQEPVLGPVRGPFPII	1.782.015	•	•	(FERNÁNDEZ-TOMÉ <i>et al.</i> , 2017)
α s1-CN f(24-39)	FVAPFPEVFGKEKVNE	1.836.142		•	(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -CN f(193-209)	YQEPVLGPVRGPFPIIV	1.881.155		•	(EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -CN f(69-93)	SLPQNIPPLTQTPVVVP PFLQPEVM	2.742.760		•	(MØLLER; RATTRAY; ARDÖ, 2013)

Fonte: O Autor (2018).

Foram identificados, de acordo com a literatura, doze peptídeos funcionais, que mostraram atividades biológicas como anti-hipertensivos, antioxidantes, imunomoduladores,

anti-diabetogênicos (atividade inibidora da dipeptidil peptidase IV) e antibacterianos para alguns dos peptídeos identificados (Tabela 3).

Tabela 3. Peptídeos identificados no leite de ovelha fermentado em kefir de acordo com os dados da espectrometria de massa em comparação com a literatura

Fragmento da proteína	Sequência de amino ácido	Função Bioativa	Referencia
α s1-CN f(25–32)	VAPFPEVF	Anti-hipertensiva	(CONTRERAS <i>et al.</i> , 2009; JIN, Y. <i>et al.</i> , 2016)
α s1-CN f(17–22)	NENLLR	Anti-hipertensiva	(PAPADIMITRIOU <i>et al.</i> , 2007)
α s2-CN f(194–207)	IQPKTKVIPYVRYL	Antioxidante	(SAABENA FARVIN <i>et al.</i> , 2010)
β -CN f(193–209)	YQEPVLGPVRGPFPIIV	Antioxidante	(SAABENA FARVIN <i>et al.</i> , 2010)
β -CN f(183–190)	RDMPIQAF	Anti-hipertensiva	(YAMAMOTO; AKINO; TAKANO, 1994; EBNER <i>et al.</i> , 2015)
β -CN f(193-206)	YQEPVLGPVRGPFPP	Imunomoduladora	(GOULDSWORTHY; LEAVER; BANKS, 1996; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2016)
β -CN f(192-206)	LYQEPVLGPVRGPFPIIL	Imunomoduladora	(GOULDSWORTHY; LEAVER; BANKS, 1996; NONGONIERMA; FITZGERALD, 2016)
α -La f(41-53)	VQNNDSTEYGLF	Anti-diabetogênica	(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)
β -Lg f(46–57)	LKPTPEGDLLEIL	Anti-diabetogênica	(SAABENA FARVIN <i>et al.</i> , 2010;
		Antioxidante	BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)(
β -Lg f(f46-54)	LKPTPEGDL	Anti-diabetogênica	(LACROIX; LI-CHAN, 2014)
β -Lg f (71-79)	IHAETKIP	Anti-diabetogênica	(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015;
			ARRUTIA; RUBIO; RIERA, 2016)
β -Lg (f143–146)	LPMH	Anti-bacteriana	(BRANDELLI; DAROIT; CORRÊA, 2015)

Fonte: O Autor (2018).

Ebner *et al.* (2015), ao estudarem o efeito da fermentação do leite de vaca pelo kefir e o processo de digestão *in vitro* deste produto, também encontraram peptídeos com atividades biológicas, incluindo aqueles com ação anti-hipertensiva, antioxidante, opióide, funções imunomoduladoras e antimicrobiana. Estes dados demonstram que os microrganismos do kefir liberam peptídeos que poderiam melhorar a funcionalidade do produto.

Alguns dados são relatados sobre a liberação de peptídeos bioativos de leite fermentado de kefir de leite de ovelha e caprino (HERNANDEZ LEDESMA; RAMOS, GÓMEZ-RUIZ, 2011); um estudo recente produzido por nosso grupo (LIMA *et al.*, 2017) identificou atividades biológicas (antimicrobiana e antioxidante) sobre o extrato aquoso de peptídeos de leite de ovelha fermentado em kefir, e decidiu-se, portanto, realizar análises biológicas desse leite durante a digestão *in vitro*.

4.3.4.4 Determinação da atividade antimicrobiana

A Tabela 4 apresenta os resultados observados para as frações peptídicas inferiores a 3kDa, obtidas do leite fermentado durante a digestão gastrointestinal na concentração de 5 mg/ mL em relação à sua atividade antimicrobiana.

Tabela 4. Resultados dos ensaios de bioatividades dos extratos peptídicos (menores que 3kDa) obtidos do leite de ovelha fermentado por kefir (SMK), após a digestão gástrica (GD) e digestão pancreática (PD)

Ensaio de Bioatividade		Amostras		
		SMK	GD	PD
Atividade antimicrobiana^a(%)				
Cepas	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19117	90,12	10,12	89,83
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	37,31	54,60	86,11
	<i>Salmonella typhimurium</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	75,89	90,06	40,87
Atividade antioxidante (%)				
Concentração dos peptídeos	5 (mg/ mL)	52,32	46,34	---
	2,5 (mg/ mL)	51,65	50,44	---
	1,25 (mg/ mL)	53,90	51,46	42,60
	0,625 (mg/ mL)	53,93	53,00	53,99
	EC ₅₀	9,56	2,55	0,25
Atividade inibidora de ECA (%)				
Concentração dos peptídeos	5 (mg/ mL)	62,85	83,90	131,58
	2,5 (mg/ mL)	58,51	41,80	264,71
	1,25 (mg/ mL)	93,50	95,05	188,24
	0,625 (mg/ mL)	80,19	100,00	69,04
	EC ₅₀	6,61	9,64	0,19
Atividade anti-hemolítica (%)				
Concentração dos peptídeos	5 (mg/ mL)	85,43	89,23	39,40
	2,5 (mg/ mL)	94,67	88,47	25,10
	1,25 (mg/ mL)	91,07	88,27	73,13
	0,625 (mg/ mL)	90,60	74,5	90,07

a= para a atividade antimicrobiana foi usada uma concentração de 5 mg/ mL das amostras de peptídeos.

Fonte: O Autor (2018).

De acordo com os resultados da atividade antimicrobiana, é possível observar uma alta atividade da fração antes da digestão (SMK) contra *L. monocytogenes* e *S. typhimurium* atingindo valores de inibição de 90,12% e 75,89%, respectivamente. Também foi possível verificar que o processo digestivo pode, em alguns casos, aumentar o nível de atividade dos

peptídeos formados e liberados, como na linhagem de *E. coli*, que apresentou valores de 37,31% com SMK, e o crescimento foi expresso gradualmente na inibição da bactéria patogênica com 54,60% e 86,11% após digestão *in vitro*, respectivamente fase gástrica (GD) e fase pancreática (PD). No entanto, para *S. typhimurium* houve uma diminuição na inibição da atividade após o processo digestivo.

Aguilar-Toalá *et al.*, (2017) extraíram peptídeos inferiores de 3 kDa de leite bovino reconstituído submetidos à fermentação de *L. plantarum* isolada de queijos produzidos com leite de ovelha. Obtiveram uma inibição de 57,41% contra *E. coli* e 72,76% contra *L. monocytogenes*. Como utilizavam um único tipo de bactéria fermentativa, uma possível limitação na liberação de peptídeos, diferentemente da composição de microrganismos fermentativos presentes nos grãos de kefir (diversas bactérias e leveduras), que podem atuar de diversas formas com suas enzimas proteolíticas, e assim liberar mais peptídeos (CHAVES-LÓPEZ *et al.*, 2014).

Esmaeilpour *et al.* (2016), trabalharam com peptídeos de caseína do leite de cabra extraídos por tratamento enzimático. Utilizaram frações menores de 3 kDa contendo 6 mg/mL de concentração de peptídeo, os peptídeos produzidos pela ação da tripsina apresentaram inibição de 47,53%, e quando associados à tripsina e ficina apresentaram um decaimento a 14,96%, evidenciando atividades menores através do uso de o conjunto de enzimas. Esses resultados foram semelhantes aos dados apresentados no presente estudo. Assim, indicando que a ação de duas enzimas simultâneas pode restringir a liberação do peptídeo, influenciando assim a inibição de *S. typhimurium*.

Portanto, para sugerir que os peptídeos do presente estudo, quando liberados de proteínas oriundas da dieta por enzimas digestivas *in vitro*, esses peptídeos podem ter um efeito benéfico no combate aos referidos patógenos.

4.3.4.5 Ensaio antioxidante

Como pode ser observado na Tabela 4, os peptídeos com menos de 3 kDa, encontrados no leite fermentado e nas frações digestivas, apresentaram atividade antioxidante através do método DPPH. De acordo com os resultados expressos em percentual de inibição, em geral, a atividade antioxidante aumentou com os efeitos da proteólise que ocorreram durante os estágios do processo digestivo. Quanto menor a concentração testada neste ensaio, maior essa atividade, sendo a maior apresentada na amostra PD (53,99%) com 0,625mg/ mL.

Esse comportamento através da liberação de peptídeos está de acordo com os estudos de Peña-Ramos e Xiong (2002) e Wu, Chen e Shiau (2003), que observaram que peptídeos de menor peso molecular possuem maior taxa de atividade antioxidante quando em comparação com peptídeos de massa molecular mais elevada.

Nos resultados apresentados no EC₅₀, a fração SMK apresentou EC₅₀ 9,56 mg/ mL, seguida de 2,54 mg/ mL e 0,25 mg/ mL das fases GD e PD, respectivamente. A variação na inibição pode ser justificada pelas diferentes especificidades enzimáticas no local de clivagem das proteínas, bem como a presença ou ausência de grupos funcionais, tais como grupos hidroxila em compostos fenólicos (CUMBY *et al.*, 2008).

O aumento da atividade antioxidante com a menor concentração de peptídeos também foi observado no trabalho de Lima *et al.* (2017), que extraíram peptídeos do extrato aquoso ao longo do prazo de validade do mesmo produto estudado. A partir da maior concentração testada 25 mg/ mL para o menor 3,25 mg/ mL, um aumento de aproximadamente 25% da atividade antioxidante pode ser observado.

De acordo com o presente estudo, Saabena Farvin *et al.*, (2010) isolaram peptídeos de acordo com seu peso molecular (acima de 30kDa, entre 10-30kDa, entre 3-10kDa e inferior a 3kDa) de um iogurte bovino comercial enriquecido com óleo de peixe, e todas as frações isoladas apresentaram atividade antioxidante, principalmente frações menores que 3 kDa com $67,06 \pm 0,78\%$ de inibição contra a atividade de eliminação radical pelo DPPH.

A porcentagem de atividade antioxidante com o leite de ovelha fermentado em kefir do presente estudo com 0,625 m/ mL mostrou 53,90%. Ao e Li (2013) avaliaram as frações obtidas durante e após o processo digestivo *in vitro* da caseína bovina extraída do leite em pó comercial. Este estudo apresentou aumento da atividade antioxidante ao longo do processo digestivo - caseína não digerida ($6,19 \pm 1,57\%$), fase gástrica ($25,12 \pm 0,26\%$) e fase gastrointestinal ($34,65 \pm 1,20\%$). Os dois estudos apresentaram o mesmo comportamento durante o experimento do processo digestivo. Indicando que quanto maior o grau de hidrólise das proteínas presentes no derivado lácteo, maior a liberação de peptídeos bioativos e, portanto, maior a ação antioxidante.

Os resultados relatados por Espejo-Carpio *et al.* (2016), que obtiveram peptídeos da digestão *in vitro* de leite comercial de cabra UHT. Esses peptídeos apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH com as taxas de EC₅₀ com peptídeos extraídos do leite de cabra não pasteurizado, gástrico e gastrointestinal, de 3,78 mg/ mL, 3,04 mg/ mL e 1,39 mg/

mL, respectivamente. Esses resultados também são menores quando comparados ao presente estudo.

4.3.4.6 Determinação da atividade inibidora de ECA

Os resultados obtidos para a atividade anti-hipertensiva são apresentados na (Tabela 4). Todas as frações (SMK, GD e PD) apresentaram atividade de inibição da ECA, e a GD e PD apresentaram as maiores porcentagens de inibição.

Jin *et al.* (2016) verificaram que o iogurte produzido a partir de leite bovino e submetido à digestão gastrointestinal aumentava significativamente a inibição da ECA, sendo 14% em iogurte, 23% na fase gástrica e 54% na fase pancreática. No presente estudo foram encontrados resultados semelhantes, desde o processo digestivo inicial até apresentar um aumento gradual do processo de inibição após o processo de completa digestão, porém, destaca-se por maiores níveis de inibição após digestão completa.

Como nas atividades antimicrobiana e antioxidante, a proteólise durante o processo digestivo aumentou as taxas de atividade anti-hipertensiva, com EC_{50} sendo 0,19 mg/ mL após o processo de digestão *in vitro* (Tabela 4).

Contreras *et al.*, (2013), ao utilizarem peptídeos derivados de caseína bovina submetidos à digestão, constataram que os fragmentos proteicos resistem ao processo digestivo na fase gástrica, sem bioatividades, enquanto outros peptídeos serão gerados por hidrólise durante os demais processos digestivos (QUIRÓS *e al.*, 2009), podendo apresentar sua ação inibitória da ECA após digestão completa.

Além de realizar a degradação de proteínas em diferentes extensões, a digestão gastrointestinal desempenha um papel fundamental na formação e liberação de peptídeos inibidores da ECA (SENTANDREU; TOLDRA, 2006).

Ao analisar a atividade anti-hipertensiva de peptídeos menores de 3 kDa obtidos a partir de leite UHT bovino, fermentado por *L. casei* PRA205 e *L. rhamnosus* PRA 331, Solieri, Rutella e Tagliazucchi (2015), encontraram quanto maior o tempo de fermentação, maior o grau de hidrólise das proteínas presentes no leite e, portanto, maior liberação de peptídeos inibidores da ECA, resultando em EC_{50} 54,57 e 212,38 µg/ mL, respectivamente.

Os dados do presente estudo também estão de acordo com outros estudos (MORENO-MONTORO *et al.*, 2017; MOSLEHISHAD *et al.*, 2013). Moreno-Montoro *et al.* (2017), utilizando leite de cabra fermentado por *L. plantarum* e ultrafiltrados abaixo de 3 kDa, apresentaram maior atividade da ECA (em torno de 50%). Indicando, nesse sentido, que o

fracionamento resultou em frações de baixo peso molecular, aumentando assim a inibição da ECA. Moslehishad *et al.* (2013) também utilizaram extrato peptídico com frações menores de 3 kDa de leite de vaca e camela fermentado por *L. rhamnosus* de 14 dias, respectivamente com EC₅₀ 2,18 e 2,25 mg/ mL.

Assim, os resultados encontrados concordam com os apresentados na literatura, entretanto o método de digestão *in vitro* resultou em maior liberação de peptídeos com atividade inibitória da ECA após digestão completa, bem como após o fracionamento, selecionando apenas os peptídeos de baixo peso molecular com alta bioatividade.

4.3.4.7 Ensaio anti-hemolítico

Os peptídeos bioativos têm sido relatados como resultados positivos para a atividade anti-hemolítica (XUE *et al.*, 2009; GHRIBI *et al.*, 2015). Para esta atividade, os resultados do presente estudo (Tabela 4) mostram que todas as frações (SMK, GD e PD) e concentrações de peptídeo avaliadas atuaram como anti-hemolíticas contra a hemólise eritrocitária induzida pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Entre as concentrações dos peptídeos, foi possível observar que quando foram utilizados 0,625 mg/ mL de peptídeos, os melhores resultados foram obtidos; com essa concentração, as frações SMK, GD e PD apresentaram 90,60%, 74,05% e 90,07%, respectivamente, de ação anti-hemolítica. Karou *et al.* (2011) relatam que o efeito anti-hemolítico pode ser dependente da fragmentação, liberação e concentração do extrato peptídico, em concordância com os presentes resultados.

Aguilar-Toalá *et al.* (2017) utilizaram peptídeos menores de 3 kDa de leite bovino reconstituído submetidos à fermentação de *L. plantarum* isolada de queijos produzidos a partir de leite de ovelha. Obtiveram $37,47 \pm 4,77\%$ entre os melhores resultados. O resultado do trabalho citado pode ser comparado com o presente para a fração SMK, na qual um derivado lácteo também é utilizado, porém, destaca-se com o percentual de atividade encontrado.

Tenore *et al.* (2015) avaliaram a mussarela de Bufala após a digestão gastrointestinal, quando utilizando 2 mg/ mL da fração totalmente digerida, obteve 91,25% de atividade anti-hemolítica. Estes dados apresentam uma diferença na concentração do extrato submetido à digestão quando comparados aos aqui apresentados, possuem uma concentração de peptídeos aproximadamente três vezes maior para obter resultados semelhantes ao estudo (0,625 mg/ mL onde foi possível obter 90,07% após digestão gastrointestinal completa).

4.3.5 Conclusões

Neste estudo, o perfil peptídico foi observado durante uma simulação da digestão *in vitro* de leite de ovelha fermentado em Kefir e suas frações gástrica e pancreática. Destes perfis, foram observados 134 peptídeos diferentes, 60 foram identificados por comparação com a literatura, destes, doze com atividades biológicas já relatadas. E um fragmento (661.8Da) persistiu após os tratamentos enzimáticos da simulação de digestão.

As atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e anti-hemolítica foram observadas a partir das frações estudadas do leite de ovelha fermentado em kefir e suas frações após digestão gástrica e pancreática, com concentrações acima de 0,625 mg/ mL. A fração peptídica PD (obtida após o processo de digestão *in vitro*) demonstrou o melhor conjunto de bioatividades, esta fração contém os peptídeos libertados pela pancreatina. Devido ao pequeno tamanho, estes peptídeos podem ser facilmente absorvidos pelo organismo e agir em conjunto para melhorar a saúde do consumidor deste alimento.

O destaque deste trabalho é a importância do uso do tratamento enzimático para simular a digestão *in vitro*. Os resultados indicam que estes peptídeos multifuncionais têm um potencial valioso e a identificação das sequências exatas de aminoácidos que conferem as bioatividades pode permitir a síntese e purificação de peptídeos bioativos para sua aplicação, empregando-os como compostos dietéticos bioativos para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos, tais como seus isolamentos para uma indústria de biotecnologia. No entanto, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo preciso de ação para esclarecer a relação com a ação estrutural dos peptídeos e para validar as atividades biológicas.

4.3.6 Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro da CAPES (Conselho Nacional de Aperfeiçoamento de Ensino Superior), e aos laboratórios envolvidos nesta pesquisa LABTECBIO, CENAPESQ e Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

4.3.7 Referencias

AGUILAR-TOALÁ, J. E.; SANTIAGO-LÓPEZ, L.; PERES, C. M.; PERES, C.; GARCIA, H. S.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Assessment of Multifunctional Activity of Bioactive Peptides Derived from

- Fermented Milk by Specific *Lactobacillus Plantarum* Strains. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 65–75, 2017.
- AO, J.; LI, B. Stability and Antioxidative Activities of Casein Peptide Fractions during Simulated Gastrointestinal Digestion *in vitro*: Charge Properties of Peptides Affect Digestive Stability. **Food Research International**, v. 52, p. 334–341, 2013.
- ARRUTIA, F.; RUBIO, R.; RIERA, F. A. Production and Membrane Fractionation of Bioactive Peptides from a Whey Protein Concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 184, p. 1–9, 2016.
- ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and Other Cultured Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 2017.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n.1, p. 25–30, 1995.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.
- CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; PAPARELLA, A.; MARTUSCELLI, M.; CORSETTI, A.; TOFALO, R.; SUZZI, G. Impact of Microbial Cultures on Proteolysis and Release of Bioactive Peptides in Fermented Milk. **Food Microbiology**, v. 42, p. 117–121, 2014.
- CHOBERT, J.-M.; KHALED EL-ZAHAR; SITOHY, M.; DALGALAARRONDO, M.; MÉTRO, F.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T. Angiotensin I-Converting-Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity of Tryptic Peptides of Ovine β -Lactoglobulin and of Milk Yoghurts Obtained by Using Different Starters. **Lait**, v. 19, p. 141–152, 2005.
- CONTRERAS, M. M.; CARRÓN, R.; MONTERO, M. J.; RAMOS, M.; RECIO, I. Novel Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Activity. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 10, p. 566–573, 2009.
- CONTRERAS, M. M.; SANCHEZ, D.; SEVILLA, M. Á.; RECIO, I.; AMIGO, L. Resistance of Casein-Derived Bioactive Peptides to Simulated Gastrointestinal Digestion. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 71–78, 2013.
- CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**, v.109, n. 1, p. 144–148, 2008.
- CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p.

1637–1648, 1971.

DALLAS, D. C.; CITERNE, F.; TIAN, T.; SILVA, V. L. M.; KALANETRA, K. M.; FRESE, S. A.; ROBINSON, R. C.; MILLS, D. A.; BARILE, D. Peptidomic Analysis Reveals Proteolytic Activity of Kefir Microorganisms on Bovine Milk Proteins. **Food Chemistry**, v. 197, p. 273–284, 2016.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically Active Peptides: Processes for Their Generation, Purification and Identification and Applications as Natural Additives in the Food and Pharmaceutical Industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.

LIMA, M. S. F.; DA SILVA, R. A.; DA SILVA, M. F.; DA SILVA, P. A. B.; COSTA, R. M. P. B.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1–10, 2017.

DUPONT, D.; MANDALARI, G.; MOLLÉ, D.; JARDIN, J.; ROLET-RÉPÉCAUD, O.; DUBOZ, G.; LÉONIL, J.; MILLS, C. E. N.; MACKIE, A. R. Food Processing Increases Casein Resistance to Simulated Infant Digestion. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 11, p. 1677–1689, 2010.

EBNER, J.; AŞÇI ARSLAN, A.; FEDOROVA, M.; HOFFMANN, R.; KÜÇÜKÇETİN, A.; PISCHETSRIEDER, M. Peptide Profiling of Bovine Kefir Reveals 236 Unique Peptides Released from Caseins during Its Production by Starter Culture or Kefir Grains. **Journal of Proteomics**, v. 117, p. 41–57, 2015.

ESMAEILPOUR, M.; EHSANI, M. R.; AMINLARI, M.; SHEKARFOROUSH, S.; HOSEINI, E. Antimicrobial Activity of Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysis of Goat Milk Caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 3, p. 599–605, 2016.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GARCÍA-MORENO, P. J.; PÉREZ-GÁLVEZ, R.; MORALES-MEDINA, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Effect of Digestive Enzymes on the Bioactive Properties of Goat Milk Protein Hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 21–28, 2016.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; TABERNERO, M.; LARGO, C.; RECIO, I.; MIRALLES, B. Effect of the Long-Term Intake of a Casein Hydrolysate on Mucin Secretion and Gene Expression in the Rat Intestine. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 176–180, 2017.

GHRIBI, A. M.; SILA, A.; PRZYBYLSKI, R.; NEDJAR-ARROUME, N.; MAKHLOUF, I.; BLECKER, C.; ATTIAA, H.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A. Purification and

- identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein concentrate. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 516–525, 2015.
- GOULDSWORTHY, A. M.; LEAVER, J.; BANKS, J. M. Application of a mass spectrometry sequencing technique for identifying peptides present in Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 8–9, p. 781–790, 1996.
- HA, M.; SABHERWAL, M.; DUNCAN, E.; STEVENS, S.; STOCKWELL, P.; MCCONNELL, M.; EL-DIN BEKHIT, A.; CARNE, A. In-Depth Characterization of Sheep (*Ovis aries*) Milk Whey Proteome and Comparison with Cow (*Bos taurus*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139774, 2015.
- HERNÁNDEZ-LEDESMA, B.; RAMOS, M.; GÓMEZ-RUIZ, J. A. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. **Small Ruminant Research**, v.101, p. 196– 204, 2011.
- JIN, Y.; YU, Y.; QI, Y.; WANG, F.; YAN, J.; ZOU, H. Peptide Profiling and the Bioactivity Character of Yogurt in the Simulated Gastrointestinal Digestion. **Journal of Proteomics**, v. 141, p. 24–46, 2016.
- KAROU, S. D.; TCHACONDO, T.; OUATTARA, L.; ANANI, K.; SAVADOGO, A.; AGBONON, A.; ATTAIA, M. Ben; DE SOUZA, C.; SAKLY, M.; SIMPORE, J. Antimicrobial, Antiplasmodial, Haemolytic and Antioxidant Activities of Crude Extracts from Three Selected Togolese Medicinal Plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 808–813, 2011.
- KOPF-BOLANZ, K. A.; SCHWANDER, F.; GIJS, M.; VERGE, G.; PORTMANN, R.; EGGER, L. Validation of an *In vitro* Digestive System for Studying Macronutrient Decomposition in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 5, p. 245–250, 2012.
- KOPF-BOLANZ, K. A.; SCHWANDER, F.; GIJS, M.; VERGÈRES, G.; PORTMANN, R.; EGGER, L. Impact of Milk Processing on the Generation of Peptides during Digestion. **International Dairy Journal**, v. 35, n. 2, p. 130–138, 2014.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation and Characterization of Peptides with Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity from Pepsin-Treated Bovine Whey Proteins. **Peptides**, v. 54, p. 39–48, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- MACORI, G.; COTTER, P. D. Novel Insights into the Microbiology of Fermented Dairy Foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 172–178, 2018.

- MEIRA, S. M. M.; DAROIT, D. J.; HELFER, V. E.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; CARRO, S.; BRANDELLI, A. Bioactive Peptides in Water-Soluble Extracts of Ovine Cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 322–329, 2012.
- MØLLER, K. K.; RATTRAY, F. P.; ARDÖ, Y. Application of Selected Lactic Acid Bacteria and Coagulant for Improving the Quality of Low-Salt Cheddar Cheese: Chemical, Microbiological and Rheological Evaluation. **International Dairy Journal**, v. 33, n. 2, p. 163–174, 2013.
- MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; RUFIÁN-HENARES, J. Á.; MARTÍNEZ, R. G.; MIRALLES, B.; BERGILLOS, T.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; JAUREGI, P. Antioxidant, ACE-Inhibitory and Antimicrobial Activity of Fermented Goat Milk: Activity and Physicochemical Property Relationship of the Peptide Components. **Food Function**, v. 8, n. 8, p. 2783–2791, 2017.
- MOSLEHISHAD, M.; EHSANI, M. R.; SALAMI, M.; MIRDAMADI, S.; EZZATPANAH, H.; NASLAJI, A. N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The Comparative Assessment of ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptide Fractions Obtained from Fermented Camel and Bovine Milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 2, p. 82–87, 2013.
- MROS, S.; CARNE, A.; HA, M.; BEKHIT, A. E. D.; YOUNG, W.; MCCONNELL, M. Comparison of the Bioactivity of Whole and Skimmed Digested Sheep Milk with that of Digested Goat and Cow Milk in Functional Cell Culture Assays. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 202–208, 2017.
- NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Strategies for the Discovery, Identification and Validation of Milk Protein-Derived Bioactive Peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 26–43, 2016.
- PAPADIMITRIOU, C. G.; VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A.; SILVA, S. V.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; ALICHANIDIS, E. Identification of Peptides in Traditional and Probiotic Sheep Milk Yoghurt with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 647–656, 2007.
- PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.

- PICARIELLO, G.; MAMONE, G.; NITRIDE, C.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Protein Digestomics: Integrated Platforms to Study Food-Protein Digestion and Derived Functional and Active Peptides. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 120–134, 2013.
- QUIRÓS, A.; CONTRERAS, M. del M.; RAMOS, M.; AMIGO, L.; RECIO, I. Stability to Gastrointestinal Enzymes and Structure-Activity Relationship of beta-Casein-Peptides with Antihypertensive Properties. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1848–1853, 2009.
- SABEENA FARVIN, K. H.; BARON, C. P.; NIELSEN, N. S.; OTTE, J.; JACOBSEN, C. Antioxidant Activity of Yoghurt Peptides: Part 2 – Characterisation of Peptide Fractions. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1090–1097, 2010.
- SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. A Fluorescence-Based Protocol for Quantifying Angiotensin-Converting Enzyme Activity. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2423–2427, 2006.
- SIMSEK, S.; SÁNCHEZ-RIVERA, L.; EL, S. N.; KARAKAYA, S.; RECIO, I. Characterisation of *in vitro* Gastrointestinal Digests from Low Fat Caprine Kefir Enriched with Inulin. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 68–74, 2017.
- SOLIERI, L.; RUTELLA, G. S.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of Non-Starter Lactobacilli on Release of Peptides with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities during Bovine Milk Fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 108–116, 2015.
- TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion. **International Dairy Journal**, v. 71, p. 6-16, 2017.
- TENORE, G. C.; RITIENI, A.; CAMPIGLIA, P.; STIUSO, P.; DI MARO, S.; SOMMELLA, E.; PEPE, G.; D'URSO, E.; NOVELLINO, E. Antioxidant Peptides from “Mozzarella Di Bufala Campana DOP” after Simulated Gastrointestinal Digestion: *In vitro* Intestinal Protection, Bioavailability, and Anti-Haemolytic Capacity. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 365–375, 2015.
- THÉOLIER, J.; HAMMAMI, R.; LABELLE, P.; FLISS, I.; JEAN, J. Isolation and Identification of Antimicrobial Peptides Derived by Peptic Cleavage of Whey Protein Isolate. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 706–714, 2013.
- VINCENZETTI, S.; POLIDORI, P.; MARIANI, P.; VITA, A. Protein Fraction Characterization of Sheep Milk from the Comisana Breed. **Veterinary research communications**, v. 32 Suppl 1, p. S179-S181, 2008.
- WU, H.-C.; CHEN, H.-M.; SHIAU, C.-Y. Free Amino Acids and Peptides as Related to Antioxidant Properties in Protein Hydrolysates of Mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food**

Research International, v. 36, n. 9–10, p. 949–957, 2003.

XUE, Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (*Brassica napus*) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions.

Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 12, p. 5287–5293, 2009.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive Effect of the Peptides Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790.

Journal of Dairy Science, v. 77, n. 4, p. 917–922, 1994.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível a caracterização de microbiológica, bioquímica e funcional do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir, uma fonte ainda pouco pesquisada. Entre as linhagens isoladas, as leveduras foram identificadas como *Saccharomyces cerevisiae* e as bactérias ácido lácticas da espécie *Lactobacillus rhamnosus*. Análises relacionadas à resistência a condições de simulação do trato gastrointestinal, suscetibilidade a antibióticos, atividade antagônica, atividade antioxidante, produção da enzima β -galactosidase e atributos de adesão, das 28 cepas de levedura e 3 de bactérias, evidenciaram diferenças entre as linhagens isoladas, apresentando características compatíveis com os dados de elegibilidade de estirpes probióticas. Os testes *in vitro* foram capazes de comprovar as linhagens como potenciais candidatas a aplicações probióticas *in vivo*, como é o caso do *L. rhamnosus* Lb16. Uma seleção mais rigorosa deve ser realizada com as leveduras, uma vez que todas demonstraram potencial probiótico.

A digestão *in vitro* do leite de ovelha fermentado por grãos de kefir apresentou-se como um método interessante de liberação de peptídeos bioativos, pois os mesmos apresentam múltiplas atividades biológicas tais como antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensiva e anti-hemolítica. Estimulamos estudos futuros sobre o sequenciamento e a síntese desses peptídeos para avaliação *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, H. Probiotic-Based Protection of Normal Tissues during Radiotherapy. **Nutrition**, v. 30, n. 4, p. 495–496, 2014.
- AGUILAR-TOALÁ, J. E.; SANTIAGO-LÓPEZ, L.; PERES, C. M.; PERES, C.; GARCIA, H. S.; VALLEJO-CORDOBA, B.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A. Assessment of Multifunctional Activity of Bioactive Peptides Derived from Fermented Milk by Specific *Lactobacillus Plantarum* Strains. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 65–75, 2017.
- AHMED, Z.; WANG, Y.; AHMAD, A.; KHAN, S. T.; NISA, M.; AHMAD, H.; AFREEN, A. Kefir and Health: A Contemporary Perspective. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 5, p. 422–34, 2013.
- AKOGLU, B.; LOYTVED, A.; NUIDING, H.; ZEUZEM, S.; FAUST, D. Probiotic *Lactobacillus Casei* Shirota Improves Kidney Function, Inflammation and Bowel Movements in Hospitalized Patients with Acute Gastroenteritis – A Prospective Study. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 305–313, 2015.
- ALEXANDRA, J.; TAFFAREL, S.; BRANDELLI, A. Parâmetros Microbiológicos E Físico-Químicos Durante a Produção E Maturação Do Queijo Fascal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 323–328, 2009.
- ALEXANDRE, Y.; LE BLAY, G.; BOISRAMÉ-GASTRIN, S.; LE GALL, F.; HÉRY-ARNAUD, G.; GOURIOU, S.; VALLET, S.; LE BERRE, R. Probiotics: A New Way to Fight Bacterial Pulmonary Infections? **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 1, p. 9–17, 2014.
- ALLEN, S. J. The Potential of Probiotics to Prevent *Clostridium difficile* Infection. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 135–144, 2015.
- AMARETTI, A.; DI NUNZIO, M.; POMPEI, A.; RAIMONDI, S.; ROSSI, M.; BORDONI, A. Antioxidant Properties of Potentially Probiotic Bacteria: *In vitro* and *in vivo* Activities. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 809–17, 2013.
- ANANIA, C.; CELANI, C.; CHIESA, C.; PACIFICO, L. Probiotics Usage in Childhood *Helicobacter pylori* Infection. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Italy: Elsevier Inc., 2016. p. 669–681.
- AO, J.; LI, B. Stability and Antioxidative Activities of Casein Peptide Fractions during

- Simulated Gastrointestinal Digestion *in vitro*: Charge Properties of Peptides Affect Digestive Stability. **Food Research International**, v. 52, p. 334–341, 2013.
- ARCHER, A. C.; HALAMI, P. M. Probiotic Attributes of *Lactobacillus fermentum* Isolated from Human Feces and Dairy Products. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 19, p. 8113–8123, 2015.
- ARORA, T.; SINGH, S.; SHARMA, R. K. Probiotics: Interaction with Gut Microbiome and Antiobesity Potential. **Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 591–596, 2013.
- ARRUTIA, F.; RUBIO, R.; RIERA, F. A. Production and Membrane Fractionation of Bioactive Peptides from a Whey Protein Concentrate. **Journal of Food Engineering**, v. 184, p. 1–9, 2016.
- ARYANA, K. J.; OLSON, D. W. A 100-Year Review: Yogurt and Other Cultured Dairy Products. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9987–10013, 2017.
- AYDAŞ, S. B.; ASLIM, B. The Cholesterol-Lowering Effects of Probiotic Bacteria on Lipid Metabolism. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Turkey: Elsevier Inc., 2016. p. 699–722.
- BASILICATA, M. G.; PEPE, G.; SOMMELLA, E.; OSTACOLO, C.; MANFRA, M.; SOSTO, G.; PAGANO, G.; NOVELLINO, E.; CAMPIGLIA, P. Peptidome Profiles and Bioactivity Elucidation of Buffalo-Milk Dairy Products after Gastrointestinal Digestion. **Food Research International**, v. 105, p. 1003–1010, 2018.
- BEENA DIVYA, J.; KULANGARA VARSHA, K.; MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.; ISMAIL, B.; PANDEY, A. Probiotic Fermented Foods for Health Benefits. **Engineering in Life Sciences**, v. 12, n. 4, p. 377–390, 2012.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The Interaction between Bacteria and Bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 4, p. 625–651, 2005.
- BEKAR, O.; YILMAZ, Y.; GULTEN, M. Kefir Improves the Efficacy and Tolerability of Triple Therapy in Eradicating *Helicobacter pylori*. **Journal of medicinal food**, v. 14, n. 4, p. 344–347, 2011.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A. Probiotic Mechanisms of Action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, n. 2, p. 160–174, 2012.
- BOLLA, P. A.; CARASI, P.; BOLLA, M. D. L. A.; DE ANTONI, G. L.; SERRADELL, M. D. L. A. Protective Effect of a Mixture of Kefir-Isolated Lactic Acid Bacteria and Yeasts in a Hamster Model of *Clostridium difficile* Infection. **Anaerobe**, v. 21, p. 28–33, 2013.

- BOLLA, P. A.; SERRADELL, M. D. L. A.; DE URRAZA, P. J.; DE ANTONI, G. L. Effect of Freeze-Drying on Viability and *in vitro* Probiotic Properties of a Mixture of Lactic Acid Bacteria and Yeasts Isolated from Kefir. **The Journal of dairy research**, v. 78, n. 1, p. 15–22, 2011.
- BONGAERTS, G. P. A.; SEVERIJNEN, R. S. V. M. A Reassessment of the PROPATRIA Study and Its Implications for Probiotic Therapy. **Nature biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 55–63, 2016.
- BOTTA, C.; LANGERHOLC, T.; CENCIC, A.; COCOLIN, L. *In vitro* Selection and Characterization of New Probiotic Candidates from Table Olive Microbiota. **PLoS ONE**, 9, n. 4, p. e94457, 2014.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F. Whey as a Source of Peptides with Remarkable Biological Activities. **Food Research International**, v. 73, p. 149–161, 2015.
- BRASIL. **Bases para o plano nacional de desenvolvimento da rota do cordeiro / ministério da integração nacional, secretaria de desenvolvimento regional**. Brasília: Ministério da Integração Nacional, 2017.
- CAILLARD, R.; LAPOINTE, N. *In vitro* Gastric Survival of Commercially Available Probiotic Strains and Oral Dosage Forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 519, n. 1–2, p. 125–127, 2017.
- CAMPBELL-PLATT, G. FERMENTED FOODS | Origins and Applications. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2º ed. United Kingdom: Elsevier, 2014., p. 834–838.
- CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R.; LAGANÃ, A. Recent Trends in the Analysis of Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 11, p. 2677–2685, 2016.
- CARASI, P.; TREJO, F. M.; PÉREZ, P. F.; DE ANTONI, G. L.; SERRADELL, M. D. L. A. Surface Proteins from *Lactobacillus kefir* Antagonize *in vitro* Cytotoxic Effect of *Clostridium difficile* Toxins. **Anaerobe**, v. 18, n. 1, p. 135–42, 2012.
- CASTILLO, N. A.; DE MORENO DE LEBLANC, A.; GALDEANO, C. M.; PERDIGÓN, G. Probiotics: An Alternative Strategy for Combating Salmonellosis. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 831–841, 2012.
- CHAVES-LÓPEZ, C.; SERIO, A.; PAPARELLA, A.; MARTUSCELLI, M.; CORSETTI,

- A.; TOFALO, R.; SUZZI, G. Impact of Microbial Cultures on Proteolysis and Release of Bioactive Peptides in Fermented Milk. **Food Microbiology**, v. 42, p. 117–121, 2014.
- CHEN, L.-S.; MA, Y.; MAUBOIS, J.-L.; HE, S.-H.; CHEN, L.-J.; LI, H.-M. Screening for the Potential Probiotic Yeast Strains from Raw Milk to Assimilate Cholesterol. **Dairy Science & Technology**, v. 90, n. 5, p. 537–548, 2010.
- CHEN, P.; ZHANG, Q.; DANG, H.; LIU, X.; TIAN, F.; ZHAO, J.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; CHEN, W. Screening for Potential New Probiotic Based on Probiotic Properties and α -Glucosidase Inhibitory Activity. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 65–72, 2014.
- CHIFIRIUC, M. C.; CIOACA, A. B.; LAZAR, V. *In vitro* Assay of the Antimicrobial Activity of Kephir against Bacterial and Fungal Strains. **Anaerobe**, v. 17, n. 6, p. 433–5, 2011.
- CHOBERT, J.-M.; KHALED EL-ZAHAR; SITOHY, M.; DALGALAARRONDO, M.; MÉTRO, F.; CHOISSET, Y.; HAERTLÉ, T. Angiotensin I-Converting-Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity of Tryptic Peptides of Ovine β -Lactoglobulin and of Milk Yoghurts Obtained by Using Different Starters. **Lait**, v. 19, p. 141–152, 2005.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests ; approved atandard. In: **Clinical and Laboratory Standars Institute**, 9 ed. CLSI: Pennsylvania USA, 2012, p. 11–36.
- CODEX ALIMENTARIUS. Fermented milks (CODEX STAN 243-2003). In: **Milk and Milk Products Milk and Milk Products**. 2° ed. Rome, Italy: FAO, 2011. p. 6–9.
- COGULU, D.; TOPALOGLU-AK, A.; CAGLAR, E.; SANDALLI, N.; KARAGOZLU, C.; ERSIN, N.; YERLIKAYA, O. Potential Effects of a Multistrain Probiotic-Kefir on Salivary *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* Spp. **Journal of Dental Sciences**, v. 5, n. 3, p. 144–149, 2010.
- COLOMBO, J.; ARENA, A. Probiotics in Invasive Candidiasis. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Italy: Elsevier Inc., 2016. p. 641.
- CONTRERAS, M. M.; CARRÓN, R.; MONTERO, M. J.; RAMOS, M.; RECIO, I. Novel Casein-Derived Peptides with Antihypertensive Activity. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 10, p. 566–573, 2009.
- CONTRERAS, M. M.; SANCHEZ, D.; SEVILLA, M. Á.; RECIO, I.; AMIGO, L. Resistance of Casein-Derived Bioactive Peptides to Simulated Gastrointestinal Digestion. **International Dairy Journal**, v. 32, n. 2, p. 71–78, 2013.
- CORRÊA, A. P. F.; DAROIT, D. J.; FONTOURA, R.; MEIRA, S. M. M.; SEGALIN, J.;

- BRANDELLI, A. Hydrolysates of Sheep Cheese Whey as a Source of Bioactive Peptides with Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activities. **Peptides**, v. 61, p. 48–55, 2014.
- COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. **Food Technology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 429–453, 2003.
- CUMBY, N.; ZHONG, Y.; NACZK, M.; SHAHIDI, F. Antioxidant Activity and Water-Holding Capacity of Canola Protein Hydrolysates. **Food Chemistry**, v. 109, n. 1, p. 144–148, 2008.
- CURRY, B. Y. A. The Milk Revolution. **Nature**, v. 500, p. 20–22, 2013.
- CUSHMAN, D. W.; CHEUNG, H. S. Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. **Biochemical Pharmacology**, v. 20, n. 7, p. 1637–1648, 1971.
- DALIRI, E. B.-M.; LEE, B. H. New Perspectives on Probiotics in Health and Disease. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 2, p. 56–65, 2015.
- DALLAS, D. C.; CITERNE, F.; TIAN, T.; SILVA, V. L. M.; KALANETRA, K. M.; FRESE, S. A.; ROBINSON, R. C.; MILLS, D. A.; BARILE, D. Peptidomic Analysis Reveals Proteolytic Activity of Kefir Microorganisms on Bovine Milk Proteins. **Food Chemistry**, v. 197, p. 273–284, 2016.
- DALMEIJER, G. W.; STRUIJK, E. A.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; SOEDAMAH-MUTHU, S. S.; VERSCHUREN, W. M. M.; BOER, J. M. A.; GELEIJNSE, J. M.; BEULENS, J. W. J. Dairy Intake and Coronary Heart Disease or Stroke--a Population-Based Cohort Study. **International journal of cardiology**, v. 167, n. 3, p. 925–9, 2013.
- DAVARI, S.; TALAEI, S. a.; ALAEI, H.; SALAMI, M. Probiotics Treatment Improves Diabetes-Induced Impairment of Synaptic Activity and Cognitive Function: Behavioral and Electrophysiological Proofs for Microbiome-Gut-Brain Axis. **Neuroscience**, v. 240, p. 287–296, 2013.
- DE ALMEIDA JÚNIOR, W. L. G.; FERRARI, Í. D. S.; DE SOUZA, J. V.; DA SILVA, C. D. A.; DA COSTA, M. M.; DIAS, F. S. Characterization and Evaluation of Lactic Acid Bacteria Isolated from Goat Milk. **Food Control**, v. 53, p. 96–103, 2015.
- DE ARAUJO, G. V.; DE OLIVEIRA JUNIOR, M. H.; PEIXOTO, D. M.; SARINHO, E. S. C. Probiotics for the Treatment of Upper and Lower Respiratory-Tract Infections in Children: Systematic Review Based on Randomized Clinical Trials. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 5, p. 413–427, 2015.

- DE AZEVEDO, J. F.; HERMES-ULIANA, C.; LIMA, D. P.; SANT'ANA, D. M. G.; ALVES, G.; ARAÚJO, E. J. A. Probiotics Protect the Intestinal Wall of Morphological Changes Caused by Malnutrition. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 86, n. 3, p. 1303–1314, 2014.
- DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Biologically Active Peptides: Processes for Their Generation, Purification and Identification and Applications as Natural Additives in the Food and Pharmaceutical Industries. **Food Research International**, v. 74, p. 185–198, 2015.
- DE MORENO, L., A.; MATAR, C.; FARNWORTH, E.; PERDIGON, G. Study of Cytokines Involved in the Prevention of a Murine Experimental Breast Cancer by Kefir. **Cytokine**, v. 34, n. 1–2, p. 1–8, 2006.
- DE VRESE, M.; STEGELMANN, a; RICHTER, B.; FENSELAU, S.; LAUE, C.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics-Compensation for Lactase Insufficiency. **The American journal of clinical nutrition**, v. 73, p. 421S–429S, 2001.
- DUNNE, J.; EVERSLED, R. P.; SALQUE, M.; CRAMP, L.; BRUNI, S.; RYAN, K.; BIAGETTI, S.; DI LERNIA, S. First Dairying in Green Saharan Africa in the Fifth Millennium BC. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 390–394, 2012.
- DUPONT, D.; MANDALARI, G.; MOLLÉ, D.; JARDIN, J.; ROLET-RÉPÉCAUD, O.; DUBOZ, G.; LÉONIL, J.; MILLS, C. E. N.; MACKIE, A. R. Food Processing Increases Casein Resistance to Simulated Infant Digestion. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, n. 11, p. 1677–1689, 2010.
- EBNER, J.; AŞÇI ARSLAN, A.; FEDOROVA, M.; HOFFMANN, R.; KÜÇÜKÇETİN, A.; PISCHETSRIEDER, M. Peptide Profiling of Bovine Kefir Reveals 236 Unique Peptides Released from Caseins during Its Production by Starter Culture or Kefir Grains. **Journal of Proteomics**, v. 117, p. 41–57, 2015..
- ELKHIHAL, B.; ELHALIMI, M.; GHFIR, B.; MOSTACHI, A.; LYAGOUBI, M.; AOUI, S. Infection Urinaire À *Saccharomyces cerevisiae*: Levure Émergente? **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 4, p. 303–305, 2015.
- ELLI, M.; CALLEGARI, M. L.; FERRARI, S.; BESSI, E.; CATTIVELLI, D.; SOLDI, S.; MORELLI, L.; FEUILLERAT, N. G.; ANTOINE, J. M. Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5113–5117, 2006.
- ELLIS, M. L.; SHAW, K. J.; JACKSON, S. B.; DANIEL, S. L.; KNIGHT, J. Analysis of Commercial Kidney Stone Probiotic Supplements. **Urology**, v. 85, n. 3, p. 517–521, 2016.
- ESMAEILPOUR, M.; EHSANI, M. R.; AMINLARI, M.; SHEKARFOROUSH, S.;

HOSEINI, E. Antimicrobial Activity of Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysis of Goat Milk Caseins. **Comparative Clinical Pathology**, v. 25, n. 3, p. 599–605, 2016.

ESPEJO-CARPIO, F. J.; GARCÍA-MORENO, P. J.; PÉREZ-GÁLVEZ, R.; MORALES-MEDINA, R.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Effect of Digestive Enzymes on the Bioactive Properties of Goat Milk Protein Hydrolysates. **International Dairy Journal**, v. 54, p. 21–28, 2016.

FAHMY, H. A.; ISMAIL, A. F. M. Gastroprotective Effect of Kefir on Ulcer Induced in Irradiated Rats. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 144, p. 85–93, 2015.

FAO. **Milk and dairy products in human nutrition**. 1^a ed. Rome, Italy: FAO, 2013.

FARNWORTH, E. R. Kefir – A Complex Probiotic. **Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 1–17, 2003.

FEDORAK, R. N.; FEAGAN, B. G.; HOTTE, N.; LEDDIN, D.; DIELEMAN, L. a.; PETRUNIA, D. M.; ENNS, R.; BITTON, A.; CHIBA, N.; PARÉ, P.; ROSTOM, A.; MARSHALL, J.; DEPEW, W.; BERNSTEIN, C. N.; PANACCIONE, R.; AUMAIS, G.; STEINHART, A. H.; COCKERAM, A.; BAILEY, R. J.; GIONCHETTI, P.; WONG, C.; MADSEN, K. The Probiotic vsl3 Has Anti-Inflammatory Effects and Could Reduce Endoscopic Recurrence after Surgery for Crohn's Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 5, p. 928–935, 2015.

FELESZKO, W.; JAWORSKA, J. Prebiotics and Probiotics for the Prevention or Treatment of Allergic Asthma. In: **Bioactive Foods in Promoting Health**. 1^o ed. Poland: Elsevier Inc., 2010. p. 159–169.

FERNÁNDEZ-TOMÉ, S.; MARTÍNEZ-MAQUEDA, D.; TABERNERO, M.; LARGO, C.; RECIO, I.; MIRALLES, B. Effect of the Long-Term Intake of a Casein Hydrolysate on Mucin Secretion and Gene Expression in the Rat Intestine. **Journal of Functional Foods**, v. 33, p. 176–180, 2017.

FONTANA, L.; BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DIAZ, J.; MUNOZ-QUEZADA, S.; GIL, A. Sources, Isolation, Characterisation and Evaluation of Probiotics. **British Journal of Nutrition**, v. 109 Suppl, p. S35-50, 2013.

FRANCO, M. C.; GOLOWCZYK, M. A.; DE ANTONI, G. L.; PÉREZ, P. F.; HUMEN, M.; SERRADELL, M. de los A. Administration of Kefir-Fermented Milk Protects Mice against

Giardia intestinalis Infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 1815–1822, 2013.

FRIQUES, A. G. F.; ARPINI, C. M.; KALIL, I. C.; GAVA, A. L.; LEAL, M. a; PORTO, M. L.; NOGUEIRA, B. V; DIAS, A. T.; ANDRADE, T. U.; PEREIRA, T. M. C.; MEYRELLES, S. S.; CAMPAGNARO, B. P.; VASQUEZ, E. C. Chronic Administration of the Probiotic Kefir Improves the Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 390, 2015.

FROST, B. L.; CAPLAN, M. S. Necrotizing Enterocolitis: Pathophysiology, Platelet-Activating Factor, and Probiotics. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 22, n. 2, p. 88–93, 2013.

FUCHS-TARLOVSKY, V.; MARQUEZ-BARBA, M. F.; SRIRAM, K. Probiotics in Dermatologic Practice. **Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 289–295, 2016.

GAO, J.; GU, F.; RUAN, H.; CHEN, Q.; HE, J.; HE, G. Induction of Apoptosis of Gastric Cancer Cells SGC7901 *in vitro* by a Cell-Free Fraction of Tibetan Kefir. **International Dairy Journal**, v. 30, n. 1, p. 14–18, 2013.

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the Role of Gut Microbiota in Intestinal Health and Disease. **Nature Reviews: Gastroenterology & Hepatology**, v. 7, n. 9, p. 503–514, 2010.

GHRIBI, A. M.; SILA, A.; PRZYBYLSKI, R.; NEDJAR-ARROUME, N.; MAKHLOUF, I.; BLECKER, C.; ATTIA, H.; DHULSTER, P.; BOUGATEF, A.; BESBES, S. Purification and Identification of Novel Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysate of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Concentrate. **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 516–525, 2015.

GIL-RODRÍGUEZ, A. M.; CARRASCOSA, A. V.; REQUENA, T. Yeasts in Foods and Beverages: *In vitro* Characterisation of Probiotic Traits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1156–1162, 2015.

GLIBOWSKI, P.; KOWALSKA, A. Rheological, Texture and Sensory Properties of Kefir with High Performance and Native Inulin. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 2, p. 299–304, 2012.

GOLDBOHM, R. A.; CHORUS, A. M. J.; GALINDO GARRE, F.; SCHOUTEN, L. J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Dairy Consumption and 10-Y Total and Cardiovascular Mortality: A Prospective Cohort Study in the Netherlands. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 93, n. 3, p. 615, 2011.

GOLOWCZYC, M. A.; MOBILI, P.; GARROTE, G. L.; DE LOS ANGELES SERRADELL,

- M.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Interaction between *Lactobacillus kefir* and *Saccharomyces lipolytica* Isolated from Kefir Grains: Evidence for Lectin-like Activity of Bacterial Surface Proteins. **The Journal of dairy research**, v. 76, n. 1, p. 111–6, 2009.
- GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G. L.; ABRAHAM, A. G. Cellular Injuries of Spray-Dried *Lactobacillus* Spp. Isolated from Kefir and Their Impact on Probiotic Properties. **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 3, p. 556–60, 2011.
- GOULDSWORTHY, A. M.; LEAVER, J.; BANKS, J. M. Application of a Mass Spectrometry Sequencing Technique for Identifying Peptides Present in Cheddar Cheese. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 8–9, p. 781–790, 1996.
- GREENE, J. D.; KLAENHAMMER, T. R. Factors Involved in Adherence of Lactobacilli to Human Caco-2 Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 12, p. 4487–4494, 1994.
- GRZEŚKOWIAK, Ł.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; GUEIMONDE, M. Manufacturing Process Influences Properties of Probiotic Bacteria. **The British journal of nutrition**, v. 105, n. 6, p. 887–94, 2011.
- GUERIN, J.; PETIT, J.; BURGAIN, J.; BORGES, F.; BHANDARI, B.; PERROUD, C.; DESOBRY, S.; SCHER, J.; GAIANI, C. Lactobacillus Rhamnosus GG Encapsulation by Spray-Drying: Milk Proteins Clotting Control to Produce Innovative Matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 193, p. 10–19, 2017.
- GUZEL-SEYDIM, Z.; KOK-TAS, T.; ERTEKIN-FILIZ, B.; SEYDIM, a C. Effect of Different Growth Conditions on Biomass Increase in Kefir Grains. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 3, p. 1239–42, 2011.
- HA, M.; SABHERWAL, M.; DUNCAN, E.; STEVENS, S.; STOCKWELL, P.; MCCONNELL, M.; EL-DIN BEKHIT, A.; CARNE, A. In-Depth Characterization of Sheep (*Ovis aries*) Milk Whey Proteome and Comparison with Cow (*Bos taurus*). **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139774, 2015.
- HAFEEZ, Z.; CAKIR-KIEFER, C.; ROUX, E.; PERRIN, C.; MICLO, L.; DARY-MOUROT, A. Strategies of Producing Bioactive Peptides from Milk Proteins to Functionalize Fermented Milk Products. **Food Research International**, v. 63, p. 71–80, 2014.
- HAMAD, A.; FRAGKOS, K. C.; FORBES, A. A Systematic Review and Meta-Analysis of Probiotics for the Management of Radiation Induced Bowel Disease. **Clinical Nutrition**, v. 32, n. 3, p. 353–360, 2013.

- HANNING, I.; LINGBECK, J.; RICKE, S. C. Cardiovascular Health and Disease Prevention: Association with Foodborne Pathogens and Potential Benefits of Probiotics. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1^o ed. USA: Elsevier Inc., 2016. p. 793–806.
- HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-Derived Peptides with Biological Activity: From Research to Food Applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.
- HARZALLAH, D.; BELHADJ, H. Lactic Acid Bacteria as Probiotics: Characteristics , Selection Criteria and Role in Immunomodulation of Human GI Muccosal Barrier. In: **Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes health**. INTECH, 2013, p. 197–216.
- HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. 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, p. 506–514, 2014.
- HONDA, K.; LITTMAN, D. R. The Microbiota in Adaptive Immune Homeostasis and Disease. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 75–84, 2016.
- HONG, W.-S.; CHEN, Y.-P.; CHEN, M.-J. The Antiallergic Effect of Kefir Lactobacilli. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. H244-H253, 2010.
- ISMAIEL, A. A.; GHALY, M. F.; EL-NAGGAR, A. K. Milk Kefir: Ultrastructure, Antimicrobial Activity and Efficacy on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*. **Current microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1602–9, 2011.
- JAMALY, N.; BENJOUAD, A.; BOUKSAIM, M. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Known Popular Traditional Moroccan Dairy Products. **British Microbiology Research Journal**, v. 1, n. 4, p. 79–94, 2011.
- JENA, P. K.; TRIVEDI, D.; THAKORE, K.; CHAUDHARY, H.; GIRI, S. S.; SESHADRI, S. Isolation and Characterization of Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Rat Fecal Microbiota. **Microbiology and Immunology**, v. 57, n. 6, p. 407–416, 2013.
- JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. *In vitro* Testing of Commercial and Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 1–2, p. 216–222, 2012.
- JIN, Y.; YU, Y.; QI, Y.; WANG, F.; YAN, J.; ZOU, H. Peptide Profiling and the Bioactivity Character of Yogurt in the Simulated Gastrointestinal Digestion. **Journal of Proteomics**, v.

141, p. 24–46, 2016.

JOHN, S. M.; DEESEENTHUM, S. Properties and Benefits of Kefir -A Review.

Songklanakarin Journal of Science and Technology, v. 37, n. 3, p. 275–282, 2015.

JONES, N. Friendly Bacteria Cheer up Anxious Mice. **Nature**, p. 1–3, 2011.

KAKISU, E.; BOLLA, P.; ABRAHAM, A. G.; DE URRAZA, P.; DE ANTONI, G. L.

Lactobacillus plantarum Isolated from Kefir: Protection of Cultured Hep-2 Cells against *Shigella* Invasion. **International Dairy Journal**, v. 33, n. 1, p. 22–26, 2013.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A.

Dairy and Non-Dairy Probiotic Beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 58–63, 2016.

KAROU, S. D.; TCHACONDO, T.; OUATTARA, L.; ANANI, K.; SAVADOGO, A.;

AGBONON, A.; ATTAIA, M. Ben; DE SOUZA, C.; SAKLY, M.; SIMPORE, J.

Antimicrobial, Antiplasmodial, Haemolytic and Antioxidant Activities of Crude Extracts from Three Selected Togolese Medicinal Plants. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 10, p. 808–813, 2011.

KAUSHIK, J. K.; KUMAR, A.; DUARY, R. K.; MOHANTY, A. K.; GROVER, S.;

BATISH, V. K. Functional and Probiotic Attributes of an Indigenous Isolate of *Lactobacillus plantarum*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 12, p. e8099, 2009.

KEMGANG, T. S.; KAPILA, S.; SHANMUGAM, V. P.; REDDI, S.; KAPILA, R.

Fermented Milk with Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) Protects Mice from *Salmonella* by Enhancing Immune and Nonimmune Protection Mechanisms at Intestinal Mucosal Level. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 30, p. 62–73, 2016.

KOPF-BOLANZ, K. A.; SCHWANDER, F.; GIJS, M.; VERGE, G.; PORTMANN, R.;

EGGER, L. Validation of an *In vitro* Digestive System for Studying Macronutrient

Decomposition in Humans. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 5, p. 245–250, 2012.

KOPF-BOLANZ, K. A.; SCHWANDER, F.; GIJS, M.; VERGÈRES, G.; PORTMANN, R.;

EGGER, L. Impact of Milk Processing on the Generation of Peptides during Digestion.

International Dairy Journal, v. 35, n. 2, p. 130–138, 2014.

KOS, B.; ŠUŠKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S.; ŠIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOŠIĆ, S.

Adhesion and Aggregation Ability of Probiotic Strain *Lactobacillus acidophilus* M92.

Journal of Applied Microbiology, v. 94, n. 6, p. 981–987, 2003.

KOTZAMANIDIS, C.; KOURELIS, A.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS,

N.; YIANGOU, M. Evaluation of Adhesion Capacity, Cell Surface Traits and

- Immunomodulatory Activity of Presumptive Probiotic *Lactobacillus* Strains. **International journal of food microbiology**, v. 140, n. 2–3, p. 154–63, 2010.
- KOVATCHEVA-DATCHARY, P.; ARORA, T. Nutrition, the Gut Microbiome and the Metabolic Syndrome. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 27, n. 1, p. 59–72, 2013.
- KUMAR, A.; KUMAR, D. Characterization of *Lactobacillus* Isolated from Dairy Samples for Probiotic Properties. **Anaerobe**, v. 33, p. 117–123, 2015.
- KUMAR, M.; NAGPAL, R.; HEMALATHA, R.; YADAV, H.; MAROTTA, F. Probiotics and Prebiotics for Promoting Health. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Italy: Elsevier Inc., 2016. p. 75–85.
- LACROIX, I. M. E.; LI-CHAN, E. C. Y. Isolation and Characterization of Peptides with Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activity from Pepsin-Treated Bovine Whey Proteins. **Peptides**, v. 54, p. 39–48, 2014.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.
- LEBLANC, J. G.; DE LEBLANC, A. D. M. Probiotics in Inflammatory Bowel Diseases and Cancer Prevention. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion**. 1° ed. Argentina: Elsevier Inc., 2015. p. 755–771.
- LEE, J.; YUN, H. S.; CHO, K. W.; OH, S.; KIM, S. H.; CHUN, T.; KIM, B.; WHANG, K. Y. Evaluation of Probiotic Characteristics of Newly Isolated *Lactobacillus* Spp.: Immune Modulation and Longevity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 80–86, 2011.
- LEITE, A. M. O.; MIGUEL, M. A. L.; PEIXOTO, R. S.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V. M. F.; MAYO, B.; DELGADO, S. Probiotic Potential of Selected Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Brazilian Kefir Grains. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 6, p. 3622–32, 2015.
- LIKOTRAFITI, E.; TUOHY, K. M.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. An *In vitro* Study of the Effect of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics on the Elderly Faecal Microbiota. **Anaerobe**, v. 27, p. 50–55, 2014.
- LIKOTRAFITI, E.; VALAVANI, P.; ARGIRIOU, A.; RHOADES, J. *In vitro* Evaluation of Potential Antimicrobial Synbiotics Using *Lactobacillus kefir* Isolated from Kefir Grains. **International Dairy Journal**, v. 45, p. 23–30, 2015.

- LIMA, M. S. F.; SOUZA, K. M. S.; ALBUQUERQUE, W. W. C.; TEIXEIRA, J. A. C.; CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, A. L. F. *Saccharomyces Cerevisiae* from Brazilian Kefir-Fermented Milk: An *in vitro* Evaluation of Probiotic Properties. **Microbial pathogenesis**, v. 110, p. 670-677, 2017a.
- LIMA, M. S. F.; DA SILVA, R. A.; DA SILVA, M. F.; DA SILVA, P. A. B.; COSTA, R. M. P. B.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F.; CAVALCANTI, M. T. H. Brazilian Kefir-Fermented Sheep's Milk, a Source of Antimicrobial and Antioxidant Peptides. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, p. 1–10, 2017b.
- LIN, M. Y.; CHANG, F. J. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 45, n. 8, p. 1617–1622, 2000.
- LIN, Y. C.; CHEN, Y. T.; HSIEH, H. H.; CHEN, M. J. 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, n. 50, p. 580–589, 2016.
- LIU, J.-R.; CHEN, M.-J.; LIN, C.-W. Antimutagenic and Antioxidant Properties of Milk – Kefir and Soymilk – Kefir. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2467–2474, 2005.
- LIU, J.-R.; WANG, S.-Y.; CHEN, M.-J.; CHEN, H.-L.; YUEH, P.-Y.; LIN, C.-W. Hypocholesterolaemic Effects of Milk-Kefir and Soymilk-Kefir in Cholesterol-Fed Hamsters. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 5, p. 939–946, 2006.
- LIU, Z.; LIU, W.; RAN, C.; HU, J.; ZHOU, Z. Abrupt Suspension of Probiotics Administration May Increase Host Pathogen Susceptibility by Inducing Gut Dysbiosis. **Nature Scientific reports**, v. 6, n. 12, p. 23214, 2016.
- LOPITZ-OTSOA, F.; REMENTERIA, A.; ELGUEZABAL, N.; GARAIZAR, J. Kefir: Una Comunidad Simbiótica de Bacterias Y Levaduras Con Propiedades Saludables. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n. 2, p. 67–74, 2006.
- LOURENÇO, R.; CAMILO, M. E. Taurine: A Conditionally Essential Amino Acid in Humans? An Overview in Health and Disease. **Nutricion Hospitalaria**, v. 17, n. 6, p. 262–270, 2002.
- LU, M.; WANG, X.; SUN, G.; QIN, B.; XIAO, J.; YAN, S.; PAN, Y.; WANG, Y. Fine Structure of Tibetan Kefir Grains and Their Yeast Distribution, Diversity, and Shift. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e101387, 2014.
- LULE, V. K.; GARG, S.; TOMAR, S. K.; KHEDKAR, C. D.; NALAGE, D. N. Food

- Intolerance: Lactose Intolerance. In: **Encyclopedia of Food and Health**. 1. ed. India: Elsevier Ltd., 2016. p. 43–48.
- MACH, N.; FUSTER-BOTELLA, D. Endurance Exercise and Gut Microbiota: A Review. **Journal of Sport and Health Science**, p. 1–19, 2016.
- MACHAIRAS, N.; PISTIKI, A.; DROGGITI, D.; GEORGITSI, M.; PELEKANOS, N.; DAMORAKI, G.; KOURAKLIS, G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E. J. Pre-Treatment with Probiotics Prolongs Survival after Experimental Infection by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Rodents: An Effect on Sepsis-Induced Immunosuppression. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 376–384, 2015.
- MACORI, G.; COTTER, P. D. Novel Insights into the Microbiology of Fermented Dairy Foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 49, p. 172–178, 2018.
- MAKINEN, K.; BERGER, B.; BEL-RHLID, R.; ANANTA, E. Science and Technology for the Mastership of Probiotic Applications in Food Products. **Journal of biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 356–365, 2012.
- MARINO, M.; INNOCENTE, N.; CALLIGARIS, S.; MAIFRENI, M.; MARANGONE, A.; NICOLI, M. C. Viability of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in Structured Emulsions Containing Saturated Monoglycerides. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 51–59, 2017.
- MARSH, A. J.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Fermented Beverages with Health-Promoting Potential: Past and Future Perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 38, n. 2, p. 113–124, 2014.
- MARSH, A. J.; O’SULLIVAN, O.; HILL, C.; ROSS, R. P.; COTTER, P. D. Sequencing-Based Analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from Multiple Sources. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69371, 2013.
- MATEJČEKOVÁ, Z.; LIPTÁKOVÁ, D.; VALÍK, L. Functional Probiotic Products Based on Fermented Buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 35–41, 2017.
- MAYNARD, C. L.; ELSON, C. O.; HATTON, R. D.; WEAVER, C. T. Reciprocal Interactions of the Intestinal Microbiota and Immune System. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 231–41, 2012.
- MÄYRÄ-MÄUKINEN, A.; MNNINEN, M.; GYLLENBERG, H. The Adherence of Lactic Acid Bacteria to the Columnar Epithelial Cells of Pigs and Calves. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 2, p. 241–245, 1983.
- MEDINA, R. B.; OLISZEWSKI, R.; ABEIJÓN MUKDSI, M. C.; VAN NIEUWENHOVE,

- C. P.; GONZÁLEZ, S. N. Sheep and Goat's Dairy Products from South America: Microbiota and Its Metabolic Activity. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1–3, p. 84–91, 2011.
- MEIRA, S. M. M.; DAROIT, D. J.; HELFER, V. E.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; CARRO, S.; BRANDELLI, A. Bioactive Peptides in Water-Soluble Extracts of Ovine Cheeses from Southern Brazil and Uruguay. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 322–329, 2012a.
- MEIRA, S. M. M.; HELFER, V. E.; VELHO, R. V.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Probiotic Potential of *Lactobacillus* Spp. Isolated from Brazilian Regional Ovine Cheese. **The Journal of dairy research**, v. 79, n. 1, p. 119–27, 2012b.
- MICHAELIDOU, a. M. Factors Influencing Nutritional and Health Profile of Milk and Milk Products. **Small Ruminant Research**, v. 79, n. 1, p. 42–50, 2008.
- MISHRA, V.; SHAH, C.; MOKASHE, N.; CHAVAN, R.; YADAV, H.; PRAJAPATI, J. Probiotics as Potential Antioxidants: A Systematic Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 14, p. 3615–3626, 2015.
- MIYAZAKI, H.; NAKAMURA, T.; OHKI, K.; NAGAI, K. Effects of the Bioactive Peptides Ile-Pro-Pro and Val-Pro-Pro upon Autonomic Neurotransmission and Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. **Autonomic Neuroscience**, v. 208, p. 88–92, 2017.
- MOHAMMADMORADI, S.; JAVIDAN, A.; KORDI, J. Boom of Probiotics: This Time Non-Alcoholic Fatty Liver Disease - A Mini Review. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 30–35, 2014.
- MOHANTY, D. P.; MOHAPATRA, S.; MISRA, S.; SAHU, P. S. Milk Derived Bioactive Peptides and Their Impact on Human Health – A Review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 2016.
- MØLLER, K. K.; RATTRAY, F. P.; ARDÖ, Y. Application of Selected Lactic Acid Bacteria and Coagulant for Improving the Quality of Low-Salt Cheddar Cheese: Chemical, Microbiological and Rheological Evaluation. **International Dairy Journal**, v. 33, n. 2, p. 163–174, 2013.
- MONTANARI, G.; ZAMBONELLI, C.; GRAZIA, L. Release of β -Galactosidase from Lactobacilli. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 129–133, 2000.
- MORENO-MONTORO, M.; OLALLA-HERRERA, M.; RUFIÁN-HENARES, J. Á.; MARTÍNEZ, R. G.; MIRALLES, B.; BERGILLOS, T.; NAVARRO-ALARCÓN, M.; JAUREGI, P. Antioxidant, ACE-Inhibitory and Antimicrobial Activity of Fermented Goat Milk: Activity and Physicochemical Property Relationship of the Peptide Components. **Food**

Function, v. 8, n. 8 , p. 2783-2791, 2017.

MOSLEHISHAD, M.; EHSANI, M. R.; SALAMI, M.; MIRDAMADI, S.; EZZATPANAH, H.; NASLAJI, A. N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The Comparative Assessment of ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptide Fractions Obtained from Fermented Camel and Bovine Milk by *Lactobacillus rhamnosus* PTCC 1637. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 2, p. 82–87, 2013.

MROS, S.; CARNE, A.; HA, M.; BEKHIT, A. E. D.; YOUNG, W.; MCCONNELL, M. Comparison of the Bioactivity of Whole and Skimmed Digested Sheep Milk with that of Digested Goat and Cow Milk in Functional Cell Culture Assays. **Small Ruminant Research**, v. 149, p. 202–208, 2017.

NAGY, Z.; KISS, T.; SZENTIRMAI, A.; BIRÓ, S. β -Galactosidase of *Penicillium chrysogenum*: Production, Purification, and Characterization of the Enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 24–29, 2001.

NEU, J. Probiotics and Necrotizing Enterocolitis. **Clinics in Perinatology**, v. 41, n. 4, p. 967–978, 2014.

NGWA, C. J.; PRADEL, G. Coming Soon: Probiotics-Based Malaria Vaccines. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 1, p. 2–4, 2015.

NIELSEN, S. D.; BEVERLY, R. L.; QU, Y.; DALLAS, D. C. Milk Bioactive Peptide Database: A Comprehensive Database of Milk Protein-Derived Bioactive Peptides and Novel Visualization. **Food Chemistry**, v. 232, p. 673–682, 2017.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Strategies for the Discovery, Identification and Validation of Milk Protein-Derived Bioactive Peptides. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 26–43, 2016.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; HILL, C. Production of Bioactive Substances by Intestinal Bacteria as a Basis for Explaining Probiotic Mechanisms: Bacteriocins and Conjugated Linoleic Acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189–205, 2012.

OELSCHLAEGGER, T. A. Mechanisms of Probiotic Actions - A Review. **International journal of medical microbiology : IJMM**, v. 300, n. 1, p. 57–62, 2010.

ÖZER, B.; KIRMACI, H. A. Fermented Milks | Products of Eastern Europe and Asia. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2° ed. Turkey: Elsevier, 2014, p. 900–907.

PAPADIMITRIOU, C. G.; VAFOPOULOU-MASTROJIANNAKI, A.; SILVA, S. V.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; ALICHANIDIS, E. Identification of Peptides in

- Traditional and Probiotic Sheep Milk Yoghurt with Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Inhibitory Activity. **Food Chemistry**, v. 105, n. 2, p. 647–656, 2007.
- PARK, S.; BAE, J.-H. Probiotics for Weight Loss: A Systematic Review and Meta-Analysis ☆. **Nutrition Research**, v. 35, n. 7, p. 566–575, 2015.
- PARK, Y. W. Rheological Characteristics of Goat and Sheep Milk. **Small Ruminant Research**, v. 68, n. 1–2, p. 73–87, 2007.
- PARK, Y. W. **Bioactive components in goat milk**. 1° ed. Blackwell: Wiley, 2009.
- PATEL, A. K.; AHIRE, J. J.; PAWAR, S. P.; CHAUDHARI, B. L.; CHINCHOLKAR, S. B. Comparative Accounts of Probiotic Characteristics of *Bacillus* spp. Isolated from Food Wastes. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 505–510, 2009.
- PEÑA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2952–2956, 2002.
- PEPLOW, M. Live - in Bugs Fight HIV. **Nature News**, p. doi:10.1038/news060116-4, 2006.
- PICARIELLO, G.; MAMONE, G.; NITRIDE, C.; ADDEO, F.; FERRANTI, P. Protein Digestomics: Integrated Platforms to Study Food-Protein Digestion and Derived Functional and Active Peptides. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 120–134, 2013.
- PISANU, S.; GHISAURA, S.; PAGNOZZI, D.; BIOSA, G.; TANCA, A.; ROGGIO, T.; UZZAU, S.; ADDIS, M. F. The Sheep Milk Fat Globule Membrane Proteome. **Journal of proteomics**, v. 74, n. 3, p. 350–358, 2011.
- PRINGSULAKA, O.; RUEANGYOTCHANATHANA, K.; SUWANNASAI, N.; WATANAPOKASIN, R.; AMNUEYSIT, P.; SUNTHORNTHUMMAS, S.; SUKKHUM, S.; SARAWANEEYARUK, S.; RANGSIRUJI, A. *In vitro* Screening of Lactic Acid Bacteria for Multi-Strain Probiotics. **Livestock Science**, v. 174, p. 66–73, 2015.
- QUIRÓS, A.; CONTRERAS, M. del M.; RAMOS, M.; AMIGO, L.; RECIO, I. Stability to Gastrointestinal Enzymes and Structure-Activity Relationship of beta-Casein-Peptides with Antihypertensive Properties. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1848–1853, 2009.
- RANJBAR, F.; AKBARZADEH, F.; HOMAYOUNI, A. Probiotics Usage in Heart Disease and Psychiatry Fatemeh. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Iran: Elsevier Inc., 2016. p. 807–811.
- REARDON, S. Bacterium Can Reverse Autism - like Behaviour in Mice. **Nature**, p. 2–5, 2013.
- REDZWAN, S. M.; JAMALUDDIN, R.; AHMAD, F. N.; LIM, Y. Probiotics as Potential Adsorbent of Aflatoxin. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Malaysia: Elsevier

Inc., 2016. p. 1–13.

REN, D.; LI, C.; QIN, Y.; YIN, R.; DU, S.; YE, F.; LIU, C.; LIU, H.; WANG, M.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, X.; TIAN, M.; JIN, N. *In vitro* Evaluation of the Probiotic and Functional Potential of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fermented Food and Human Intestine. **Anaerobe**, v. 30, p. 1–10, 2014.

RITCHIE, M. L.; ROMANUK, T. N. A Meta-Analysis of Probiotic Efficacy for Gastrointestinal Diseases. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34938, 2012.

RIZK, S.; MAALOUF, K.; BAYDOUN, E. The Antiproliferative Effect of Kefir Cell-Free Fraction on HuT-102 Malignant T Lymphocytes. **Clinical Lymphoma & Myeloma**, v. 9, n. 3, p. S198-S203, 2009.

RIZK, S.; MAALOUF, K.; BAYDOUN, E. Kefir Induces Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in HTLV-1 Negative Malignant T-Lymphocytes. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v. 11, p. S123, 2011.

RODRIGUES, K. L.; CAPUTO, L. R. G.; CARVALHO, J. C. T.; EVANGELISTA, J.; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and Healing Activity of Kefir and Kefiran Extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404–408, 2005.

ROHENKOHL, J. E.; CORRÊA, G. F.; AZAMBUJA, D. F.; FERREIRA, F. R. O Agronegócio de Leite de Ovinos E Caprinos. **Indicadores Econômicos FEE**, v. 39, n. 2, p. 97–114, 2011.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of Bacteria to Hydrocarbons: A Simple Method for Measuring Cell-Surface Hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, p. 29–33, 1980.

SÁ, C. O.; SIQUEIRA, E. R.; SÁ, J. L.; FERNANDES, S. Influência Do Fotoperíodo No Consumo Alimentar , Produção E Composição Do Leite de Ovelhas Bergamácia. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 601–608, 2005.

SAADI, S.; SAARI, N.; ANWAR, F.; ABDUL HAMID, A.; GHAZALI, H. M. Recent Advances in Food Biopeptides: Production, Biological Functionalities and Therapeutic Applications. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 80–116, 2015.

SAAVEDRA, L.; HEBERT, E. M.; MINAHK, C.; FERRANTI, P. An Overview Of “omic” analytical Methods Applied in Bioactive Peptide Studies. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 925–934, 2013.

SABEENA FARVIN, K. H.; BARON, C. P.; NIELSEN, N. S.; OTTE, J.; JACOBSEN, C. Antioxidant Activity of Yoghurt Peptides: Part 2 – Characterisation of Peptide Fractions.

Food Chemistry, v. 123, n. 4, p. 1090–1097, 2010.

SAITO, V. S. T.; DOS SANTOS, T. F.; VINDEROLA, C. G.; ROMANO, C.; NICOLI, J. R.; ARAÚJO, L. S.; COSTA, M. M.; ANDRIOLI, J. L.; UETANABARO, A. P. T. Viability and Resistance of Lactobacilli Isolated from Cocoa Fermentation to Simulated Gastrointestinal Digestive Steps in Soy Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 2, p. M208-M213, 2014.

SALAHUDDIN, M.; AKHTER, H.; AKTER, S. Effects of Probiotics on Haematology and Biochemical Parameters in Mice. **The Bangladesh Veterinarian**, v. 30, n. 1, p. 20–24, 2013.

SALQUE, M.; BOGUCKI, P. I.; PYZEL, J.; SOBKOWIAK-TABAKA, I.; GRYGIEL, R.; SZMYT, M.; EVERSLED, R. P. Earliest Evidence for Cheese Making in the Sixth Millennium BC in Northern Europe. **Nature**, v. 493, n. 7433, p. 522–5, 2013.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L.; QUINTERO SAAVEDRA, J. I.; CHIRALT, A. Antilisterial and Physical Properties of Biopolymer Films Containing Lactic Acid Bacteria. **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 200–206, 2014.

SANTOS, A.; SAN MAURO, M.; SANCHEZ, A.; TORRES, J. M.; MARQUINA, D. The Antimicrobial Properties of Different Strains of *Lactobacillus* Spp. Isolated from Kefir. **Systematic and applied microbiology**, v. 26, n. 3, p. 434–437, 2003.

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative Peptides from Food Proteins: A Review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949–56, 2010.

SATIR, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. Influence of Kefir Fermentation on the Bioactive Substances of Different Breed Goat Milks. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 852–858, 2015.

SATIR, G.; GUZEL-SEYDIM, Z. B. How Kefir Fermentation Can Affect Product Composition? **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 1–7, 2016.

SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. A Fluorescence-Based Protocol for Quantifying Angiotensin-Converting Enzyme Activity. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2423–7, 2006.

SERBAN, D. E. Gastrointestinal Cancers: Influence of Gut Microbiota, Probiotics and Prebiotics. **Cancer Letters**, v. 345, n. 2, p. 258–270, 2014.

SHAHABI-GHAHFARROKHI, I.; KHODAIYAN, F.; MOUSAVI, M.; YOUSEFI, H. Preparation of UV-Protective Kefiran/nano-ZnO Nanocomposites: Physical and Mechanical Properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 41–46, 2015.

SHARMA, P.; TOMAR, S. K.; GOSWAMI, P.; SANGWAN, V.; SINGH, R. Antibiotic Resistance among Commercially Available Probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176–195, 2014.

- SICILIANO, R. A.; MAZZEO, M. F. Molecular Mechanisms of Probiotic Action: A Proteomic Perspective. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 390–396, 2012.
- SIELADIE, D. V.; ZAMBOU, N. F.; KAKTCHAM, P. M.; CRESCI, A.; FONTEH, F. Research Article Probiotic Properties of Lactobacilli Strains Isolated From Raw Cow Milk in the Western Highlands of Cameroon. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 12–28, 2011.
- SIMSEK, S.; SÁNCHEZ-RIVERA, L.; EL, S. N.; KARAKAYA, S.; RECIO, I. Characterisation of *in vitro* Gastrointestinal Digests from Low Fat Caprine Kefir Enriched with Inulin. **International Dairy Journal**, v. 75, p. 68–74, 2017.
- SLEATOR, R. D.; HILL, C. New Frontiers in Probiotic Research. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 143–147, 2008.
- SOLIERI, L.; RUTELLA, G. S.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of Non-Starter Lactobacilli on Release of Peptides with Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities during Bovine Milk Fermentation. **Food Microbiology**, v. 51, p. 108–116, 2015.
- SONAL SEKHAR, M.; UNNIKRISHNAN, M. K.; VIJAYANARAYANA, K.; RODRIGUES, G. S.; MUKHOPADHYAY, C. Topical Application/formulation of Probiotics: Will It Be a Novel Treatment Approach for Diabetic Foot Ulcer? **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 1, p. 86–88, 2014.
- SONESTEDT, E.; WIRFÄLT, E.; WALLSTRÖM, P.; GULLBERG, B.; ORHO-MELANDER, M.; HEDBLAD, B. Dairy Products and Its Association with Incidence of Cardiovascular Disease: The Malmö Diet and Cancer Cohort. **European Journal of Epidemiology**, v. 26, n. 8, p. 609–618, 2011.
- SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F. Diet–microbiota Interactions as Moderators of Human Metabolism. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56–64, 2016.
- SPINLER, J. K.; ROSS, C. L.; SAVIDGE, T. C. Probiotics as Adjunctive Therapy for Preventing *Clostridium difficile* Infection – What Are We Waiting For? **Anaerobe**, p. 1–7, 2016.
- SUMERI, I.; ARIKE, L.; STEKOLŠTŠIKOVA, J.; UUSNA, R.; ADAMBERG, S.; ADAMBERG, K.; PAALME, T. Effect of Stress Pretreatment on Survival of Probiotic Bacteria in Gastrointestinal Tract Simulator. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n. 6, p. 1925–1931, 2010.
- TAGLIAZUCCHI, D.; SHAMSIA, S.; HELAL, A.; CONTE, A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from goats' milk released by *in vitro* gastro-intestinal digestion.

International Dairy Journal, v. 71, p. 6-16, 2017.

TAMIME, A. Y.; WSZOLEK, M.; BOŽANIĆ, R.; ÖZER, B. Popular Ovine and Caprine Fermented Milks. **Small Ruminant Research**, v. 101, n. 1–3, p. 2–16, 2011.

TANG, W.; XING, Z.; LI, C.; WANG, J.; WANG, Y. Molecular Mechanisms and *in vitro* Antioxidant Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2. **Food Chemistry**, v. 221, p. 1642–1649, 2017.

TENORE, G. C.; RITIENI, A.; CAMPIGLIA, P.; STIUSO, P.; DI MARO, S.; SOMMELLA, E.; PEPE, G.; D'URSO, E.; NOVELLINO, E. Antioxidant Peptides from “Mozzarella Di Bufala Campana DOP” after Simulated Gastrointestinal Digestion: *In vitro* Intestinal Protection, Bioavailability, and Anti-Haemolytic Capacity. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 365–375, 2015.

TEREFE, N. S. Food Fermentation. In: **Reference Module in Food Science**. 1° ed. Australia: Elsevier Inc., 2016. p. 1–3.

THÉOLIER, J.; HAMMAMI, R.; LABELLE, P.; FLISS, I.; JEAN, J. Isolation and Identification of Antimicrobial Peptides Derived by Peptic Cleavage of Whey Protein Isolate. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 706–714, 2013.

THOREUX, K.; SCHMUCKER, D. L. Kefir Milk Enhances Intestinal Immunity in Young but Not Old Rats 1. **Nutrition and Aging**, p. 807–812, 2001.

TIAN, P.; XU, B.; SUN, H.; LI, X.; LI, Z.; WEI, P. Isolation and Gut Microbiota Modulation of Antibiotic-Resistant Probiotics from Human Feces. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 405–412, 2014.

TILLISCH, K.; LABUS, J.; KILPATRICK, L.; JIANG, Z.; STAINS, J.; EBRAT, B.; GUYONNET, D.; LEGRAIN-RASPAUD, S.; TROTIN, B.; NALIBOFF, B.; MAYER, E. A. Consumption of Fermented Milk Product with Probiotic Modulates Brain Activity. **Gastroenterology**, v. 144, n. 7, p. 1394–1401, 2013.

TRIPATHI, A. S.; MARATHE, S. J. Probiotics and Physical Strength. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion**. 1° ed. India: Elsevier Inc., 2015. p. 635–340.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic Functional Foods: Survival of Probiotics during Processing and Storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.

TULINI, F. L.; WINKELSTRÖTER, L. K.; DE MARTINIS, E. C. P. Identification and Evaluation of the Probiotic Potential of *Lactobacillus paraplantarum* FT259, A Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Semi-Hard Artisanal Cheese. **Anaerobe**, v.

22, p. 57–63, 2013.

TUO, Y.; ZHANG, W.; ZHANG, L.; AI, L.; ZHANG, Y.; HAN, X.; YI, H. Study of Probiotic Potential of Four Wild *Lactobacillus rhamnosus* Strain. **Anaerobe**, v. 21, p. 22–27, 2013.

UDENIGWE, C. C.; ALUKO, R. E. Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 1, p. R11-R24, 2012.

UDENIGWE, C. C.; FOGLIANO, V. Food Matrix Interaction and Bioavailability of Bioactive Peptides: Two Faces of the Same Coin? **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 9–12, 2017.

URDANETA, E.; BARRENETXE, J.; ARANGUREN, P.; IRIGOYEN, A.; MARZO, F.; IBÁÑEZ, F. C. Intestinal Beneficial Effects of Kefir-Supplemented Diet in Rats. **Nutrition Research**, v. 27, n. 10, p. 653–658, 2007.

USTOK, F. I.; TARI, C.; HARSA, S. Biochemical and Thermal Properties of β -Galactosidase Enzymes Produced by Artisanal Yoghurt Cultures. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1114–1120, 2010.

VALERIANO, V. D.; PARUNGAO-BALOLONG, M. M.; KANG, D. K. *In vitro* Evaluation of the Mucin-Adhesion Ability and Probiotic Potential of *Lactobacillus mucosae* LM1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 117, n. 2, p. 485–497, 2014.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: An Update. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 91, n. 1, p. 6–21, 2015.

VARGA, L.; SÜLE, J.; NAGY, P. Survival of the Characteristic Microbiota in Probiotic Fermented Camel, Cow, Goat, and Sheep Milks during Refrigerated Storage. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 4, p. 2039–44, 2014.

VELEZ, E. M.; GALDEANO, C. M.; CARMUEGA, E.; WEILL, R.; BONET, M. E.; PERDIGON, G. Probiotic Fermented Milk Consumption Modulates the Allergic Process Induced by Ovalbumin in Mice. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 566–576, 2015.

VENTURA, M.; PEROZZI, G. Introduction to the Special Issue Probiotic Bacteria and Human Gut Microbiota. **Genes and Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 203–204, 2011.

VINCENZETTI, S.; POLIDORI, P.; MARIANI, P.; VITA, A. Protein Fraction Characterization of Sheep Milk from the Comisana Breed. **Veterinary research communications**, v. 32 Suppl 1, p. S179-S181, 2008.

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, v. 36, n. 9–10, p. 895–904, 2003.

VINDEROLA, G.; PERDIGON, G.; DUARTE, J.; THANGAVEL, D.; FARNWORTH, E.; MATAR, C. Effects of Kefir Fractions on Innate Immunity. **Immunobiology**, v. 211, n. 3, p. 149–156, 2006.

VIRTANEN, T.; PIHLANTO, A.; AKKANEN, S.; KORHONEN, H. Development of Antioxidant Activity in Milk Whey during Fermentation with Lactic Acid Bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 106–115, 2007.

VIZOSO PINTO, M. G.; FRANZ, C. M. A. P.; SCHILLINGER, U.; HOLZAPFEL, W. H. *Lactobacillus* Spp. with *in vitro* Probiotic Properties from Human Faeces and Traditional Fermented Products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 205–214, 2006.

WANG, A. N.; YI, X. W.; YU, H. F.; DONG, B.; QIAO, S. Y. Free Radical Scavenging Activity of *Lactobacillus fermentum* *in vitro* and Its Antioxidative Effect on Growing-Finishing Pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 4, p. 1140–1148, 2009.

WANG, S.-Y.; HO, Y.-F.; CHEN, Y.-P.; CHEN, M.-J. Effects of a Novel Encapsulating Technique on the Temperature Tolerance and Anti-Colitis Activity of the Probiotic Bacterium *Lactobacillus kefirifaciens* M1. **Food Microbiology**, v. 46, p. 494–500, 2015.

WU, H.-C.; CHEN, H.-M.; SHIAU, C.-Y. Free Amino Acids and Peptides as Related to Antioxidant Properties in Protein Hydrolysates of Mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**, v. 36, n. 9–10, p. 949–957, 2003.

XIE, C.; LI, J.; WANG, K.; LI, Q.; CHEN, D. Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhoea in Older Patients: A Systematic Review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 13, n. 2, p. 128–134, 2015.

XIE, M.; SHEVCHENKO, A.; WANG, B.; SHEVCHENKO, A.; WANG, C.; YANG, Y. Identification of a Dairy Product in the Grass Woven Basket from Gumugou Cemetery (3800 BP, Northwestern China). **Quaternary International**, v. 426, p. 158–165, 2016.

XIE, N.; ZHOU, T.; LI, B. Kefir Yeasts Enhance Probiotic Potentials of *Lactobacillus paracasei* H9: The Positive Effects of Coaggregation between the Two Strains. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 394–401, 2012.

XUE, Z.; YU, W.; LIU, Z.; WU, M.; KOU, X.; WANG, J. Preparation and Antioxidative Properties of a Rapeseed (*Brassica napus*) Protein Hydrolysate and Three Peptide Fractions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5287–5293, 2009.

YAMAMOTO, N.; AKINO, A.; TAKANO, T. Antihypertensive Effect of the Peptides

Derived from Casein by an Extracellular Proteinase from *Lactobacillus helveticus* CP790.

Journal of Dairy Science, v. 77, n. 4, p. 917–922, 1994.

ZAJŠEK, K.; GORŠEK, A. Modelling of Batch Kefir Fermentation Kinetics for Ethanol Production by Mixed Natural Microflora. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, n. 1, p. 55–60, 2010.

ZANIRATI, D. F.; ABATEMARCO, M.; SANDES, S. H. D. C.; NICOLI, J. R.; NUNES, Á. C.; NEUMANN, E. Selection of Lactic Acid Bacteria from Brazilian Kefir Grains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures. **Anaerobe**, v. 32, p. 70–76, 2015.

ZHANG, J.; ZHANG, X.; ZHANG, L.; ZHAO, Y.; NIU, C.; YANG, Z.; LI, S. Potential Probiotic Characterization of *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Inner mongolia “Hurood” cheese. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 225–235, 2014.

ZHANG, R.-Y.; THAPA, P.; ESPIRITU, M. J.; MENON, V.; BINGHAM, J.-P. From Nature to Creation: Going around in Circles, the Art of Peptide Cyclization. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 6, p. 1135–1150, 2018.

ZHENG, Y.; LU, Y.; WANG, J.; YANG, L.; PAN, C.; HUANG, Y. Probiotic Properties of *Lactobacillus* Strains Isolated from Tibetan Kefir Grains. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69868, 2013.

ZIYADI, S.; HOMAYOUNI, A.; MOHAMMAD-ALIZADEH-CHARANDABI, S.; BASTANI, P. Probiotics and Usage in Bacterial Vaginosis. In: **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics**. 1° ed. Iran: Elsevier Inc., 2016. p. 655–659.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS

Lima, M.S.F.; Silva, R.A.; Silva, M. F.; Silva, P. A. B.; Costa, R. M. P. B.; Teixeira, J. A. C.; Porto, A.L.F.; Cavalcanti, M.T.H. BRAZILIAN KEFIR-FERMENTED SHEEP'S MILK SOURCE OF ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT PEPTIDES. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2018. Doi: 10.1007/s12602-017-9365-8.

Lima, M. S. F.; Souza, K. M. S.; Albuquerque, W. W. C.; Teixeira, J. A. C.; Cavalcanti, M.T.H.; Porto, A.L.F. *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* FROM BRAZILIAN KEFIR-FERMENTED MILK: AN *IN VITRO* EVALUATION OF PROBIOTIC PROPERTIES. **Microbial Pathogenesis**, v. 110, p. 670-677, 2017. Doi: 10.1016/j.micpath.2017.05.010

Lima, M. S. F.; Silva, R. A.; Lima Filho, J. L.; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. QUEIJO DE COALHO ARTESANAL: FONTE ALTERNATIVA DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS. **Brazilian Journal of Food and Technology**, v. 20, p. e2016193, 2017. Doi: 10.1590/1981-6723.19316

Cabral, M. L. B.; **Lima, M. S. F.;** Fernandes, G. A. A.; Costa, E. F.; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. QUEIJOS ARTESANAIS: FONTE DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁTICAS SELVAGENS PARA FORMULAÇÃO DE FERMENTOS TRADICIONAIS. **Journal of bioenergy and food science**, v. 3, p. 207-215, 2016. Doi: 10.18067/jbfs.v3i4.112.

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS

Mendes, R.; Andrade, R. H.; **Lima, M. S. F.;** Porto, A.L.F.; Gouveia, E. R. SURVIVAL OF BACTERIA AND YEASTS IN THE KEFIR OF PASSION FRUIT FROM CAATINGA UNDER SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS. **XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, 2017, Aracajú.

Melo, R. G. ; Andrade, A. F. ; Aguiar, E. M. ; Souza, A. T. V. ; Silva, P. E. C. ; **Lima, M. S. F.** ; Bezerra, R. P. ; PORTO, A. L. F. EVALUATION OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME (ACE) INHIBITORY ACTIVITY FROM EXTRACTS OF CHLORELLA VULGARIS. **XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos XII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**, 2017, Aracajú.

Lima, M. S. F.; Souza, K. M. S. ; Porto, A. L. F. ; Cavalcanti, M. T. H. . AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE HIDROFÓBICA E DE AUTO-AGREGAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS APÓS DIGESTÃO IN VITRO DE LEITE FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2016, Fortaleza.

Costa, E. F. ; **Lima, M. S. F.** ; Porto, A. L. F. ; Cavalcanti, M. T. H. . AVALIAÇÃO ANTAGONISTA DE BACTÉRIAS ÁCIDO LÁCTICAS ISOLADAS DE QUEIJO DE COALHO ARTESANAL PRODUTORAS DE BACTERIOCINAS. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014, Florianópolis.

Lima, M. S. F.; Silva, R. A. ; Silva, M. F. ; Porto, A. L. F. ; Cavalcanti, M. T. H. . CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS E ANTIOXIDANTES DE UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL PROBIÓTICO: LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR KEFIR. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, 2014, Florianópolis.

Lima, M. S. F.; Porto, A. L. F. ; Soares, M. T. C. V.. EFEITO PROTETOR DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ISOLADAS APÓS DIGESTÃO DE LEITE FERMENTADO POR KEFIR. **XX Simpósio Nacional de Bioprocessos XI Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Fortaleza, 2015.

RESUMOS SIMPLES PUBLICADOS

Lima, M.S.F.; Souza, K. M. S.; Porto, A.L.F.; Cavalcanti, M.T.H. FERMENTED SHEEP'S MILK BY KEFIR: A SOURCE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS RESISTANT TO IN VITRO HUMAN DIGESTION SIMULATION. **29º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2017, Foz do Iguaçu.

Souza, K. M. S.; **Lima, M.S.F.**; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M.T.H. EVALUATION OF THE ANTILISTERIAL ACTIVITY OF PEPTIDE EXTRACTS OBTAINED AFTER SIMULATION OF IN VITRO DIGESTION OF FERMENTED SHEEP MILK BY KEFIR GRAINS. **29º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2017, Foz do Iguaçu.

Lima, M.S.F.; Cavalcanti, M.T.H.; Porto, A.L.F. IN VITRO HUMAN DIGESTION SIMULATION: AN EFFECTIVE METHOD FOR ISOLATING PROBIOTICS MICROORGANISMS. **VIII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), III International Symposium on Rare Diseases (RDis) and XI LIKA Scientific Journey**, 2017, Recife.

Araújo, T.S; **Lima, M.S.F.**; Souza, K. M. S.; Paulo, A. J.; Wanderley, M. C. A.; Herculano, P. N.; Cavalcanti, M.T.H.; Porto, A.L.F._PREPARATION OF CHICKEN BREAST MUSCLE HYDROLYSATES WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY. **VIII International Symposium on Diagnostics and Therapeutics (SINATER), III International Symposium on Rare Diseases (RDis) and XI LIKA Scientific Journey**, 2017, Recife.

Lima, M. S. F.; Souza, K. M. S.; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. PEPTIDES IDENTIFICATION BY MASS SPECTROMETRY AFTER IN VITRO DIGESTION OF A NEW FUNCTIONAL FOOD: FERMENTED SHEEP'S MILK BY KEFIR GRAINS. **XIII Reunião Regional do Nordeste da SBBq VI International Symposium in Biochemistry of Macromolecules and Biotechnology**, 2016, Fortaleza.

Souza, K. M. S.; **Lima, M. S. F.**; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PEPTIDES OBTAINED FROM THE FERMENTED SHEEP'S MILK FOR KEFIR AFTER in vitro DIGESTION. **VII Sinater- Simpósio Internacional de Diagnóstico e Terapêutica e X Jornada Científica do LIKA**, 2016, Recife.

Silva, D. D.; **Lima, M. S. F.**; Cavalcanti, M. T. H.; Porto, A. L. F. POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE PEPTÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DE QUEIJO FRESCO DE BÚFALA. **II Congresso Brasileiro de Pre Pro e Simbióticos**, 2015, São Paulo.

Lima, M. S. F.; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. SELEÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ISOLADAS APÓS DIGESTÃO IN VITRO DE LEITE FERMENTADO POR KEFIR ATRAVÉS DA SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS. **II Congresso Brasileiro de Pre, Pro e Simbióticos**, 2015, São Paulo.

Souza, K. M. S.; **Lima, M. S. F.;** Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. SELEÇÃO DE PROBIÓTICOS ISOLADOS APÓS DIGESTÃO IN VITRO DE LEITE FERMENTADO POR KEFIR ATRAVÉS DE ATIVIDADE ANTAGÔNICA. **XV Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 2015, Recife.

Silva, P. E. C.; Ramos, B. A.; **Lima, M. S. F.;** Melo, R. G.; Silva, M. F.; Souza, A. T. V.; Souza, K. M. S.; Andrade, A. F.; Bezerra, R. P.; Porto, A. L. F. EVALUATION OF ANTIMICROBIAL, ANTIOXIDANT AND FIBRINOLYTIC POTENTIAL FROM FRUIT EXTRACTS OF *Momordica sp.*. **6º Congresso Brasileiro de Biotecnologia**, 2015, Brasília.

Lima, M. S. F.; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PEPTÍDEOS EXTRAÍDOS DO LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR. **12º Encontro de Química de Alimentos**, 2014, Lisboa.

Lima, M. S. F.; Silva, P. A. B.; Silva, M. F.; Silva, R. A.; Porto, A. L. F.; Cavalcanti, M. T. H. ESTUDO DE UM NOVO ALIMENTO FUNCIONAL PROBIÓTICO: LEITE DE OVELHA FERMENTADO POR GRÃOS DE KEFIR. **Workshop Teórico-Prático Sub-Tipagem e Workshop Micro-Organismos Probióticos**, 2014, Campinas.