

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DE FILTRADOS DE QUEFIR ARTESANAL**

RAQUEL TERESINHA CZAMANSKI

PORTO ALEGRE

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA
DE FILTRADOS DE QUEFIR ARTESANAL**

**AUTORA: RAQUEL TERESINHA CZAMANSKI *
ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ MARIA WIEST ****

**Dissertação apresentada como requisito para obtenção
do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de
Medicina Veterinária Preventiva**

PORTO ALEGRE

2003

* Médica Veterinária do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento
Gonçalves – RS

** Prof. Adjunto do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
ICTA/UFRGS



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

APROVADO POR:


Prof. Dr. GUIOMAR PEDRO BERGMANN,
Membro da Banca.


Profa. Dra. ISA BEATRIZ NOLL,
Membro da Banca.


Profa. Dra. SOENI BELLÉ,
Membro da Banca.

Este trabalho
é dedicado a meu pai,
à memória de minha mãe,
ao meu esposo Paulo, aos
meus filhos Daniel e Lucas

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador, Prof. Dr. José Maria Wiest, pela amizade e experiência profissional.

Ao Veterinário Ydérzio Luiz Vianna Filho, pela assessoria estatística.

Ao Diretor do Centro Federal de Educação Tecnológica de Bento Gonçalves, Prof. Flávio Abreu de Souza, pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Professora Lurdinha, aos Colegas e Professores da área técnica do CEFET – BG, que me substituíram.

Aos Avós Paternos Sr. Clóvis Meireles e Sr^a Vera Fialho Meireles pela dedicação aos netos nos momentos difíceis.

Aos Bolsistas e demais Estagiários pela ajuda na preparação do material de laboratório.

Aos Colegas Mestrandos e Doutorandos pela agradável convivência.

À Bibliotecária Ana Vera Finardi Rodrigues, da Faculdade de Veterinária - UFRGS, pela orientação bibliográfica e de normatização.

Ao Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e ao Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos da UFRGS por proporcionarem condições para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	7
LISTA DE TABELAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O problema	16
1.2 Importância	17
1.3 Objetivos Gerais	17
1.4 Objetivos Específicos	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Quefir	19
2.2 Características do quefir	20
2.3 Leite	22
2.4 Probióticos e prebióticos	25
2.5 Conservação dos alimentos	28
2.6 Desinfetantes	31
2.7 Comprovação da eficácia dos desinfetantes	33
2.8 Ácido láctico	35
2.9 Bacteriocinas	37
2.10 Atividade antimicrobiana do quefir	39
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Manutenção e preparo do quefir	42

3.2 Esterilização do filtrado de quefir	42
3.3 Preparo das concentrações dos filtrados	43
3.4 Determinação da acidez dos filtrados de quefir	44
3.5 Determinação do potencial Hidrogênio (pH) dos filtrados de quefir	44
3.6 Preparo dos meios de cultura	44
3.7 Preparo das culturas bacterianas	45
3.8 Preparo e controle do inóculo	45
3.9 Determinação da atividade antibacteriana	46
3.9.1 Concentração Inibitória Mínima	46
3.9.2 Concentração Bactericida Mínima	48
3.9.3 Teste de Suspensão (simulações)	49
3.10 Análise Estatística	52
4 RESULTADOS	53
5 DISCUSSÃO	85
6 CONCLUSÕES	89
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXO	96

LISTA DE QUADROS

Página

Quadro 1 – Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI.....	54
Quadro 2 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI.....	55
Quadro 3 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	56
Quadro 4 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	57
Quadro 5 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	58
Quadro 6 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	59

Quadro 7 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	60
Quadro 8 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	61
Quadro 9 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI.....	62
Quadro 10 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI.....	63
Quadro 11 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	64
Quadro 12 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	65
Quadro 13 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	66

Quadro 14 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	67
Quadro 15 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	68
Quadro 16 - Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos em meio BHI	69
Quadro 17 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Staphilococcus aureus</i> ATCC 25.923 na presença de desinibidores bacterianos em meio BHI	70
Quadro 18 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19.433 na presença de desinibidores bacterianos em meio BHI	71
Quadro 19 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença de desinibidores bacterianos em meio BHI	72
Quadro 20 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 11.076 na presença de desinibidores bacterianos em meio BHI	73

Quadro 21 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Staphilococcus aureus</i> ATCC 25.923 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos em meio BHI	74
Quadro 22 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19.433 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos em meio BHI	75
Quadro 23 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos em meio BHI	76
Quadro 24 – Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 11.076 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos em meio BHI	77
Quadro 25 – Resultados dos testes de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25.923 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229 na presença de matéria orgânica (albumina sérica bovina) e de desinibidores bacterianos em meio BHI	78

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Análise de variância – Comparação entre as concentrações de quefir e três diferentes métodos de esterilização (autoclave, tindalização e fervura). Leitura 24 horas.	80
Tabela 2 - Análise de variância - Comparação entre as bactérias (<i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> e <i>S. enteritidis</i>) e três diferentes métodos de esterilização (autoclave, tindalização e fervura). Leitura 24 horas.	80
Tabela 3 – Análise de variância – Comparação entre a Concentração inibitória mínima das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, com as concentrações de quefir 50%, 40%, 30% e 20%, presença e ausência de desinibidor. Leitura 24 horas.	81
Tabela 4 - Análise de variância - Concentração bactericida mínima do quefir à 75%, comparação entre quatro tempos de exposição (5, 15, 30 e 60 minutos).	83
Tabela 5 - Teste t de Student - Comparação entre as leituras de 24 e 144 horas - CIM das quatro bactérias, com as concentrações de quefir 50%, 40%, 30% e 20%, presença e ausência de desinibidor.	84
Tabela 6 - Teste t de Student - Comparação entre as leituras de 24 e 144 horas - CBM das quatro bactérias, com a concentração de quefir 75%, em quatro tempos de exposição (5, 15, 30 e 60 minutos).	85

RESUMO

Quefir é uma bebida láctea originada do Cáucaso, produzida a partir da fermentação alcoólica e ácido-láctica dos grãos de quefir, que são microrganismos que vivem em perfeita simbiose. Assemelhando-se ao iogurte natural quanto ao sabor, aroma, consistência, o quefir é um alimento muito rico e por isso indicado para crianças e idosos. Possui inúmeras indicações terapêuticas, mas ainda é pouco conhecido no país. Quefir foi durante muito tempo conhecido apenas pelos povos montanheses da região Caucásica, onde é preparado com leite de ovelha ou de cabra e recebe também o nome de "milho do profeta", em alusão a Maomé, no referencial islâmico.

Com base nos resultados apresentados em diversos trabalhos, comprovando a ação antimicrobiana dos grãos de quefir, prosseguiram-se os estudos pesquisando a ação antibacteriana do filtrado esterilizado de quefir artesanal, frente a diversas situações problemas. Estudou-se a possibilidade de utilizar o filtrado de quefir tradicional (artesanal ou não industrializado), previamente esterilizado, como antisséptico/desinfetante em agroindústria familiar ou produção animal; forma alternativa aos desinfetantes químicos convencionais, considerando sua eficácia (benefício esperado/ benefício obtido), através da determinação de sua atividade antibacteriana. Foi determinada as concentrações inibitórias mínimas (CIMS) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs) do filtrado de quefir tradicional frente a duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433) e duas bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC 11076), levando em consideração três técnicas diferentes de esterilização do filtrado, no sentido de avaliar a ação antibacteriana quanto ao tempo de exposição (cinco, quinze, trinta e sessenta minutos), presença ou ausência de suporte (aço inoxidável e pano de algodão), presença ou ausência de matéria orgânica (albumina sérica bovina, simulando sujidades de uma agroindústria).

Utilizou-se a diluição serial com a técnica de sistema de tubos múltiplos e a técnica de suspensão do inóculo. Para esterilizar o filtrado de quefir utilizaram-se três diferentes técnicas: fervura convencional por quinze minutos, tindalização durante cinco minutos, por três dias consecutivos e autoclave por quinze minutos. Estas três técnicas de esterilização não apresentaram diferenças significativas entre elas. Os resultados demonstram um maior efeito bacteriostático frente a bactérias Gram-negativas e um melhor efeito bactericida frente a bactérias Gram-positivas. *Staphylococcus aureus* foi a bactéria que demonstrou maior resistência para a inibição (bacteriostasia); porém após sessenta minutos exposta ao quefir (75%), a inativação (bactericidia) ocorreu em 100 UFC/mL. Enquanto que a *Salmonella* demonstrou sensibilidade à inibição, mas nas mesmas condições, ou seja, aos sessenta minutos exposta ao quefir (75%), a inativação ocorreu em somente 10 UFC/mL.

Nas primeiras vinte e quatro horas houve diferença muito significativa no desempenho do filtrado de quefir entre as linhas com e sem desinibidores bacterianos. Eis a importância do uso de desinibidores na técnica para evitar interpretações errôneas de resultados "falsos-negativos", ou seja, evitar uma leitura de morte bacteriana, quando na verdade o que ocorreu foi inibição bacteriana.

Estes resultados despertam o interesse em prosseguir a avaliação de desinfetantes biológicos a serem usados na agroindústria, na saúde e na produção animal, visando à desinfecção como um controle direcionado aos microrganismos indesejáveis em situações problemas específicos, dificultando a transmissão ou a redução da dose infectante.

ABSTRACT

Kefir is a milky beverage originated of Caucasu, made by lacteo-acid and alcoholic fermentation of kefir grains which are microorganisms that live in perfect symbiosis. It seems like natural yogurt as taste, smell, consistence, kefir is a food very rich and that's because it's indicated for children and old ages. It has countless therapeutical indications, but it's still unknown in Brazil. Kefir was, during a very long time, known only by montainese people from the Caucasus' region, where is made with sheep or she-goat milk and it also recives the name of "prophet corn", in Maome allusion, on the Islamic reference.

*Throughout the shown results in several works, proving kefir grains' antimicrobial action, the studies went on searching the artisan kefir sterilized filtered's antibacterial action, front the several situations problems. Showed the possibility of use the tradicional kefir's filtered (artisan or not industrialized), previous sterilized, as antiseptic/disinfectant in familiar agroindustrial or animal production; alternative from to the conventional chemical disinfectants, considering its efficiency (expect benefit/gotten benefit), throughout the determination of its antibacterial activity. The Minimum Concentrations Inhibitions (CIMs) were determined and the Minimum Concentrations Bactericide (CBMs) of the tradicional kefir's filtered front the two positives-Gram bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 19433), and two negatives-Gram bacterias (*Escherichia coli* ATCC 11229 and *Salmonella enteritidis* ATCC 11076), taking into consideration three different technics to sterilize the kefir's filtered, in perceive of evaluate the antimicrobial action as to in the exposition of time (five, fifteen, thirty and sixty minutes), presence or absence of support (stainless steel and cotton of cloth), presence or absence of organic material (albumin bovine in simulation dirts of one agroindustrial).*

The utilized methodology was the serial dilution with the multiple tube system technic and the inocul suspension technic. To sterilize the kefir's filtered was used three different technics: the convencional effervescence by fifteen minutes, the tindalization during five minutes, by three days successives and the autoclave by fifteen minutes. These three technics of sterilization didn't show differences significatives among them.

The results shown in a bigger bacteriostatic effect into negatives-Gram bacterias and a better bactericid effect in to positives-Gram bacterias. Staphylococcus aureus demonstrated the bigger resistance bacteria of inhibition, but after the sixty minutes exposed in the kefir (75%), inactivated in 100 UFC/mL. While Salmonella showed sensitivity of inhibition, but equal condition, or then, for the sixty minutes exposed in the kefir (75%), inactivated just in 10 UFC/mL.

At the first twenty-four hours there was very significative difference in performance of kefir's filtered among the lines with and without bacterial desinhibition. It is the importance to use desinhibition in technic to avoid false interpretation of results, or then, to avoid reading of dead bacterial, when actually what happened was bacterial inhibition.

These results awake the interesting to go on the biologics disinfectants valuation to use in agroindustrial, in health and animal production, looking at disinfection how a control in to conduce undesirable microorganisms on specific situations problems, to make difficult the transmission or the reduction of infect dose.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O problema

A necessidade de uma perfeita desinfecção nas indústrias alimentícias ou agroindústrias implica em uso de produtos que podem comprometer a qualidade dos alimentos, colocando em risco a saúde do consumidor.

O consumidor tornou-se mais consciente e está cada vez mais preocupado com a sua saúde. Ainda assim os riscos de toxinfecções alimentares permanecem, pois muitos alimentos, mesmo com ótima aparência, podem conter toxinas e/ou bactérias que prejudicam seriamente o organismo.

As indústrias de alimentos dependem de muitos produtos químicos, seja na forma de aditivos, que são adicionados diretamente na composição dos alimentos, tais como: conservantes, corantes, aromatizantes, espessantes e outros; seja na forma de desinfetantes utilizados para a desinfecção de equipamentos, maquinários, instalações. Resíduos destes produtos vão sendo acumulados tanto no organismo humano e dos animais, como também no meio ambiente.

Muitos trabalhos comprovam a toxicidade de desinfetantes de uso rotineiro, principalmente porque são utilizados de forma indiscriminada, geralmente visando compensar baixos níveis de higiene.

As agroindústrias familiares precisam desenvolver produtos diferenciados, que possam atrair consumidores pela qualidade, sejam auto sustentáveis e que contribuam para a preservação do meio ambiente. O quefir preenche estes e outros requisitos como facilidade de manuseio, simplicidade e economia. A fase mais líquida do filtrado de quefir (soro) pode ser considerada um subproduto, mas por ter uma origem tão nobre, provavelmente contém muitos princípios a serem pesquisados.

1.2 Importância

Visando a qualidade nutricional do alimento, a saúde do homem e a preservação do meio ambiente, muitos produtos naturais aos poucos estão substituindo os produtos químicos em diferentes áreas, inclusive na agricultura e nas indústrias alimentícias.

Estas substituições ocorrem lentamente, apesar da resistência das indústrias, pois os preços geralmente são mais elevados. Um exemplo é o ácido láctico que substitui o cloro em alguns pontos da salsicharia em indústrias de embutidos, ou em lavagem de carcaça de frangos, em abatedouros.

Com base nos resultados apresentados em diversos trabalhos, comprovando a ação antimicrobiana dos grãos de quefir, surge o interesse em prosseguir os estudos pesquisando a ação antibacteriana do filtrado estéril de quefir artesanal, frente a diversas situações problemas.

1.3 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar a possibilidade de utilizar o filtrado de quefir tradicional (artesanal ou não industrializado), previamente esterilizado, como antisséptico/ desinfetante em agroindústria familiar como forma alternativa aos desinfetantes químicos convencionais, considerando sua eficácia (benefício esperado/ benefício obtido), através da determinação de sua atividade antibacteriana.

1.4 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos visam:

- Determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e concentrações bactericidas mínimas (CBMs) do filtrado de quefir tradicional em relação a duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*) e duas Gram-negativas (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*).
- Comparar três técnicas diferentes de esterilização do filtrado de quefir (autoclavado, tindalizado e fervido).
- Avaliar a ação antibacteriana do filtrado de quefir quanto ao tempo de exposição frente aos inóculos padronizados.
- Verificar a influência dos suportes (aço inoxidável e pano de algodão) sobre a atividade antibacteriana do filtrado de quefir.
- Estudar o efeito da matéria orgânica (albumina sérica bovina simulando sujidades de uma agroindústria) sobre a atividade antibacteriana do filtrado de quefir.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Quefir

Quefir é uma bebida fermentada feita com “Sementes do Cáucaso” (OLIVEIRA, 1973).

Os grãos de quefir ou os fungos do quefir também denominados “*painço ou milho-miúdo do profeta*”, segundo a lenda, teriam sido entregues pessoalmente pelo profeta Maomé a uma tribo eleita, como símbolo da imortalidade, (HÄFLIGER et al.1991).

Klupsch (1992), cita o livro “Kefyr” publicado em 1884 pelo médico W. Podwysstozki, em Kiev Rússia, sendo praticamente a primeira referência técnico-científica conhecida do assunto, descrevendo a origem, a evolução, bem como a distribuição do quefir pela Europa a partir de 1867, desde o sopé do maciço de Elbrus no Cáucaso. Outro médico russo, Sipovitz, nesta ocasião, relatou à Sociedade Caucásica de Medicina, detalhes da existência e das características de uma bebida de natureza láctea, obtida por fermentação, mantida até então no domínio de duas tribos de montanheses ao norte do Cáucaso, os Osseters e os Kabardinos . Revelou como local de descoberta dos primeiros grãos de quefir, a aldeia montanhosa de Karatschajeff, situada a 500 metros de altura no maciço de Elbrus, que alcança 5.600 metros de altura, referido anteriormente.

Segundo Souza et al. (1984), quefir é um leite fermentado, com dupla fermentação: alcoólica e ácida, ao mesmo tempo. A coagulação do leite é proporcionada pelos “grãos de quefir”, que são aglomerados de microrganismos vivos. A cultura mãe ou “grãos de quefir” caracteriza-se fisicamente por apresentar coloração branca ou ligeiramente amarelada, com diâmetros variando de 1 a 15 mm e que se unem formando um aglomerado de forma variável. Os “grãos” apresentam semelhanças várias, tais como couve-flor, pipoca, grãos de arroz partido.

De acordo com Behmer (1980), quefir, chamado também “kefhir, kyphir, kafir e kipp”, foi durante muito tempo conhecido apenas pelos povos montanheses da região

Caucásica, onde é preparado com leite de ovelha ou de cabra e recebe também o nome de “milho do profeta”. Esta bebida é consumida desde tempos imemoráveis pelos tártaros e é preparada por eles de uma maneira muito empírica.

De acordo com Blasco (1999), o quefir é a fermentação do leite mais completa porque é dupla: de natureza láctica e alcoólica. Não somente mantém as propriedades do leite, mas também adiciona. Em geral restabelece a flora intestinal, tão importante para uma boa digestão e assimilação dos alimentos. Sua eficácia preventiva é incontestável, segundo a evidência da longevidade que alcançam os habitantes de Armênia e Geórgia; normalmente vivem com escassas doenças, ultrapassam os cem anos, desconhecem a tuberculose, o câncer, a úlcera de estômago e muitas enfermidades freqüentes em nossa sociedade. O quefir com menos de vinte e quatro horas de fermentação é laxante e com mais de trinta e seis horas é adstringente. Oferece também efeitos aperitivos, até afrodisíacos. Em aplicações tópicas é antialérgico e antisséptico.

Na atualidade, o quefir vem merecendo indicações científicas nos mais variados enfoques, desde a nutrição humana normal e a dietoterapia, até mesmo o seu emprego com resultados significativos na oncologia comparada, (WIEST et al. 1999).

Bezerra et al.(1999) comentam que no Brasil o quefir é praticamente desconhecido e se restringe a algumas famílias que, de alguma forma, conseguiram fermento (“grãos de quefir”) e a ele adicionam leite obtendo o produto fermentado, porém, na maioria das vezes, de forma empírica, resultando produtos de qualidade variável.

2.2 Características do quefir

Para Wiest et al. (1999), grãos de quefir originados de áreas ou locais diferentes demonstram diferenças significativas em sua composição microbiológica. As características e o perfil das culturas bacterianas isoladas dos diferentes grãos de quefir não podem ser utilizados para diferenciação do produto quefir dos demais

produtos de leite acidificado, fermentado. No quefir, especialmente, somente o etanol e o dióxido de carbono produzido pelas leveduras servem de parâmetros para esta diferenciação.

Segundo Ferreira (1999), o filtrado, além de ser produzido por meio dos próprios grãos, pode ser produzido ainda por meio de uma cultura *starter*. A cultura *starter*, ou fermento é o próprio quefir recém-produzido, que contém as bactérias e leveduras necessárias para reproduzir o produto. O emprego de cultura *starter* para a manufatura de um quefir tradicional se restringe somente a algumas bateladas sucessivas porque, com as repicagens do produto feito sem os grãos, ocorre um desbalanceamento da flora. Os grãos só são reproduzidos quando repicados. Não se conseguiu até hoje reproduzir os grãos de quefir a partir de seus constituintes.

La Riviere et al. (appud SOUZA, 1984, p. 142), caracterizaram um componente envolvendo os “grãos de quefir” como sendo um polissacarídeo composto de quantidades iguais de galactose e glicose, o qual foi por eles denominado de kefiran, sendo este o principal responsável por aproximadamente a metade do material gelatinoso.

Micheli et al. (1999) isolaram a estirpe que produz cápsula-polissacarídeo, LM-17, de grãos de quefir e a identificaram como formadora de limo, *Lactobacillus* em forma de bastão. De acordo com os dados do espectro ressonância magnética ^1H - e ^{13}C - nuclear, o exopolissacarídeo produzido pelo isolamento da estirpe bactéria era idêntico a galactose e glicose extraída dos grãos de quefir e por isso reconhecido como Kefiran. O kefiran produzido foi caracterizado pela baixa viscosidade, força ótica rotativa, dicroísmo circular e medição em espectro infravermelho. Este grupo de pesquisadores extraiu o exopolissacarídeo em condições de laboratório, resultando a produção de 2g/litro de kefiran puro da cultura sobrenadante da estirpe LM-17.

Para Bezerra et al.(1999), o quefir é um leite fermentado que difere basicamente do iogurte por conter álcool e gás carbônico. Apesar disto, as análises físico-químicas apresentam resultados similares para acidez, valor de pH, teor de sólidos e

teor de açúcar. A análise sensorial foi avaliada por estes autores, cujos resultados mostraram semelhanças, indicando a viabilidade do consumo do quefir, principalmente se forem destacados outros atributos inerentes ao produto, como simplicidade na produção, efeitos benéficos à saúde e ausência de aditivos, principalmente conservantes, corantes, flavorizantes e espessantes.

Pelczar et al. (1981) citam *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* e as leveduras fermentadoras de lactose como os principais microrganismos responsáveis pela fermentação láctica e alcoólica mista do quefir; as bactérias produzem ácido (0,6 a 1% de ácido láctico) e as leveduras produzem álcool (0,5 a 1% de etanol).

2.3 Leite

Segundo Pelczar et al. (1981), muito antes de terem sido descobertos os microrganismos, a “acidificação do leite doce” era praticada para a conservação do leite e para a obtenção de novas bebidas com sabor distinto e agradável. Frequentes referências aos leites fermentados podem ser encontradas nos escritos bíblicos. O produto fermentado era fabricado deixando-se que os organismos produtores de ácido láctico, presentes no leite, crescessem ou ainda, inoculando-se leite fresco com uma porção de leite fermentado de boa qualidade.

O leite e os seus derivados têm para Ballarini (1994) uma posição de realce no imaginário social e individual, que vai desde uma verdadeira “cultura do leite” que tem sido às vezes mitificada, até uma aversão ao leite, que pode se tornar uma verdadeira fobia, na nossa cultura essencialmente “lactófila”.

A lactofilia está estritamente relacionada ao ato de domesticar os animais. Segundo o mesmo autor, deve-se pensar que os leites azedos e fermentados foram os primeiros a serem introduzidos nas primitivas cidades humanas, seguidos pelos queijos, que vinham a ser uma importante “reserva alimentar” de alta qualidade. A lactofilia foi então o resultado de uma importante conquista cultural, que abrange tanto o aspecto sanitário como o nutricional com reflexões notáveis tanto na

economia como na organização social. Neste propósito o autor evidencia que a transformação do leite condicionou muitas sociedades humanas, entre as quais a nossa, inclusive por uma série de aspectos extranutricionais que somente agora, começam a ser visto.

De acordo com Pelczar et al. (1981), o leite tem sido considerado como o alimento humano “mais próximo da perfeição”. Seu excepcional valor nutritivo é devido aos seus principais constituintes: proteínas, carboidratos, gorduras, sais minerais, vitaminas e água. O leite é também, um excelente meio nutritivo para o crescimento de muitas bactérias.

A saúde e identidade cultural surgem como duas preocupações que foram abordadas por Fischler (1998) com mais ou menos ênfase, de acordo com a sensibilidade das diferentes populações. A expectativa de vida alongou-se em todos os países desenvolvidos; duplicou praticamente em um século. Multiplicou o número de pessoas que chegaram a atingir cem anos. Aumentou consideravelmente a altura média. Apesar desses sinais de melhoria da saúde pública, inquietações médicas difundiram-se entre uma grande parte da população em relação à alimentação. Foram designados “doenças de civilização” as patologias cardiovasculares, em particular coronarianas, e numerosos cânceres, que não se manifestam antes de uma certa idade e que, devido ao prolongamento da vida acabam se manifestando.

Para Ballarini (1994), quanto mais se estudam os leites fermentados, tanto melhor podem ser compreendidas suas características, não somente nutricionais e dietéticas (por exemplo, anticolesterol), mas também antinfeciosas, antitóxicas e até antitumorais. São alimentos verdadeiramente “pró-bióticos”, alimentos favoráveis à vida e que “dão mais vida aos anos”. Segundo o autor, nas populações que se alimentam regularmente com leites fermentados e iogurtes, há freqüentemente pessoas centenárias, que desconhecem os “males do século”. A pesquisa científica provou suas numerosas características benéficas, que justificam a vida longa e saudável das pessoas que deles se alimentam habitualmente, embora destaca que a longevidade não depende tanto deste ou daquele alimento, quanto de um conjunto de

fatores entre os quais têm importância a genética, o ambiente e o estilo de vida. Isto não diminui, porém, a importância de alimentos benéficos como o iogurte e os leites acidificados.

“Os povos que mais vivem, em média, são os da região mediterrânea, do Cáucaso, e de algumas regiões da Índia” (DE ANGELES, 1999).

Os pastores das montanhas do Cáucaso descobriram que leite fresco transportado em bolsas de couro poderiam ocasionalmente fermentar produzindo bebidas efervescentes. Esta bebida auto-carbonada continua sendo popular na Rússia, Sudoeste da Ásia e leste da Europa, tendo recentemente ganho notoriedade nos Estados Unidos (LIFEWAY FOODS INC, 1997).

Lifeway (1997) afirma que o quefir tem mais culturas benéficas que qualquer outro produto fermentado do leite, tais como iogurte ou manteiga. É o leite substituto ideal para crianças, gestantes, lactente, convalescente e idoso. Pode ser considerado um ótimo medicamento para problemas digestivos e particularmente ótimo restabelecedor da flora intestinal, o qual pode ter sido destruído por antibiótico ou outro medicamento.

De acordo com Walstra e Jenness (1987), existem muitos tipos de leite fermentados que recebem nomes distintos. A maioria se origina por ação de bactérias lácticas no leite (por exemplo: coalhada e iogurte). Alguns leites fermentados contêm outros microrganismos: quefir e kumis (este último fabricado com leite de égua contém leveduras que produzem álcool, bem como alguns fungos). Diz-se com frequência que os leites fermentados são especialmente saudáveis, e que, em determinadas circunstâncias, devem ser preferidos porque seu baixo pH previne o crescimento ou determina a morte dos microrganismos patogênicos.

2.4 Probióticos e prebióticos

Segundo Zubillaga et al. (2001), o uso de alimentos funcionais (probióticos e prebióticos) tem demonstrado ser efetivo para o tratamento ou controle de diversas doenças. O autor sugere o uso de probiótico como alimentos funcionais em diferentes doenças, com especial ênfase para o quefir.

Em Forsythe (2002), os prebióticos, os probióticos e os simbióticos são assuntos que envolvem controvérsia na área de “alimentos funcionais”. Os prebióticos são “componentes alimentícios não digestíveis que afetam de maneira benéfica o hospedeiro por meio da estimulação seletiva do crescimento e atividade de uma ou várias bactérias do cólon, as quais têm o potencial de melhorar a saúde do hospedeiro”. Um probiótico pode ser definido como um suplemento microbiano vivo, o qual afeta benéficamente o animal hospedeiro, por meio da estimulação seletiva do crescimento e atividade de uma ou várias bactérias do cólon, as quais têm o potencial de melhorar a saúde do hospedeiro”. Um probiótico pode ser definido como um suplemento microbiano vivo o qual afeta benéficamente o animal hospedeiro, por meio da melhoria de seu balanço microbiano intestinal”. Essa definição foi modificada para uma “cultura simples ou mista de microrganismos vivos, os quais beneficiam o homem ou os animais por meio da melhoria das propriedades de sua flora nativa”. Um workshop denominado “The Lactic Acid Bacteria Industrial Platform” propôs uma definição distinta para os probióticos: “probióticos orais são microrganismos vivos, os quais, quando ingeridos em certa quantidade, exercem benefícios para a saúde, além de uma nutrição básica inerente”. Essa definição mostra que os probióticos podem ser consumidos tanto como um componente alimentar, quanto como uma preparação não-alimentar. Os simbióticos podem ser descritos como uma “mistura de probióticos e prebióticos que afeta benéficamente o hospedeiro, melhorando a sobrevivência e a colonização de microrganismos vivos suplementares à dieta no trato gastrintestinal”.

De acordo com Naidu et al. (1999), probiótico é uma palavra derivada da Grécia e significa “para vida” e foi primeiramente usada por Lilley e Stillwell para descrever

substâncias secretadas por um microrganismo para estimular o crescimento de outro – como antônimo de “antibiótico”. Parker (1974) appud Naidu et al. (1999), definiu probiótico como “organismos e substâncias, que contribuem para o equilíbrio microbiótico intestinal”. Fuller redefiniu probiótico como um suplemento alimentar microbiótico vivo que afeta beneficemente o hospedeiro animal, melhorando seu equilíbrio microbiótico intestinal.

Segundo Ballarini (1994), nos probióticos alimentares devem ser incluídas as enzimas contidas nos alimentos vegetais e animais, trazidas principalmente pelas bactérias das fermentações. Estas enzimas contribuem determinadamente nos processos de transformação e conservação dos alimentos e são fundamentais para as características nutricionais e sensoriais. Por exemplo, a elevada digestibilidade dos produtos com longa maturação, como o queijo parmesão e o presunto cru, se deve a uma delicada pré-digestão feita por probióticos enzimáticos. A “autoconservação”, a elevada “tolerância alimentar” e a alta “nutricionalidade” do iogurte provêm da presença e da ação combinada de vários probióticos, que se formam durante a fermentação láctica: ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, álcool, água oxigenada, antibióticos como a nisina e a pimarcina, além dos efeitos de “pré-digestão” de muitas enzimas.

Para Naidu et al. (1999), bactéria ácido láctica e suas substâncias probioativas celulares exercem vários efeitos benéficos no trato gastrintestinal. Bactérias ácido lácticas previnem aderência, restabelecem a flora e repelem diversos patógenos da mucosa entérica através de diversos mecanismos antimicrobianos. Bactérias ácido lácticas também liberam várias enzimas dentro do lúmen do intestino e exercem potente efeito sinérgico com a digestão e aliviam sintomas de má absorção intestinal. Consumidores de produtos lácteos fermentados com bactérias ácido lácticas podem obter gradualmente efeitos antitumorais. Estes efeitos são atribuídos pela inibição de atividades mutagênicas, decréscimo de diversas enzimas implicando na geração de carcinogênicos, mutagênicos ou agentes promotores de tumor; supressão de tumores que a epidemiologia correlaciona a regimes alimentares e câncer.

Segundo De Vrese et al. (1992), dependendo da origem étnica, entre 15 a 18% da população adulta tem baixa atividade de β -galactosidase na mucosa intestinal. Nestes casos de baixa β -galactosidase na mucosa, pode ser indicativo de intolerância causada pelo efeito osmótico da lactose alcançando a parte distal do intestino, e pelos produtos finais voláteis da fermentação bacteriana desta lactose não digerida, ácidos orgânicos voláteis, dióxido de carbono, metano e hidrogênio. Em seu experimento, o autor usou quefir em vez do iogurte aproveitando o fato de que o quefir contém atividade β -galactosidase em seus grãos, mas não contém galactose livre.

De acordo com um estudo, a intolerância à lactose é uma condição que afeta muitos brasileiros, causando um leve mal-estar gastrointestinal, flatulência, devido à incapacidade de digerir o açúcar do leite. Cientistas finlandeses e americanos descobriram o gene responsável por esse desajuste. É um primeiro passo para a invenção de um teste que detecte a condição ainda na infância e permita ao “intolerante” controlar seu consumo diário de leite ou substituí-lo por produtos sem lactose (O INTOLERÁVEL LEITE, 2002).

“*Lactobacillus bulgaricus* e outros *Lactobacillus* comumente usados na indústria de leites fermentados apresentam beta-galactosidase suficientemente ativa para diminuir significativamente a lactose no produto, beneficiando desta forma indivíduos intolerantes à lactose” (NAIDU et al., 1999).

Em De Vrese, et al. (1992), a atividade β -galactosidase dos grãos de quefir se deve principalmente aos lactobacilos (exemplo: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus buchneri*), enquanto a fermentação da lactose, etanol e gás carbônico produzido pelas leveduras (exemplo: *Cândida kefir*) demonstra baixa atividade. Outras leveduras (exemplo: *Sacharomyces* spp.) não tem β -galactosidase. Estas leveduras não fermentadoras de lactose, nos grãos de quefir utilizam ácido láctico ou galactose como fonte única de carbono. Esta última atividade explica a falta de galactose livre no quefir.

De acordo com “Lifeway kefir”, alguns benefícios do quefir incluem: tolerado por pessoas com intolerância à lactose, estimulante da digestão e do apetite, pode

diminuir níveis de colesterol no sangue, melhora a resistência a resfriados e outras doenças contagiosas. Quefir tem sido usado para tratamento de várias doenças, incluindo tuberculose, câncer, infecções e condições alérgicas, (LIFEWAY FOODS, INC, 2002).

Tamine (2002) lista as propriedades terapêuticas associadas aos microrganismos probióticos: ativo contra *Helicobacter pylori*, aumenta a digestão da lactose, estimula a imunidade do intestino, estabiliza doenças crônicas, estimula o peristaltismo intestinal, melhora o balanço entre a população microbiana, reduz a atividade enzimática fecal ou mutagênica, reduz o período de doença ocasionada por *Salmonella* spp., previne ou trata diarreias agudas causadas por rotavírus e induzidas pelo uso de antibióticos, melhora a imunidade contra doenças, suprime alguns cânceres, reduz o colesterol, reduz a hipertensão, aderência da bactéria probiótica nas células intestinais humanas, efeito na microflora da saliva humana, produz bacteriocinas.

2.5 Conservação dos Alimentos

De acordo com Frazier e Westhoff (1993), as interações mútuas entre os microrganismos por uma parte e as plantas e os animais por outra, são naturais e constantes. Na natureza está perfeitamente comprovado o papel ecológico dos microrganismos e sua importância em todos os ciclos geoquímicos. Os alimentos que o homem consome procedem basicamente de plantas e de animais ou de produtos derivados dos mesmos, é compreensível que estes alimentos possam conter microrganismos que interagem com eles. Na maioria dos casos, os microrganismos utilizam estes alimentos como fonte de nutrientes para seu próprio crescimento, que pode ocasionar naturalmente a sua alteração. Portanto, simplesmente desempenhando sua “função” na natureza, muitas vezes podem resultar em alimentos não aptos para consumo. Com o fim de evitar isto, procura-se reduzir ao

mínimo o contato entre os microrganismos e os alimentos (prevenção da contaminação) e também se procura eliminar os microrganismos, ou pelo menos adaptá-los as condições de armazenamento dos alimentos para evitar que os mesmos se multipliquem (conservação).

Segundo Jean Lederer (1991), até há um século e meio atrás, os meios artificiais com que se contava para prolongar a conservação dos alimentos eram muito limitados; conheciam-se o sal, o vinagre e o açúcar. Isso deixava o homem muito dependente das estações do ano para a sua alimentação. Era também muito dependente da produção local, pois com meios de conservação tão reduzidos, não se podia pensar em transporte à longa distância.

Para Frazier e Westhoff (1993), a crescente necessidade de recursos alimentícios exige que as perdas de alimentos devido a sua alteração se mantenham em nível mínimo. Apesar de muitos países contar com tecnologias avançadas para a conservação de alimentos, os procedimentos que empregam para isso não se aplicam ao máximo de suas possibilidades ou não são totalmente eficazes. Atualmente são poucos os conservantes novos, inócuos e "ideais" cujo emprego que se propõem, por uma ou outra razão, não chegam a alcançar a categoria de aditivos comercialmente aceitáveis.

Para preservar os alimentos Corlett, Jr. e Brown (1980) citam o aumento da acidez, de maneira natural por fermentação, ou artificial por adição de ácidos fracos. A acidez pode ser um fator básico na conservação, como é o caso de alimentos fermentados, por exemplo, o iogurte, a coalhada, os pepinos em vinagre.

Os conservantes que se originam nos próprios alimentos como consequência da atividade de microrganismos, são para Frazier e Westhoff (1993), em sua maior parte, ácidos (principalmente ácido láctico) e álcool. Este efeito conservante destas substâncias se complementa quase sempre por um ou mais agentes conservantes auxiliares, como são: a temperatura, a anaerobiose, o cloreto de sódio, o açúcar ou a adição de um ácido.

Lewis (1980) afirma que a conservação de alimentos tratados com aporte de muito frio ou calor constitui a forma mais efetiva e eficiente de reduzir a contaminação nas indústrias alimentícias. Não obstante, há situações em que se prefere eliminar ou destruir os microrganismos com agentes químicos, tanto por razões técnicas como de tipo econômico.

De acordo com Camargo (1975), a indústria moderna dedica considerável parcela de sua atenção à prevenção da contaminação dos alimentos, desde a matéria-prima até o produto final. Na preservação de alimentos pelos diversos métodos existentes estão envolvidos alguns princípios, entre os quais a assepsia.

Andrade e Macêdo (1996) afirmam que uma das conseqüências mais graves da má higienização nas indústrias de alimentos é a possível ocorrência de doenças de origem alimentar. Este é um dos problemas que mais afligem os responsáveis pela qualidade dos alimentos comercializados. As doenças são provocadas por bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas de origem animal ou vegetal. As bactérias representam o grupo de maior importância, sendo responsáveis pela ocorrência de cerca de setenta por cento dos surtos e noventa por cento dos casos.

Silva Jr. (1997) lembra que os riscos podem ser uma simples diarreia, dor de cabeça, vômitos, mal-estar geral, até estados mais graves, como a infecção intestinal, paralisia muscular, problemas respiratórios, convulsões e até mesmo a morte. Vai depender da qualidade ou da quantidade de microrganismos e toxinas que a pessoa ingeriu através de alimentos ou água. Dependerá do poder inerente aos microrganismos em causar doenças e fazer mal à saúde e também da resistência da pessoa afetada.

2.6 Desinfetantes

De acordo com Lewis (1980), se conhece com o nome de desinfetantes aqueles agentes químicos capazes de reduzir a níveis insignificantes a taxa de patógenos e demais microrganismos. Os desinfetantes são mais úteis naquelas indústrias alimentícias em que a aplicação de calor ou frio não é o procedimento mais adequado para lutar contra a contaminação microbiana, como acontece nas operações de eviscerações de aves e produção de leite.

A aplicação da desinfecção como uma das várias ações de saúde, segundo Wiest (1984), orienta-se em função da situação problema a ser enfrentada. Deste modo, diz-se prevenção da evolução, quando emprega-se a desinfecção em situações já presentes, em desenvolvimento, nas quais sabidamente nos confrontamos com os agentes causais e, prevenção da ocorrência, quando emprega-se a desinfecção como vigilância epidemiológica, ainda na ausência, mesmo pressuposta, dos agentes causais, prevenindo-se a contaminação, a instalação e a proliferação destes agentes causais no ambiente.

Para Andrade e Macêdo (1996), a higienização na indústria de alimentos visa basicamente à preservação da pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica dos alimentos. Auxilia, portanto, na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha uma boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo riscos à saúde do consumidor. Assim, contribui decisivamente para a produção de alimentos dentro de padrões microbiológicos recomendados pela legislação. Além disso, a higienização correta tem papel relevante quando se observam os aspectos econômicos e comerciais. A produção de alimentos seguindo normas adequadas de controle de qualidade viabiliza os custos de produção e satisfaz os anseios dos consumidores.

De acordo com Franco e Landgraf (1996), a agroindústria familiar não possui tecnologias sofisticadas como as de uma indústria, porém a sua preocupação com o controle do desenvolvimento microbiano é a mesma. Visando eliminar riscos à saúde

do consumidor, bem como prevenir ou retardar o surgimento de alterações indesejáveis nos alimentos, deve-se optar por diferentes métodos para controlar o desenvolvimento microbiano: métodos mecânicos para a remoção dos microrganismos presentes; métodos físicos (frio, calor, por exemplo), métodos químicos. Através da combinação de dois ou mais métodos, geralmente obtém-se bons resultados.

Andrade e Pinto (1999) lembram que a higiene representa o conjunto de medidas, incluindo a limpeza e a sanificação, que aplicado à produção de alimentos, tem por finalidade assegurar ao consumidor um produto de qualidade. A limpeza implica na remoção de sujidades, de resíduos alimentares e de microrganismos da matéria prima, dos equipamentos, utensílios e ambientes de processamento, entre outros. A sanificação tem como objetivo a eliminação de todos os microrganismos patogênicos e dos deterioradores em níveis considerados seguros. A limpeza, sem dúvida reduz a carga microbiana das superfícies, mas não a índices satisfatórios. Por isso a sanificação é indispensável.

Hobbs e Gilbert (1978) aconselham que se lave primeiro a superfície de um equipamento ou utensílio para eliminar a matéria orgânica e que depois se aplique a solução desinfetante a esta superfície limpa. Com regularidade se desperdiçam grandes quantidades de desinfetantes químicos porque se aplicam a superfícies sujas. Os restos de alimentos não somente impedem o acesso do desinfetante químico aos microrganismos, como também podem inativar o desinfetante.

De acordo com Trigo (1999), sanificar consiste em tornar higienicamente viável o meio no qual será preparado um alimento.

Para Longrée e Blaker (1971) uma superfície é limpa quando está livre de sujidades e está bacteriologicamente limpa quando se tem eliminado a maior parte das bactérias pela higienização, mediante o emprego de água quente ou de higienizadores químicos especiais. Por conseguinte, quando é necessária a limpeza bacteriológica, do ponto de vista da saúde pública, a higienização deve ser parte da operação de limpeza.

Segundo Block (1994), bactericida é um agente que mata bactéria. Este termo é aplicado para agentes químicos que matam todas as bactérias patogênicas e não patogênicas, mas não necessariamente os esporos. Um agente bacteriostático, usualmente químico, previne o crescimento, mas não mata necessariamente as bactérias ou seus esporos. Algumas vezes a diferença somente se verificará se um agente químico é bacteriostático ou bactericida dependendo das condições de aplicação, como o tempo, temperatura ou pH.

2.7 Comprovação da eficácia dos desinfetantes

Para Bier (1990), um desinfetante só deve ser empregado na prática quando previamente verificado quanto à sua eficiência por meio de testes adequados. O primeiro método satisfatório para aferir o poder germicida dos desinfetantes foi desenvolvido em 1881 por R. Koch: esporos de *B. anthracis* dessecados sobre um fio de seda eram expostos durante tempos variáveis a uma solução da substância a verificar, determinando-se depois, pela introdução do fio no meio de cultura, o tempo requerido para a desinfecção.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os produtos saneantes domissanitários com ação antimicrobiana somente serão registrados e autorizados para uso mediante a comprovação de sua eficácia aos fins propostos, através de análise prévia realizada com o produto acabado e nas diluições de uso indicadas pelo fabricante. Os exames serão realizados no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Ministério da Saúde, ou laboratórios oficiais credenciados especificamente para este fim, obedecendo aos métodos e procedimentos do INCQS/FIOCRUZ, (BRASIL 1988).

De acordo com Leitão (1984), a avaliação do desempenho dos desinfetantes é bastante complexa, principalmente em função dos inúmeros fatores que poderão afetá-la. Assim a natureza e tipo das superfícies tratadas, a concentração e natureza dos resíduos a elas aderentes, o tipo de microflora contaminante na superfície, a

concentração e o período de contato do desinfetante com a superfície, são apenas algumas das variáveis que poderão afetar, em maior ou menor grau, a eficiência do desinfetante. Torna-se evidente a importância da execução de alguns testes que permitam a seleção de um produto ideal para as condições específicas de uso na indústria de alimentos.

Entre os métodos bacteriológicos mais conhecidos, Lewis (1980) cita os testes do Coeficiente Fenólico, em que a potência da atividade bacteriana relativa do desinfetante se compara com a do fenol (Horwitz, 1980), a prova de Suspensão Qualitativa da Sociedade Alemã de Higiene e Microbiologia (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 1977), a prova de Suspensão Quantitativa do Comitê Holandês de Fitofarmacia, a prova de Evolução de Desinfetantes Hospitalares, a prova de Diluição de Uso e suas modificações para determinar a eficácia germicida de um desinfetante, quando se aplica em determinadas condições ambientais (Block, 1994) e, diversos métodos baseados na inoculação direta em ágar e que demonstra o grau de destruição microbiana obtido nas superfícies, nos equipamentos e utilitários tratados.

Andrade e Macêdo (1996) não recomendam o teste do Coeficiente Fenólico porque este apresenta restrições: é pouco reprodutível, sua precisão é discutível quando avalia sanificantes que diferem do fenol quanto à composição química e sua metodologia não permite simular situações usuais da indústria de alimentos.

Segundo Horwitz (1980), o teste de suspensão é recomendado pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para avaliar sanificantes usados em superfícies não porosas e previamente limpas que entram em contato com alimentos. A metodologia do teste de suspensão é simples e flexível, permitindo simular situações que ocorrem rotineiramente na indústria de alimentos. É provavelmente o teste mais indicado para avaliar sanificantes usados na indústria de alimentos.

Andrade e Macêdo (1996) afirmam que o teste de Diluição de Uso, reconhecido como rigoroso e bem padronizado, é o método recomendado nos Estados Unidos

pela EPA (“Agência de Proteção Ambiental”) para registro e especificações comerciais de sanificantes. Apesar de amplamente aceito, ainda são realizadas pesquisas com o objetivo de melhorar a eficiência deste método.

2.8 Ácido láctico

Segundo Mancilha e Silva (1991), as bactérias lácticas são os microrganismos mais utilizados para a produção industrial de ácido láctico. Seu “habitat” natural consiste além do leite e produtos lácteos, em plantas intactas e em decomposição, intestino e mucosas humanas. As linhagens mais utilizadas pertencem ao gênero *Lactobacillus*, sendo o *Lactobacillus delbrueckii* o mais utilizado em meio contendo glicose como fonte de carbono e energia. Entre outras bactérias de interesse industrial encontra-se o *Lactobacillus bulgaricus* que utiliza a lactose como fonte de carbono para a produção de ácido láctico.

Ribeiro e Mizuta (1994) pesquisaram a ação do ácido láctico na descontaminação de carcaças de animais de corte. Segundo estes autores dentre os ácidos orgânicos que possuem efeitos sanitizantes, o ácido láctico tem-se mostrado o mais adequado para tal finalidade. Relatam um efeito bactericida imediato e um efeito bacteriostático mediato que atuaria por tempo prolongado, ambos promovendo uma redução da carga bacteriana inicial.

Mello e Terra (1994) recomendam o uso de ácidos orgânicos como meio para aumentar a vida de prateleira de carcaças de frango, bem como assegurar ao consumidor a diminuição de microrganismos patogênicos.

Vilharva (2001) destaca que no Brasil, o ácido láctico é integrante da “tabela de aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação” (Resolução nº 386, de 5 de agosto de 1999) o que significa que ele foi avaliado toxicologicamente pela FAO/WHO (Food Agriculture Organization/World Health Organization) que estabeleceu uma Ingestão Diária Aceitável IDA – “não especificada”, o que indica

que seu uso está limitado à quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário.

A Agência Nacional de vigilância Sanitária aprova a extensão de uso do ácido láctico como coadjuvante de tecnologia, na função de agente de controle de microrganismos na lavagem de ovos, carcaças ou partes de animais de açougue em quantidade suficiente para obter o efeito desejado, (BRASIL 2001).

De acordo com Jay (1978), os ácidos orgânicos se encontram entre os mais amplamente utilizados como conservantes, na maioria dos casos se originam nos próprios alimentos por ação das bactérias lácticas. O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos como o propiônico e o láctico, se deve ao pH baixo, abaixo da zona de crescimento, como a inibição metabólica devido as moléculas de ácido sem dissociar. Para o autor, a acidez titulável é de maior valor que o pH para determinar a quantidade de ácidos orgânicos nos alimentos.

Segundo Pelczar et al. (1980), há um limite de tolerância por parte dos microrganismos, quanto à variação de pH do meio ambiente. Os meios de cultura da maioria das bactérias são ajustados a um pH aproximadamente igual a 7, que representa a neutralidade. Os bolores e as leveduras são favorecidos pelos ambientes ligeiramente ácidos, mas os desvios acentuados de pH resultam em cessação do metabolismo e morte. Para esses autores a ação microbicida dos ácidos minerais (ácido clorídrico e ácido sulfúrico, por exemplo) é função do grau de dissociação e, portanto, da concentração hidrogênica. Os ácidos orgânicos se comportam de maneira levemente diferente, pois nem toda a sua ação bactericida pode ser atribuída aos íons hidrogênio. Os ácidos orgânicos se ionizam em um grau relativamente baixo; segue-se que sua atividade bactericida deve ser atribuída à natureza de suas moléculas. As soluções de ácidos têm uma variedade de aplicações com finalidades antimicrobianas.

2.9 Bacteriocinas

Segundo Moreno et al. (2000), a atividade antimicrobiana das bactérias lácticas não é restrita aos principais produtos de sua função metabólica. Dependendo das condições de crescimento, essas bactérias produzem outros compostos, que também ocasionam o fenômeno da antibiose. Dentre esses compostos encontram-se os produtos formados no catabolismo celular (peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído, D-leucina), as enzimas bacteriolíticas, as bacteriocinas e outras substâncias como reuterina e antifúngicos. Outros sistemas antagônicos mais complexos, como competição por nutrientes, redução do potencial de oxiredução e coagregação de células também pode favorecer a inibição de microrganismos indesejáveis.

De acordo com Pelczar et al. (1980), as bacteriocinas constituem um grupo específico de substâncias bactericidas. Semelhantes aos antibióticos, as bacteriocinas são altamente específicas, tanto quanto à natureza do microrganismo produtor, como quanto à dos germes sobre os quais são letais. São produzidas por certas amostras de bactérias e atuam somente sobre microrganismos intimamente relacionados aos produtores. Em virtude de especificidade de sua atividade, as bacteriocinas podem ser utilizadas na tipificação de bactérias suscetíveis. Embora elas sejam letais sobre organismos pertencentes ao mesmo grupo (ou muito relacionados) dos germes produtores, estes são resistentes à sua ação bactericida. Esta ação sobre as bactérias-alvo causa a morte por degradação do DNA celular, inibindo a síntese do DNA ou do RNA, ou interferindo com a síntese protéica, ainda que, como regra geral, não resulte a lise das células.

As primeiras bacteriocinas descritas segundo Franco e Landgraf (1996), foram as colicinas, ativas contra *E. coli*, produzidas por determinadas cepas de *E. coli* e algumas enterobactérias. Atualmente são conhecidas muitas outras bacteriocinas produzidas principalmente por Gram-positivos, patogênicos ou não. O maior

interesse na área de alimentos é pelas bactérias lácticas e as respectivas bacteriocinas que produzem.

Para Moreno et al. (2000), as bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas formam um grupo heterogêneo de compostos protéicos, que foram divididos em três classes, de acordo com a estrutura química, peso molecular e estabilidade térmica: lantibióticos, peptídeos pequenos estáveis ao aquecimento e proteínas grandes instáveis ao aquecimento. Muitas bacteriocinas pertencentes aos primeiros dois grupos já foram estudadas, podendo ser utilizadas no controle de microrganismos indesejáveis. A nisina, por exemplo, é a uma bacteriocina confirmada como GRAS (Generally Recognized as Safe) e de uso liberado como aditivo alimentar pelo Comitê do Codex Alimentarius, da FAO, como agente antimicrobiano. No Brasil, é permitida para uso como conservador em todos os tipos de queijos, inclusive os processados, na dose máxima de 12,5 mg/kg (BRASIL 1996).

Santos et al. (1994) relatam que a estabilidade das bacteriocinas diminui à medida que aumenta sua purificação. A maioria das bacteriocinas são muito mais tolerantes aos pHs muito ácidos que aos alcalinos. Os critérios de termoestabilidade das bacteriocinas são difíceis de definir, pois dependem de sua purificação e de fatores tais como pH, força iônica e presença de moléculas protetoras.

Segundo Franco e Landgraf (1996), a nisina é uma bacteriocina produzida por *Lactobacillus lactis* spp. *lactis*. Seu uso em alimentos é autorizado pela United States Food and Drug Administration (FDA).

De acordo com Jay (1978), nisina foi o primeiro antibiótico cuja utilização foi permitida em alimentos. Em 1954 foi publicada a patente para seu emprego em queijos e produtos de panificação com o fim de evitar alteração por clostrídios.

Hurst (1980) classifica a nisina como um antibiótico originado por estirpes de bactérias que normalmente habitam o leite. É um polipeptídeo que se inativa facilmente. Apresenta um pequeno espectro antibacteriano, afetando somente as bactérias Gram-positivas. Posto que as bactérias Gram-negativas não são afetadas, o emprego da nisina como conservante de alimentos não pode contrariar a uma má

higiene, seu escasso espectro antimicrobiano e sua estabilidade ácida determinam condições de aplicações especiais.

Luchese et al. (1998) afirmam que, ao contrário dos antibióticos propriamente ditos, a nisina tem a vantagem de não induzir efeitos de resistência e não ser tóxico, pois qualquer resíduo remanescente no alimento é digerido.

2.10 Atividade antimicrobiana do quefir

De acordo com Forsythe (2002), as bactérias ácido-láticas produzem vários fatores antimicrobianos, incluindo ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio, bacteriocinas. Os ácidos orgânicos, tais como os ácidos láctico, acético e propiônico, interferem na força protomotiva e nos mecanismos de transporte ativo da membrana citoplasmática bacteriana. A produção do peróxido de hidrogênio deve-se à carência da enzima catalase nas bactérias ácido-láticas. O peróxido de hidrogênio pode causar oxidação da membrana, além de ativar o sistema de lactoperoxidase no leite fresco, causando a formação do antimicrobiano hipotiocianato. As bactérias ácido-láticas produzem quatro grupos de bacteriocinas. A bacteriocina melhor investigada é a nisina (bacteriocina da classe 1), a qual é um peptídeo modificado. A nisina é produzida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* e possui um vasto espectro inibitório contra bactérias Gram-positivas. É produzida (concentração de 2,5 a 100 ppm) em diversos produtos alimentícios, e é particularmente estável em alimentos ácidos.

Morgan et al. (2000) atribuem extenso interesse na identificação de substâncias antimicrobianas semelhantes as bacteriocinas, principalmente no presente momento, onde os consumidores são cada vez mais conscientizados sobre o uso de conservantes químicos. Por esta razão, existe a necessidade de detectar alimentos alternativos com graduações antimicrobianas para a preservação de outros alimentos perecíveis.

Garrote et al. (2000) tem demonstrado que em várias fontes de pesquisa, metabólitos produzidos por bactéria ácido láctica inibem o crescimento de bactérias

patogênicas e saprófitas. Esta atividade antagônica pode envolver diferentes mecanismos, semelhantes às competições por nutrientes livres e produção de metabólitos inibidores (peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos, diacetil e bacteriocinas). Em muitos casos, a combinação destes fatores pode ser responsável pela inibição. Brialy e Coworkers (appud Garrote et al. 2000, p.364) demonstraram a força inibidora intrínseca do quefir fresco para o *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, mas não houve inibição sobre *Saccharomyces cerevisiae* e *Cândida albicans*. *Lactococcus lactis* DPC 3147, a estirpe isolada dos grãos de quefir Irlandês, produz a bacteriocina com amplo espectro de inibição. Ryan et al. (appud Garrote et al. 2000, p. 364) demonstraram que amostras de bactérias gram positivas testadas foram sensíveis para a bacteriocina, mas *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* não foram inibidas.

Shama (1998), através de estudos “in vitro”, descreveu algumas características higiênico-sanitárias de seis amostras de quefir, como a pesquisa de coliformes totais e fecais, de enterococos, de mesófilos aeróbios, a acidez expressa em graus Dornic e o pH. Todas as amostras apresentaram, no início do experimento, coliformes totais expressos em números mais prováveis. Estes índices, porém reduziram-se à zero ao estender-se a fermentação das alíquotas de cada amostra nos diferentes experimentos, por um período de dez dias. Nenhuma das amostras utilizadas apresentou coliformes fecais e enterococos no momento da integração ou do encerramento do experimento, dez meses mais tarde. Entretanto as seis amostras de quefir foram contaminadas com *E. coli* (NCDC nº 25.922). Às vinte e quatro horas do processamento tradicional adotado, atingiu-se, em todas as amostras, 10^6 UFC/mL. Após dez dias houve redução para 10^4 UFC/mL em cinco das amostras, e para 10^5 UFC/mL na amostra restante, havendo evidências de descontaminação.

“Inibidores naturais como as bacteriocinas produzidas pelas bactérias ácido lácticas podem ter aplicações difundidas na prevenção de doenças. Em particular, lacticina 3147 e nisina demonstraram dado promissor nas quais elas inibem a maioria dos patógenos de mastites “in vitro” (MEANEY et al., 1997).

De acordo com Baird-Parker (1980) a atividade antimicrobiana de um ácido orgânico ou seu éster se deve as moléculas não dissociadas deste composto. Alguns ácidos orgânicos em seu estado não dissociado são muito solúveis nas membranas celulares. Estes compostos inibem o crescimento dos microrganismos ou os matam, segundo uma hipótese por interferir na permeabilidade da membrana celular ao produzir um desacoplamento no transporte de substratos e na fosforilização oxidativa do sistema transportador de elétrons, resultando em acidificação do conteúdo celular, que é provavelmente a principal causa da inibição ou morte dos microrganismos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção e preparo do quefir

Os grãos de quefir (figura 1 em anexo), foram colocados em um vidro previamente esterilizado, realimentado com 700 mL de leite UHT (Ultra High Temperature) tipo “longa vida”, desnatado. O vidro era coberto com pano de algodão fixado ao gargalo através de atílios de borracha, (figura 2 em anexo). Em seguida levado à estufa bacteriológica¹ para incubação a 37° C durante vinte e quatro horas. No dia seguinte era retirado da estufa e permanecia na bancada, em temperatura ambiente por mais cento e vinte horas para completar a fermentação bacteriana.

Após este período, o quefir era coado através de uma peneira plástica, previamente higienizada com água fervente, obtendo-se a separação dos grãos de quefir e o filtrado (figura 3 em anexo). Os grãos eram novamente colocados em vidro previamente esterilizado, realimentado com 700 mL de leite tipo longa vida desnatado. A boca do vidro era coberta com pano apropriado e o vidro colocado na estufa bacteriológica para incubação, conforme já citado. Esta rotina foi realizada semanalmente até a finalização do experimento.

Os grãos de quefir (aproximadamente 50 g), foram adquiridos no Mercado Público, localizado em Porto Alegre - RS.

3.2 Esterilização do filtrado de quefir

O filtrado de quefir foi esterilizado por três técnicas diferentes: a fervura convencional, que é a esterilização pelo calor a 100° C. O filtrado foi fervido por 15 minutos, de acordo com Avancini, (1995). A tindalização segundo Prescott (1962), foi realizada por cinco minutos, durante três dias consecutivos. O volume

¹MARCA DE LEO ®

evaporado era repostado com água destilada esterilizada. A terceira técnica utilizada foi a autoclave ², processo de esterilização realizado sob pressão em aparelhos apropriados, segundo Bier (1990). Estabeleceu-se a temperatura de 120° C e o tempo de 15 minutos.

Para realizar as repetições do experimento, optou-se pela esterilização obtida por autoclave.

Os testes foram realizados com o filtrado de quefir após o sexto dia de fermentação.

Este líquido esterilizado denominado de filtrado de quefir foi utilizado para realização dos testes de concentração inibitória mínima e de concentração bactericida mínima.

3.3 Preparo das concentrações dos filtrados

As concentrações foram preparadas no momento do teste. A quantidade de 5 mL do filtrado esterilizado de quefir era adicionado por meio de pipeta esterilizada, em 5 mL de BHI ³ duplo, tornando-o simples e a concentração do filtrado passava para 50 %.

Para a concentração de 40 %, era adicionado 4 mL do filtrado esterilizado de quefir e 1 mL de água destilada esterilizada em 5 mL de BHI duplo; para a concentração de 30 %, pipetava-se 3 mL do filtrado e 2 mL de água destilada esterilizada em 5 mL de BHI duplo, para a concentração de 20%, pipetava-se 2 mL do filtrado e 3 mL de água destilada esterilizada em 5 mL de BHI duplo; e, finalmente para a concentração de 10%, pipetava-se 1 mL do filtrado e 4 mL de água destilada esterilizada em 5 mL de BHI duplo.

² MARCA PHOENIX ® MODELO AV.75

³ BHI OXOID ® Código: CM225B LOTE 59510

3.4. Determinação da acidez dos filtrados de quefir

A acidez dos filtrados de quefir obtidos conforme o exposto acima, foi determinada em graus Dornic (°D) segundo técnica descrita nas **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz** (Brasil. Governo do Estado de São Paulo, 1985).

3.5 Determinação do potencial Hidrogênio (pH) dos filtrados de quefir

Através de peagâmetro ⁴ foi determinado o pH dos filtrados conforme técnica descrita nas **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz** (1985).

3.6 Preparo dos meios de cultura

Para a cultura dos inóculos bacterianos utilizou-se BHI normal na proporção recomendada pelo fabricante (37 g/L), distribuído na quantidade de 5 mL/ tubo de ensaio.

Para a concentração bactericida mínima utilizou-se o mesmo meio acima exposto, acrescido de desinibidores bacterianos recomendados por Reybrouck (1998), na concentração normal: Polisorbato/ Tween 80 ⁵ 3% (30 mL/L), Histidina ⁶ 0,1 % (1 g/L), Lecitina ⁷ 0,3 % (3 g/L).

Para a concentração inibitória mínima utilizou-se BHI em concentração dupla (74 g/L), acrescido ou não dos desinibidores bacterianos recomendados por Reybrouck (1998), também em dupla concentração, na respectiva linha de diluição; Polisorbato/ Tween 80 6% (60 mL/L), Histidina 0,2 % (2 g/L) , Lecitina 0,6 % (6 g/L). Em ambas as linhas de diluição o volume de meio de cultura era 5 mL/ tubo.

⁴ MARCA DIGIMED ® MODELO DMPH-2

⁵ TWEEN 80 SYNTH ® Código: T1.039

⁶ L- Histidina DFICO ® LOTE 22505

⁷ Lecitina Merck ® 5531 - LOTE 94376

E finalmente, para o controle do inóculo, utilizou-se meio de cultura sólido, Ágar Nutriente ⁸ conforme a recomendação do fabricante, distribuído em placas de Petri.

3.7 Preparo das culturas bacterianas

Para a realização da pesquisa foram utilizados microrganismos selecionados e padronizados. São inóculos bacterianos provenientes da Bacterioteca do Laboratório de Higiene e Microbiologia dos Alimentos – Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos – UFRGS, Porto Alegre - RS. Como bactérias Gram-positivas utilizaram-se *Staphylococcus aureus* ATCC⁹ 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC⁹ 19433. Como bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC⁹ 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC⁹ 11076. Cada microrganismo foi semeado em meio de cultura líquido, BHI (37 g/L), em câmara de fluxo laminar ¹⁰, a partir da cultura estoque (bacterioteca) mantida sob refrigeração no laboratório. Após agitação, com o auxílio do agitador de tubos ¹¹, os tubos foram incubados a 37° C, em condições aeróbias, nas 18-24 horas anteriores a cada teste, para a obtenção da “cultura-mãe”.

3.8 Preparo e controle do inóculo

A diluição logarítmica do inóculo bacteriano a ser utilizado na Técnica de Diluição Serial com Sistema de Tubos Múltiplos, obteve-se a partir da cultura-mãe, conforme descrito a seguir.

Com o auxílio de uma pipeta sorológica (1/100) retirou-se 1 mL da cultura-mãe, após agitação, e transferiu-a para um tubo contendo 9 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se assim uma solução bacteriana na diluição logarítmica 10⁻¹ UFC/mL, (corresponde a 10⁷ Unidades Formadoras de Colônias por mililitro).

⁸ ÁGAR NUTRIENTE OXOID ® Código: CM003B

⁹ American Type Culture Collection

¹⁰ MARCA TROX DO BRASIL ® MODELO FLV – SÉRIE 824

¹¹ MARCA FANEM ® MODELO 251

A partir desta, utilizando-se outra pipeta esterilizada, após agitação, foi retirado 1 mL e transferido para o tubo seguinte, contendo também 9 mL de água destilada esterilizada; obtendo-se então, uma outra solução bacteriana na diluição logarítmica 10^{-2} UFC/mL, (10^6 Unidades Formadoras de Colônias). Após algumas repetições chegou-se a diluição 10^{-8} UFC/mL, (10^0 , que corresponde a Uma Unidade Formadora de Colônia). Cada tubo foi identificado com a bactéria e a diluição logarítmica correspondente.

Para se ter o controle do inóculo, ou seja, saber quantas unidades formadoras de colônia existiam aproximadamente em cada tubo, era necessário semear em placas as duas últimas diluições 10^{-7} UFC/mL e 10^{-8} UFC/mL.

Retirou-se 1 mL de cada diluição (10^{-7} e 10^{-8}) e semeou-se em placas de Petri contendo ágar nutriente. Estas placas foram realizadas em triplicatas (uma para cada técnica de esterilização do filtrado). Após identificadas eram incubadas por 24 horas a 37° C, em condições aeróbias, para a quantificação conforme Cavalli-Sforza (1974).

3.9 Determinação da atividade antibacteriana

A verificação da atividade antibacteriana foi realizada através da determinação quantitativa da Concentração Inibidora Mínima (CIM) e da Concentração Bactericida Mínima (CBM), utilizando a Técnica de Diluição Serial com Sistema de Tubos Múltiplos (DVG, 1977; Rios et al., 1988). A técnica foi modificada por Avancini (1995), quando propôs que os desinfetantes fossem confrontados com diversas diluições logarítmicas dos inóculos.

3.9.1 Concentração Inibitória Mínima - Sistema de Tubos Múltiplos – Para cada bactéria a ser testada eram preparadas, em estantes duplas, duas linhas de oito tubos de ensaio contendo 5 mL de BHI com dupla concentração. Uma das linhas era preparada com um “pool” de : Polisorbato/ Tween 80 , Histidina , Lecitina , desinibidores bacterianos também em concentração dupla. Desta forma obteve-se

duas linhas de tubos com o mesmo volume de meio de cultura em concentração dupla, formando pares que diferiam entre si pela presença ou ausência dos desinibidores bacterianos.

Em todos os tubos foi adicionado 5 mL do “desinfetante a ser testado”, no caso, filtrado esterilizado de quefir (ou filtrado esterilizado de quefir + água destilada esterilizada, para obter a concentração final desejada).

Semanalmente era testada uma das concentrações dos filtrados de quefir (50%, 40%, 30%, 20% e 10%), obtidos com uma técnica de esterilização. Iniciou-se com a esterilização através da autoclave. Nas cinco semanas seguintes os testes eram repetidos, trocando apenas a técnica de esterilização do filtrado, para a tindalização e por último, nas outras cinco semanas, repetiu-se os testes utilizando o filtrado de quefir esterilizado por fervura.

Após o preparo das duas linhas, com e sem desinibidores, todos os tubos contendo 10 mL (5 mL de BHI + 5 mL do filtrado esterilizado de quefir, ou filtrado esterilizado de quefir + água destilada esterilizada) eram agitados através do agitador de tubos para homogeneização do conteúdo e, era então inoculado em cada um, o volume de 0,05 mL de cada uma das diferentes diluições logarítmicas da cultura bacteriana, em seu tubo de ensaio correspondente (um tubo para cada diluição do inóculo: 10^{-1} UFC/mL a 10^{-8} UFC/mL), totalizando dezesseis tubos para cada bactéria a ser testada. Estes tubos, após nova agitação, eram incubados em estufa à 37° C, na presença de oxigênio, por até seis dias (144 horas).

As leituras foram realizadas às 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas, através da turvação dos tubos, em contraste com o tubo transparente “controle” que continha apenas o meio líquido BHI com o filtrado esterilizado de quefir, na concentração testada.

Os testes realizados para controle eram além do tubo para a leitura, dois tubos contendo 5 mL de BHI em concentração dupla, com e sem desinibidores acrescidos de 5 mL de água destilada esterilizada, inoculados com 0,05 mL da diluição 10^{-8} UFC/mL da bactéria testada, devendo dar crescimento bacteriano.

Outro controle realizado era o plaqueamento dos tubos positivos para verificação de contaminações secundárias.

A CIM do filtrado de quefir correspondia à maior diluição logarítmica sem crescimento bacteriano na presença dos desinibidores que a menor concentração do filtrado de quefir atingiu.

3.9.2 Concentração Bactericida Mínima - Teste de suspensão

Como referência para esta pesquisa foi utilizado o teste de suspensão indicado pelo comitê europeu (*Comité European de Normalization - European Committee for the Standardization*, CEN/TC 216) que harmonizou os diferentes métodos e testes para avaliação de desinfetantes e antissépticos usados na higiene de alimentos, medicina, agricultura e veterinária (CEN, 1999).

Na avaliação da atividade desinfetante e antisséptica do filtrado esterilizado de quefir foram usadas as fases 1 e 2 do teste de suspensão proposto pelo CEN/TC 216 (CEN, 1999), quais sejam: fase 1. o teste de suspensão estabelecendo se a solução é bactericida; fase 2. o teste de suspensão estabelecendo se a solução tem atividade antibacteriana simulando condições práticas de uso.

As técnicas de suspensão seguiram as orientações de DVG (1977), Rios et al. (1988), Bloomfield e Looney (1992), Reybrouck (1998), Bessems (1998) e Avancini (1995) e constaram dos seguintes testes:

Teste de suspensão simples em linha de diluição para avaliação do tempo de atuação de desinfetantes e antissépticos (DVG, 1977, Avancini, 1995) – Foram preparados sobre bancada microbiológica, estante com 32 tubos de ensaio contendo meio líquido BHI com desinibidores bacterianos, em concentração normal, para cada bactéria a ser testada. Semanalmente era realizado o teste para uma única bactéria, com as devidas repetições.

Os tubos foram identificados da seguinte forma: quatro fileiras de oito tubos com as respectivas diluições logarítmicas, sendo a primeira fileira identificada com o nº 5, a segunda com o nº 15, a terceira com o nº 30 e a quarta com o nº 60, referentes ao

tempo de atuação do filtrado de quefir frente a diluição logarítmica da bactéria testada.

Baseado nos resultados apresentados da Concentração Inibitória Mínima, estabeleceu-se a concentração do filtrado de quefir a 75% para determinar a Concentração Bactericida Mínima.

Foram preparados oito tubos de ensaio contendo 5 mL de filtrado de quefir a 75% esterilizados por autoclave, para cada bactéria a ser testada. Cada tubo foi identificado com a diluição logarítmica de 10^{-1} a 10^{-8} . Em seguida foi inoculado através de pipeta sorológica esterilizada, 0,05 mL de cada diluição da bactéria (preparada a partir da cultura mãe, como na análise anterior). Exatamente 5, 15, 30 e 60 minutos após, retirou-se o inóculo com uma alça de Henle (5 mm de diâmetro) de cada diluição e semeou-se no meio líquido BHI² com desinibidor, em cada tubo com sua diluição logarítmica correspondente. Em seguida foram levados para incubar na estufa bacteriológica à 37 ° C na presença de oxigênio, até o sexto dia (144 horas).

As leituras foram realizadas às 24, 48, 72, e 144 horas, através da turvação dos tubos, em contraste com o tubo transparente “controle” que continha apenas o meio líquido BHI.

Os testes controle eram: verificação de crescimento nos quatro tempos de atuação através do controle preparado com 5 mL de água destilada esterilizada inoculada com uma alça de Henle da diluição 10^{-8} UFC/mL da bactéria testada.

Plaqueamento dos tubos positivos para verificação de contaminações secundárias. Os tubos negativos eram inoculados a partir do sexto dia, com uma alça, a bactéria em teste cultivada em meio BHI. Em 24 horas era verificado crescimento (turvação).

3.9.3 Concentração Bactericida Mínima - Teste de suspensão simulando condições práticas de uso:

I. Teste de suspensão incluindo fator suporte (pano de algodão) – Foram utilizados como suporte, panos de algodão medindo 1,0 cm X 1,0 cm, esterilizados em placas de Petri através da autoclave.

O teste era realizado de forma semelhante ao anterior, porém com as seguintes modificações: utilizou-se só as diluições logarítmicas do inóculo de 10^{-5} a 10^{-8} UFC/mL. Os tempos de atuação do desinfetante passaram para 15, 30, 60 e 120 minutos.

As diluições logarítmicas do inóculo de 10^{-5} a 10^{-8} UFC/mL eram vertidas em placas de Petri esterilizadas, onde recebiam com auxílio de uma pinça pré-flambada, quatro suportes por placa; totalizando dezesseis suportes. Estes suportes ficavam vinte segundos expostos, sendo colocados no sentido horário e virados uma vez. Após eram retirados na mesma ordem e colocados para secar em placas de Petri (quatro suportes por placa) forradas com papel filtro previamente esterilizadas, com a tampa da placa semi aberta para a troca de ar. Os suportes permaneciam secando por 30 minutos.

Depois deste período os suportes eram colocados em placas de Petri contendo filtrado de quefir esterilizado na concentração de 75%, (novamente quatro por placa). Ali permaneciam mergulhados por dois minutos, sendo retirados na mesma ordem de entrada (sentido horário) e colocados em outra placa forrada com papel filtro, para continuidade da ação desinfetante.

Finalmente, após 15, 30, 60 e 120 minutos cada suporte era transferido com a pinça pré-flambada para o respectivo tubo contendo meio BHI com o desinibidor bacteriano, previamente identificado; (quatro suportes da diluição 10^{-5} nos quatro tempos, quatro suportes da diluição 10^{-6} nos quatro tempos, assim por diante até a diluição 10^{-8} UFC/mL.

Os tubos eram incubados em estufa à 37° C, com as leituras realizadas em 24, 48, 72 e 144 horas. Os testes controles eram realizados idênticos ao teste de suspensão simples.

II. Teste de suspensão incluindo fator suporte (aço inoxidável) – Foram utilizados como suporte, placas de aço inoxidável medindo 1,0 cm X 1,0 cm, esterilizados em

placas de Petri através da autoclave. As modificações e os procedimentos idênticos ao teste anterior.

III. Teste de suspensão incluindo fator matéria orgânica albumina sérica bovina¹² (DVG, 1977; Avancini 1995)

A técnica utilizada foi a mesma para o teste de suspensão simples, com a diferença de que na água destilada esterilizada utilizada para obter a concentração de 75% do filtrado de quefir, foi acrescentado albumina sérica bovina, para que a concentração final ficasse em 6%.

Aqui as modificações foram: trabalhou-se somente com duas bactérias (uma Gram positiva e uma Gram negativa), nas diluições logarítmicas 10^{-6} a 10^{-8} UFC/mL. Os tempos de atuação do desinfetante: 15, 30, 60 e 120 minutos; sem a presença de suportes, porém com a presença de matéria orgânica no filtrado esterilizado de quefir.

¹² Albumina sérica bovina ® - Diamed

3. 10 Análise estatística

A Análise Estatística dos resultados foi assessorada pelo Médico Veterinário Ydérzio Luiz Vianna Filho ¹⁵.

Ao nível de significância de 5 %, foram observados os desempenhos das diferentes concentrações dos filtrados de quefir (50%, 40%, 30%, 20%), esterilizados por três métodos diferentes (autoclave, tindalização e fervura), frente às diferentes bactérias (duas Gram-positivas e duas Gram-negativas), nas diferentes diluições logarítmicas (10^{-1} a 10^{-8}), tanto na presença quanto na ausência dos desinfetantes bacterianos. Foi considerado como tempo de observação a primeira e a última leitura (24 e 144 horas).

Foram utilizados: Análise de Variância R.A. Fischer para comparação de amostras independentes e o Teste t de Student para amostras dependentes.

¹⁵ Ministério da Agricultura – Controle de Vacinas contra Febre Aftosa (1975-1998)

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da acidez dos filtrados de quefir

A acidez Expressa em graus Dornic, dos filtrados de quefir em estudo com 24 horas e com 144 horas de fermentação apresentaram os seguintes resultados (média de três repetições realizadas em semanas diferentes) :

24 Horas : 50,0 ° Dornic

144 Horas: 143,2 ° Dornic

4.2 Determinação do potencial Hidrogênio (pH) dos filtrados de quefir

O pH dos filtrados de quefir em estudo com 24 horas e 144 horas de fermentação apresentaram os seguintes resultados (média de dez repetições realizadas em semanas diferentes) :

24 Horas: pH = 4,1

144 Horas : pH = 3,9

4.3 Determinação da atividade antibacteriana

Os resultados obtidos da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima encontram-se apresentados nos quadros numerados de 1 a 25.

A Análise Estatística encontra-se nas tabelas numeradas de 1 a 06.

Quadro 1- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>		Concentração do quefir: 50%																									
com desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano

+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 35,19, 24

10⁻⁸ = 3, 4, 3

\bar{X} = 26,66 x 10⁷ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia por mililitro), da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 2- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>		Concentração do quefir: 40%																							
com desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sem desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 13,18, 44

10⁻⁸ = 1, 4, 3

\bar{X} = 25,15 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 3- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>		Concentração do quefir: 30%																							
com desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24		-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24		-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 26, 37, 12
10⁻⁸ = 1, 0, 2

\bar{X} = 23,63 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 4- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Staphylococcus aureus</i>		Concentração do quefir: 20%																									
com desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
sem desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano

+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado 10^{-7} = 18, 23, 32

(Cavalli-Sforza, 1974)

10^{-8} = 0,1,1

\bar{X} = 22,72 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 5- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em *Enterococcus faecalis* ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Enterococcus faecalis</i>										Concentração do quefir: 50%														
com desinibidores bacterianos																								
Diluições do inóculo																								
	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
Horas	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
72	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
96	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
120	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
144	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
sem desinibidores bacterianos																								
Diluições do inóculo																								
	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
Horas	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 21, 35, 46
10⁻⁸ = 2, 1, 0

$\bar{X} = 31,81 \times 10^7$ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 6- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em *Enterococcus faecalis* ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Enterococcus faecalis</i>		Concentração do quefir: 40%																							
com desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sem desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 31, 25, 29

10⁻⁸ = 1, 0, 1

\bar{X} = 26,36 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 7- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em *Enterococcus faecalis* ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Enterococcus faecalis</i>		Concentração do quefir: 30%																							
com desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sem desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 13, 48, 25
10⁻⁸ = 2, 1, 0

\bar{X} = 26,96 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:
A: Autoclave (120° C / 15 minutos)
T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)
F: Fervura por 15 minutos

Quadro 8- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em *Enterococcus faecalis* ATCC 19.433 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Enterococcus faecalis</i>		Concentração do quefir: 20%																							
com desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
sem desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸			
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	
24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	
48	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
72	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
96	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	
144	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado $10^{-7} = 31,43,28$
(Cavalli-Sforza, 1974) $10^{-8} = 0,0,2$

Três diferentes técnicas de esterilização:
A: Autoclave (120° C / 15 minutos)
T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)
F: Fervura por 15 minutos

$X = 31,51 \times 10^7$ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Quadro 9- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Escherichia coli</i>		Concentração do quefir: 50%																						
com desinibidores bacterianos																								
Diluições do inóculo																								
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																								
Diluições do inóculo																								
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

$$10^{-7} = 108, 145, 132$$

$$10^{-8} = 12, 11, 10$$

$$\bar{X} = 126,66 \times 10^7 \text{ UFC/mL}$$

da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 10- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Escherichia coli</i>		Concentração do quefir: 40%																										
com desinibidores bacterianos																												
Diluições do inóculo																												
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																												
Diluições do inóculo																												
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 137, 110, 95

10⁻⁸ = 10, 20, 18

\bar{X} = 118,18 × 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 11- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Escherichia coli</i>		Concentração do quefir: 30%																									
com desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 103, 121, 150

10⁻⁸ = 10, 11, 11

\bar{X} = 123,0 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 12- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Escherichia coli</i>		Concentração do quefir: 20%																									
com desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
		10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}			10^{-8}				
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F		
24		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
		10^{-1}			10^{-2}			10^{-3}			10^{-4}			10^{-5}			10^{-6}			10^{-7}			10^{-8}				
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F		
24		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado 10^{-7} = 110, 165, 96
(Cavalli-Sforza, 1974) 10^{-8} = 25, 10, 12

\bar{X} = $126,66 \times 10^7$ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 13- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 50%, em *Salmonella enteritidis* ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Salmonella enteritidis</i>		Concentração do quefir: 50%																						
com desinibidores bacterianos																								
Diluições do inóculo																								
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
sem desinibidores bacterianos																								
Diluições do inóculo																								
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 19, 53, 44

10⁻⁸ = 1, 0, 2

\bar{X} = 36,0 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 14- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 40%, em *Salmonella enteritidis* ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Salmonella enteritidis</i>		Concentração do quefir: 40%																							
com desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																									
Diluições do inóculo																									
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸		
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F
24		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
48		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
72		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
96		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
120		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
144		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado $10^{-7} = 51, 26, 42$
(Cavalli-Sforza, 1974) $10^{-8} = 1, 0, 0$

$\bar{X} = 36,36 \times 10^7$ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três repetições em diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 15- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 30%, em *Salmonella enteritidis* ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Salmonella enteritidis</i>		Concentração do quefir: 30%																									
com desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sem desinibidores bacterianos																											
Diluições do inóculo																											
Horas	10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10⁻⁷ = 33, 25, 39
10⁻⁸ = 1, 0, 2

\bar{X} = 30,30 x 10⁷ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

A: Autoclave (120° C / 15 minutos)

T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)

F: Fervura por 15 minutos

Quadro 16- Resultados do teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima) de quefir a 20%, em *Salmonella enteritidis* ATCC 11.076 na presença e na ausência de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

Bactéria: <i>Salmonella enteritidis</i>		Concentração do quefir: 20%																										
com desinibidores bacterianos																												
Diluições do inóculo																												
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
72		+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
96		+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
120		+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
144		+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
sem desinibidores bacterianos																												
Diluições do inóculo																												
		10 ⁻¹			10 ⁻²			10 ⁻³			10 ⁻⁴			10 ⁻⁵			10 ⁻⁶			10 ⁻⁷			10 ⁻⁸					
Horas		A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F	A	T	F			
24		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
48		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
96		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144		-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado 10⁻⁷ = 29, 38, 46
(Cavalli-Sforza, 1974) 10⁻⁸ = 2, 0, 1

$\bar{X} = 35,15 \times 10^7$ UFC/mL
da cultura mãe, não diluída

Três diferentes técnicas de esterilização:

- A: Autoclave (120° C / 15 minutos)
T: Tindalização (3 dias = 5 minutos/dia)
F: Fervura por 15 minutos

Quadro 17- Resultados do teste de **CBM** (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 na presença de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

DILUIÇÃO DO INÓCULO									
	LEITURA	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10	-7 10	-8 10
5 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	+
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
60 MIN	24 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

$$10^{-7} = 22, 34, 17$$

$$10^{-8} = 1, 2, 1$$

$\bar{X} = 23,33 \times 10^7$ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia por mililitro)
da cultura mãe, não diluída

Quadro 18- Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Enterococcus faecalis* ATCC 19.433 na presença de desinfetantes bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

DILUIÇÃO DO INÓCULO									
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10	-7 10	-8 10
5 MIN	24 h	+	+	+	+	+	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-
15 MIN	24 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	-	-	-	-
30 MIN	24 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	-	-	-	-
60 MIN	24 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	-	-	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

$$10^{-7} = 27, 56, 18$$

$$10^{-8} = 0, 2, 1$$

$$\bar{X} = 31,51 \times 10^7 \text{ UFC/mL da cultura mãe, não diluída}$$

Quadro 19- Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença de desinfetantes bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

DILUIÇÃO DO INÓCULO									
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	- 1 10	- 2 10	- 3 10	- 4 10	- 5 10	- 6 10	- 7 10	- 8 10
5 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
60 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10^{-7} = 114, 118, 136

10^{-8} = 10, 10, 11

\bar{X} = $120,9 \times 10^7$ UFC/mL da cultura mãe, não diluída

Quadro 20- Resultados do teste de **CBM** (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Salmonella enteritidis* ATCC 11.076 na presença de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

DILUIÇÃO DO INÓCULO									
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	-1 10	-2 10	-3 10	-4 10	-5 10	-6 10	-7 10	-8 10
5 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-
60 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

$$10^{-7} = 42, 34, 27$$

$$10^{-8} = 0, 1, 1$$

$$\bar{X} = 31,81 \times 10^7 \text{ UFC/mL da cultura mãe, não diluída}$$

Quadro 21- Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

		DILUIÇÃO DO INÓCULO							
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	-5	-6	-7	-8	-5	-6	-7	-8
		10	10	10	10	10	10	10	10
		PANO				AÇO			
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	-
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-
60 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-
120 MIN	24 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	-	-	-	-

SUPORTES : PANO DE ALGODÃO / AÇO INOXIDÁVEL

Convenção: + = Crescimento bacteriano com suporte
- = Não houve crescimento bacteriano com suporte

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10^{-7} = 24, 33, 27

10^{-8} = 0, 1, 1

\bar{X} = $26,06 \times 10^7$ UFC/mL da cultura mãe, não diluída

Quadro 22- Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Enterococcus faecalis* ATCC 19.433 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinfetantes bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

		DILUIÇÃO DO INÓCULO							
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	- 5	- 6	- 7	- 8	- 5	- 6	- 7	- 8
		10	10	10	10	10	10	10	10
		PANO				AÇO			
15 MIN	24 h	+	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	+	-	-	-	+	-	-	-
	72 h	+	-	-	-	+	-	-	-
	144 h	+	-	-	-	+	-	-	-
30 MIN	24 h	+	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	+	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	+	-	-	-	+	-	-	-
	144 h	+	-	-	-	+	-	-	-
60 MIN	24 h	+	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	+	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	+	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	+	-	-	-	-	-	-	-
120 MIN	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-	-

SUPORTES : PANO DE ALGODÃO / AÇO INOXIDÁVEL

Convenção: + = Crescimento bacteriano com suporte
- = Não houve crescimento bacteriano com suporte

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

$$10^{-7} = 41, 16, 38$$

$$10^{-8} = 2, 0, 1$$

$$\bar{X} = 29,69 \times 10^7 \text{ UFC/mL da cultura mãe, não diluída}$$

Quadro 23- Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

		DILUIÇÃO DO INÓCULO							
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	-5	-6	-7	-8	-5	-6	-7	-8
		10	10	10	10	10	10	10	10
		PANO				AÇO			
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	+
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	+
60 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	+
120 MIN	24 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	48 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	72 h	+	+	+	+	-	-	-	-
	144 h	+	+	+	+	-	-	-	-

SUPORTES: PANO DE ALGODÃO / AÇO INOXIDÁVEL

Convenção: + = Crescimento bacteriano com suporte
- = Não houve crescimento bacteriano com suporte

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

10^{-7} = 110, 125, 127

10^{-8} = 12, 10, 10

\bar{X} = $119,39 \times 10^7$ UFC/mL da cultura mãe, não diluída

Quadro 24- Resultados do teste de CBM (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Salmonella enteritidis* ATCC 11.076 na presença de suportes (pano de algodão e aço inoxidável) e de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI.

		DILUIÇÃO DO INÓCULO							
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	LEITURA	-5	-6	-7	-8	-5	-6	-7	-8
		10	10	10	10	10	10	10	10
		PANO				AÇO			
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+	+	+
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	+	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	+	+	+	-	-
60 MIN	24 h	+	+	+	-	+	+	-	-
	48 h	+	+	+	-	+	+	-	-
	72 h	+	+	+	-	+	+	-	-
	144 h	+	+	+	-	+	+	-	-
120 MIN	24 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 h	-	-	-	-	-	-	-	-
	144 h	-	-	-	-	-	-	-	-

SUPORTES: PANO DE ALGODÃO / AÇO INOXIDÁVEL

Convenção: + = Crescimento bacteriano com suporte
- = Não houve crescimento bacteriano com suporte

Contagem do inóculo bacteriano utilizado
(Cavalli-Sforza, 1974)

$$10^{-7} = 38, 36, 43$$

$$10^{-8} = 1, 0, 1$$

$\bar{X} = 36,06 \times 10^7$ UFC/mL da cultura mãe, não diluída

Quadro 25 - Resultados dos testes de **CBM** (Concentração Bactericida Mínima) de quefir a 75%, em *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 e em *Escherichia coli* ATCC 11.229 na presença de desinibidores bacterianos (Tween 80 3%, Histidina 0,1% e Lecitina 0,3%) em meio BHI e na presença de matéria orgânica (albumina sérica bovina).

BACTÉRIAS		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Escherichia coli</i>		
TEMPO DE EXPOSIÇÃO	DILUIÇÃO DO INÓCULO	-6	-7	-8	-6	-7	-8
	LEITURA	10	10	10	10	10	10
15 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+
30 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+
60 MIN	24 h	+	+	+	+	+	+
	48 h	+	+	+	+	+	+
	72 h	+	+	+	+	+	+
	144 h	+	+	+	+	+	+
120 MIN	24 h	+	-	-	+	+	-
	48 h	+	-	-	+	+	-
	72 h	+	-	-	+	+	-
	144 h	+	-	-	+	+	-

Convenção: - = Não houve crescimento bacteriano
+ = Crescimento bacteriano

Contagens dos inóculos bacterianos utilizados
(Cavalli-Sforza, 1974)

Staphylococcus aureus

$$10^{-7} = 24, 33, 27$$

$$10^{-8} = 0, 1, 1$$

$$\bar{X} = 26,06 \times 10^7 \text{ UFC/mL da cultura mãe, não diluída}$$

Escherichia coli

$$10^{-7} = 110, 125, 127$$

$$10^{-8} = 12, 10, 10$$

$$\bar{X} = 119,39 \times 10^7 \text{ UFC/mL da cultura mãe, não diluída}$$

Tabela 01- Análise de variância entre as concentrações de quefir A1 (50%), A2 (40%), A3 (30%) e A4 (20%) e três diferentes métodos de esterilização: E1 (autoclave), E2 (tindalização) e E3 (fervura). Leitura 24 horas.

FONTES DE VARIACÃO	SOMA DE QUADRADOS SQ	GRAUS DE LIBERDADES GL	QUADRADO MÉDIO QM	F
CONCENTRAÇÃO (A)	1699,43	3	566,48	59,50**
ESTERILIZAÇÃO (E)	49,30	2	24,65	2,59 (NS)
ERRO	57,13	6	9,52	
TOTAL	1805,86	11		

NS = Não Significativo

** = Muito Significativo ($p = 0,99$)

Tabela 2- Análise de variância entre as bactérias C1 (*S. aureus*), C2 (*E. faecalis*), C3 (*E. coli*) e C4 (*S. enteritidis*) e três diferentes métodos de esterilização: E1 (autoclave), E2 (tindalização) e E3 (fervura). Leitura 24 horas.

FONTES DE VARIACÃO	SOMA DE QUADRADOS SQ	GRAUS DE LIBERDADES GL	QUADRADO MÉDIO QM	F
BACTÉRIAS (C)	1650,17	3	550,06	12,66**
ESTERILIZAÇÃO (E)	49,30	2	24,65	0,57 (NS)
ERRO	260,87	6	43,48	
TOTAL	1960,34	11		

NS = Não Significativo

** = Muito Significativo ($p = 0,99$)

Tabela 03- Análise de variância – CIM das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Leitura 24 horas. Concentrações de quefir A1 (50%), A2 (40%), A3 (30%) e A4 (20%). Desinibidor (presente/ausente). Repetições (autoclave, tindalização e fervura).

FONTES DE VARIÇÃO	SOMA DE QUADRADOS SQ	GRAUS DE LIBERDADES GL	QUADRADO MÉDIO QM	F
CONCENTRAÇÃO (A)	424,86	3	142,95	57,41**
DESINIBIDOR (B)	56,33	1	53,33	22,6 **
GRAM (G)	373,53	1	373,53	150,01**
INTERAÇÕES				
A X B	1,50	3	0,50	0,20 (NS)
A X G	71,22	3	23,74	9,53 **
B X G	30,08	1	30,08	12,08 **
A X B X G	9,08	3	3,03	1,22 (NS)
TRATAMENTOS	966,60	15	64,44	25,88 **
ERRO	79,68	32	2,49	
TOTAL	1046,28	47		

NS = Não Significativo

* = Significativo (p = 0,95)

** = Muito Significativo (p = 0,99)

DMS (DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA)
DMS 0,05 = 1,31 DMS 0,01 = 1,80

		MÉDIAS		
MÉDIAS		A1 (50%)	A2 (40%)	A3 (30%)
		16,15	15,42	14,98
A2	15,42	0,73 (NS)		
A3	14,98	1,17 (NS)	0,44 (NS)	
A4 (20%)	8,72	7,43 **	6,70 **	6,26 **

DESINIBIDOR (B)**MÉDIAS**

B1 - PRESENTE = 12,73

B2 - AUSENTE = 14,90

DIFERENÇA = 2,17

GRAM (G)**MÉDIAS**

GRAM-POSITIVO = 11,03

GRAM-NEGATIVO = 16,61

DIFERENÇA = 5,58

Tabela 04 – CBM do quefir (75%) com quatro tempos de exposição (T1 = 5 min), (T2 = 15 min), (T3 = 30 min) e (T4 = 60 min).

BLOCOS	T1	T2	T3	T4
1	0,00	1,39	2,39	3,39
2	0,00	1,39	1,39	3,39
3	2,09	2,09	2,09	2,09
4	2,09	2,09	2,09	2,09
5	3,51	4,51	4,51	4,51
6	2,51	4,51	4,51	4,51
7	1,52	1,52	2,52	2,52
8	1,52	1,52	2,52	2,52

ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FONTES DE VARIACÃO	SOMA DE QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADES GL	QUADRADO MÉDIO QM	F
TEMPO (T)	9,47	3	3,16	7,90 **
BLOCOS	30,34	7	4,33	10,83 **
ERRO	8,41	21	0,40	
TOTAL	48,22	31		

NS = Não Significativo

** = Muito Significativo (p = 0,99)

DIFERENÇA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (DMS)

DMS 0,01 = 0,91

DMS 0,05 = 0,67

MÉDIAS DOS TEMPOS

T1 = (5 MIN) = 1,66

T2 = (15 MIN) = 2,38

T3 (30 MIN) = 2,75

T4 (60 MIN) = 3,13

NS = Não Significativo

* = Significativo (p = 0,95)

** = Muito Significativo (p = 0,99)

	T4 3,13	T3 2,75	T2 2,38
T3 2,75	0,38 (NS)	–	
T2 2,38	0,75 *	0,37 (NS)	–
T1 1,66	4,79 **	1,09 **	0,72 *

Tabela 05 – Teste t de Student – Comparação entre as leituras de 24 e 144 horas – CIM das bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* e *S.enteritidis*. Concentração de quefir 50%, 40%, 30% e 20%. Desinibidor presente/ausente. Com 32 tratamentos.

	LEITURAS	HORAS	DIFERENÇA (1 - 2)
	24 (1)	144 (2)	d
SOMA DOS TRATAMENTOS	633,18	642,14	
MÉDIA	20,72	21,04	
SOMA DAS DIFERENÇAS			21,04
MÉDIA DAS DIFERENÇAS			0,66
t CALCULADO			0,66 (NS)
t TABELADO (0,05-31 GL)			2,04

NS = Não Significativo

Tabela 06 – Teste t de Student – Comparação entre as leituras de 24 e 144 horas – CBM das bactérias *S. aureus*, *E. faecalis*, *E.coli* e *S.enteritidis*. Concentração de quefir 75%, quatro tempos de exposição (5, 15, 30 e 60 minutos). Com 16 tratamentos.

	LEITURAS	HORAS	DIFERENÇA (1 - 2)
	24 (1)	144 (2)	d
SOMA DOS TRATAMENTOS	40,65	38,65	
MÉDIA	2,54	2,42	
SOMA DAS DIFERENÇAS			2,00
MÉDIA DAS DIFERENÇAS			0,13
t CALCULADO			0,10 (NS)
t TABELADO (0,05-15 GL)			2,13

NS = Não Significativo

5 DISCUSSÃO

A concentração de 100% do filtrado esterilizado de quefir apresentou total atividade antibacteriana frente aos inóculos selecionados. Houve diferença muito significativa quanto à atividade antibacteriana entre as demais concentrações do filtrado de quefir estudadas (50%, 40%, 30% e 20%).

Os resultados obtidos da acidez expressada tanto em graus Dornic quanto do pH dos filtrados de quefir muito se aproximam dos resultados encontrados por Shama (1998), quando analisou amostras de quefir tradicional.

Jay (1978), afirma que a acidez titulável é de maior valor que o pH para determinar a quantidade de ácidos orgânicos nos alimentos. Isto porque segundo o autor, o pH mede somente a concentração de íons de hidrogênio e os ácidos orgânicos não se ionizam completamente. Para medir a acidez titulável se determina a quantidade de ácido que é capaz de reagir com uma quantidade conhecida de base. A acidez titulável de produtos como o kefir, sauerkraut, indica melhor que o pH a quantidade de ácido presente.

Durante os testes piloto, verificou-se que o filtrado de quefir puro, com pH 3,9 inativava todas as quatro bactérias testadas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC 11076, nas diluições logarítmicas 10^{-1} e 10^{-2} .

Havia uma forte evidência de que o pH muito ácido fosse responsável pelo efeito bactericida. Entretanto, quando se elevou o pH para 5,03 com a adição de algumas gotas de hidróxido de sódio, o resultado foi idêntico. Na semana seguinte elevou-se o pH para 6,2 e o resultado se repetiu. Na terceira semana quando o pH foi elevado para 7,05 ocorreu crescimento bacteriano nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} das quatro bactérias testadas. Franco e Landgraf (1996) lembram que a maioria dos alimentos apresenta alterações sensoriais detectáveis quando se encontra números superiores a 10^6 UFC/g do alimento.

Moreno et al. (2000) comentam que normalmente as bacteriocinas de bactérias lácticas não apresentam atividade contra microrganismos Gram-negativos nem contra bolores e leveduras, característica evidenciada por outros pesquisadores. Porém alguns estudos sobre a efetividade da nisina contra determinadas linhagens de Gram-negativos vêm sendo realizados. Essa sensibilidade, entretanto, é relacionada às alterações de composição química da parede celular desses microrganismos ocasionados por mutações ou por tratamento com agentes químicos ou físicos.

Na avaliação da Concentração Inibitória Mínima, as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella enteritidis* ATCC 11076 demonstraram ser mais sensíveis do que as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 (bacteriostasia). Porém, na Concentração Bactericida Mínima (bactericidia) ocorreu o inverso, as Gram-negativas demonstraram ser mais resistentes do que as Gram-positivas.

Os *Staphylococcus* pertencem ao grupo das bactérias que são destruídas com bastante facilidade pelos desinfetantes químicos. As *Salmonellas* são mais difíceis de matar por meio de produtos químicos (HOBBS e GILBERT, 1978). De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, *Staphylococcus aureus* foi a bactéria que demonstrou certa resistência para a inibição (bacteriostasia); porém aos sessenta minutos exposto ao quefir (75%), a inativação (bactericidia) ocorreu em 100 UFC/mL. Enquanto que a *Salmonella* demonstrou sensibilidade a inibição, mas nas mesmas condições, ou seja, aos sessenta minutos exposto ao quefir (75%), a inativação ocorreu em somente 10 UFC/mL, concordando com o autor acima.

Para Lewis, (1980) a atividade antimicrobiana depende das condições de uso, como concentração, tempo de exposição, temperatura, pH, dureza da água, classe e quantidade de matéria orgânica presente, características da superfície e tipos e quantidades de microrganismos a destruir. Estes fatores não somente interferem

na eficácia do desinfetante, como também na velocidade que estas soluções exercem sua atividade, determinando com que frequência é necessário repetir a operação de desinfecção.

De igual importância para a seleção de um determinado ácido orgânico para controle dos microrganismos em alimentos, Baird-Parker (1980) destaca que a solubilidade, estabilidade e compatibilidade com as propriedades sensoriais devem ser consideradas, assim como as condições microambientais e de armazenamento do alimento. Posteriormente também devem considerar-se na seleção do ácido orgânico sob o ponto de vista das autoridades sanitárias.

Os testes realizados com suporte (pano de algodão e aço inoxidável) demonstraram diferença muito significativa entre eles, comprovando mais uma vez o porquê da obrigatoriedade de equipamentos de aço inoxidável nas indústrias de alimentos e estabelecimentos com inspeção sanitária de produtos de origem animal, segundo o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1997).

Andrade e Macêdo (1996) reforçam que os benefícios originados pela limpeza e desinfecção se anulam pela atuação de manipuladores com precários hábitos higiênicos ao longo do processo de fabricação ou distribuição de alimentos. A higiene pessoal e a saúde dos trabalhadores são fatores importantes, que reduzem o nível de microrganismos nos alimentos e que, portanto, também devem ser considerados.

“A eficácia dos desinfetantes diminui quando tem que competir com matérias orgânicas” (BOARD, 1988). Os resultados com a presença de matéria orgânica (6% de albumina sérica bovina) simulando sujidades, demonstraram que a eficácia do filtrado de quefir foi comprometida. Porém é importante ressaltar que o próprio filtrado de quefir contém proteínas desnaturadas do leite que agiram como matéria orgânica durante todo o experimento.

Outro fator determinante para a atividade antibacteriana do filtrado de quefir é o seu tempo de atuação. O efeito bactericida aumenta à medida que aumenta o tempo de exposição do filtrado de quefir frente ao inóculo bacteriano testado.

Nas primeiras vinte e quatro horas houve diferença muito significativa no desempenho do filtrado de quefir entre as linhas com e sem desinibidores bacterianos. Eis a importância do uso de desinibidores na técnica para evitar interpretações errôneas no estudo da preditividade, resultados “falsos-negativos” neste caso, evitar uma leitura de morte bacteriana, quando na verdade o que ocorreu foi inibição bacteriana.

Estes resultados despertam o interesse em prosseguir a avaliação de desinfetantes biológicos a serem usados na agroindústria, na saúde e na produção animal, visando à desinfecção como um controle direcionado aos microrganismos indesejáveis em situações problemas específicos, dificultando a transmissão ou a redução da dose infectante.

É possível utilizar o filtrado de quefir esterilizado de diferentes formas, desde a simples fervura até técnicas mais sofisticadas como a autoclave, para desinfetar agroindústrias. Estes processos, entretanto não pretendem substituir os padrões mínimos de higiene e boas práticas em alimentos. A sua utilização, assim como a de outros desinfetantes convencionais, de forma indiscriminada, pode mascarar falhas na higienização, comprometendo sua eficácia na desinfecção final, constituindo-se em um risco para a saúde dos expostos ao risco.

Os presentes resultados, no que tangem às questões de interpretações de análises bacteriológicas de alimentos e sua preditividade, pretendem sugerir, outrossim, uma retomada dos parâmetros e critérios estabelecidos, principalmente no que se refere à garantia da ausência de determinados agentes em alíquotas pré-determinadas.

6 CONCLUSÕES

Existe ação antibacteriana do filtrado esterilizado de quefir, portanto poderá ser utilizado como antisséptico/desinfetante em agroindústrias.

A concentração Inibitória Mínima determinada foi 50%.

A concentração Bactericida Mínima determinada foi 75%.

As três técnicas de esterilização do filtrado de quefir foram eficazes.

O filtrado de quefir apresentou maior atividade bactericida frente aos inóculos padronizados quando o tempo de exposição foi 120 minutos.

Os suportes interferem na ação antibacteriana do filtrado de quefir. Sobre o pano de algodão houve maior crescimento bacteriano.

A presença de matéria orgânica (albumina sérica bovina simulando sujidades de uma agroindústria) diminuiu a eficácia da atividade antibacteriana do filtrado de quefir.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, N. J.; MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 182 p.

ANDRADE, N. J.; PINTO, C.L.O. **Higienização na indústria de alimentos**. Viçosa: Centro de Produções Técnicas, 1999. 96 p.

AVANCINI, C. A. M. **Desinfecção em saúde e produção animal: bacteriostasia e bactericidia de *Bacharis trimera* (Less.) D.C. – *Compositae* – (carqueja), frente a microrganismos entéricos e cutâneos**. 1995.101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

BALLARINI, G. **O leite e a vida – um grande alimento na história do homem**. São Paulo: Parmalat, 1994. p. 64-80.

BAIRD-PARKER, A.C. Ácidos orgânicos. In ICMSF. **International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Ecologia microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. v.1 cap. 7. p. 132-142.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do leite**. São Paulo: Nobel, 1980. 320 p.

BESSEMS, E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 177-183, 1998.

BEZERRA, A. B.; BOARI, C. D.; OLIVEIRA, M. N. ; ZANCANARO JR. O. Kefir x iogurte: uma comparação sensorial. **Indústria de laticínios**, São Paulo, 1999. p. 64-66.

BIER, O. G. **Microbiologia e imunologia**. São Paulo: Melhoramentos, 1990. 1.234 p.

BLASCO, M. **Kefir un yogur para rejuvenecer**. Barcelona: Oceano, 1999. 87 p.

BLOCK, S.S. Definition of terms In: **Desinfection, sterilization and preservation**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. cap. 2, p.838-839.

BLOOMFIELD, S.F.; LOONEY, E. Evaluation of the repeatability and reproducibility of european suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants and antiseptics. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 87-93, 1992.

BOARD, R.G. **Introducion a la microbiologia moderna de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1988. 272 p.

BRASIL. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria do Estado da Saúde. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3 ed. [São Paulo: Instituto Adolfo Lutz], 1985. 533 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 15 de 23 de agosto de 1988. Produtos Saneantes Domissanitários. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 30 ago.1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, **Divisão de Normas Técnicas**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Brasília, 1997, 160 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento, Secretaria de Defesa Agropecuária. Regulamento técnico de identidade e qualidade de queijos. Portaria nº 146 de 7 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 de março de 1996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 7 de 2 de janeiro de 2001 – Ácido Lático (INS 270). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF., 8 de janeiro de 2001.

CAMARGO, R. Microorganismos em Alimentos. In: **Biotecnologia - tópicos de microbiologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v. 2, cap. 6, p. 113-125..

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie, Grundzüge biologisch-medizinischer statistik**. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1974. 212 p.

CEN – EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION – /TC 216. **Market, enviroment and objetives of CEN/TC 216**. BTC 305/1999. Disponível em: <[http:// www.cenorm.be](http://www.cenorm.be)>. Acesso em: 15 ago 1999.

CORLETT, JR., D.A.; BROWN, M.H. pH y acidez In ICMSF. International Comission on Microbiological Specications for Foods. **Ecologia microbiana de los alimentos**. Zargoza: Acribia, 1980. v.1, cap. 5, p. 97-117.

DE ANGELES, R. C. **Fome oculta – impacto para a população do Brasil**. São Paulo: Atheneu, 1999. 236 p.

DE VRESE, M.; KELLER, B.; BARTH, C. A. Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial Beta-Galactosidase (EC3.2.1.23) of kefir. **British Journal of Nutrition**, Cambridge. v.67, p. 67-75, 1992.

DEUTSCHE VETERINARMEDIZINESCHE GESELLSCHAFT (DVG) [Sociedade Alemã de Medicina Veterinária]. **Richtlinien zur Prüfung Chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin** [Normas para os testes de desinfetantes químicos destinados à Medicina Veterinária]. Giessen, Alemanha Ocidental, 1977. p. 47-55. Mimeografado. Tradução: Prof. Dr. José Maria Wiest

FERREIRA, C. L. L.F. **Revista Leite e derivados**, São Paulo, v. 8, n. 44, 1999. Edição especial- catálogo Brasileiro de Produtos e Serviços, 7.

FISCHLER, C. **História da alimentação**. São Paulo: Estação Liberdade, 1998. cap. 47, p. 843-844.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D.G.de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 182 p.

FRAZIER, W. C. ; WESTHOFF, D.C. **Microbiología de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 681 p.

GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Inhibitory power of kefir: the role of organic acids. **Journal of Food Protection**, v. 63. n. 3. p. 364-369, 2000.

GUERREIRO, M.G. et al. Desinfecção e desinfetantes. In: WIEST, J.M. **Bacteriologia especial**. Porto Alegre: Sulina, 1984. cap. 5, p.51-52.

HÄFLIGER, M.; SPILLMANN, H.; PUHAN, Z. Kefir-ein faszinierendes Sauermilchprodukt. **Deutsche Molkerei-Zeitung-Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft, Kempten**. vol.13. p 370-375. 1991.

HOBBS, B.C.; GILBERT, R. J. Esterilización y Desinfección. In **Higiene y toxicología de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, p. 267-269. 1978.

HORWITZ, W. **Official method of analysis of the Association of Analytical Chemists**. 13 ed. Washington, D.C.: AOAC, 1980.

HURST, A. Antibióticos en los alimentos. In ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. v.1, cap. 9, p.170-171.

JAY, J. **Modern food microbiology**. New York: Nostraud Reinhold, 1978. 491 p.

JEAN LEDERER. A conservação dos alimentos In: **ENCICLOPÉDIA moderna de higiene alimentar; tecnologia e higiene alimentar**. São Paulo: Manole dois, 1991. Tomo 3, cap. 4, p. 27.

KLUPSCH, H.J. **Saure Milcherzeugnisse, Milchgetränke und Desserts**. Verlag Th. Mann. D-4650 Gelsenkirchen-Buer. p.115-133. 1992.

LEITÃO, M. F. F. Avaliação da atividade germicida e desempenho de desinfetantes usados na indústria de alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v. 18, n.1, p. 1-16, jan./mar. 1984.

LEWIS, K.H. Limpieza , desinfección e higiene In ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Ecología microbiana de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. v.1, cap. 14, p. 242-271.

LIFEWAY FOODS INC. **Kefir**. Chicago, 1997. Disponível em: <<http://kefir.com>> Acesso em 7 set.1997.

LIFEWAY FOODS INC. **Kefir**. Chicago, 2002. Disponível em <<http://kefir.com>> Acesso em: 5 jun. 2002.

LONGRÉE, K.; BLAKER, G.G. **Técnicas sanitarias en el manejo de los alimentos**. Argentina: Pax-méxico, 1971. 101 p.

LUCHESE, R. H.; MARTINS, J.F.P.; SANT'ANNA, A.G. Conservação de produtos cárneos tipo salsicha pela utilização de nisina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., 1998, Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998. p. 862-865.

MANCILHA, I. M.; SILVA S. S. Aproveitamento de resíduos agro-industriais: ácido láctico, uma alternativa. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.25, n.1, p. 37-40, 1991.

MEANEY, B.; RYAN, M.; FLYNN, J.; HILL, C.; ROSS, P. Mastitis control without antibiotics? **Farm and Food**, v. 7, n. 2, p.23-25, 1997.

MELLO, R.; TERRA, N. N. Ácidos ascórbico e láctico na conservação de carcaças de frango refrigeradas. **Higiene Alimentar**, v. 8, n 34, p. 39-41, 1994.

MICHELI, L.; UCCELLETTI, D.; PALLESCHI, C.; CRESCENZI, V. Isolation and characterization of a ropy Lactobacillus strain producing the exopolysaccharide kefiran. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 1, p. 69-74, 1999.

MORENO, I.; LERAYER, A.L.; VIALTA, A.; SOUZA, G. Características gerais de bacteriocinas de bactérias lácticas. **Indústria de Laticínios**, v 5, n. 29, p. 57-60, 2000.

MORGAN, S. M.; HICKEY, R.; ROSS, R.P.; HILL, C. Efficient method for the detection of microbially-produced antibacterial substances from food systems. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 1, p. 56-62, 2000.

NAIDU, A.S.; BIDLACK, W.R.; CLEMENS, R.A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n.1, p. 13-126, 1999.

O INTOLERÁVEL leite. **Galileu**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 128, p. 51, 2002.

OLIVEIRA, C. **Dicionário mor da língua portuguesa**. São Paulo: Livro' Mor, 1973. v. 4, p.1844.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1980. v. 1, 566 p.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Mc Graw-Hill do Brasil, 1981. v. 2, p. 959.

PRESCOTT, S. C. **Microbiologia industrial**. Madrid: Aguilar, p. 116- 142, 1962.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 269-272, 1998.

RIBEIRO, P.; MIZUTA, K. Ação do ácido láctico na descontaminação de carcaças de animais de corte. **Higiene Alimentar**, v. 8, n 34, p. 33-35, 1994.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 127-149, 1988.

SANTOS DOS, W. L. M.; SOUZA DE R. M.; RIBEIRO, R. M. P. Bacteriocinas: definição e características. **Higiene Alimentar**, v. 8, n 34. p. 21-23, 1994.

SHAMA, S. de F.M.S. **Características higiênico sanitárias e contaminação fecal-experimental de amostras de quefir tradicional**.1998. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

SILVA JÚNIOR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 1995, 385 p.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J. L. E. Quefir e sua tecnologia – aspectos gerais. **Boletim ITAL**, Campinas, v. 21, n. 2, p.137-155, 1984.

TAMINE, A.Y. Probiotics Fermented Milks- A Critical Review. IN: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 18. 2002, Porto Alegre. **Anais**. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002. p. 1-5.

TRIGO, V.C. A sanificação. In: **MANUAL** prático de higiene e sanidade nas unidades de alimentação e nutrição. São Paulo: Varela, 1999. p.47.

VILHARVA, R. Ácido láctico na descontaminação de carcaça. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, p.26-28, 2001.

WALSTRA, P.; JENNESS, R. **Química y física lactológica**. Zaragoza: Acribia, 1987. 423 p.

WIEST, J.M.; BERGMANN, G.P.; CASTAGNINO, L.H. Quefir tradicional: das montanhas do Cáucaso aos dias atuais. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.63, p. 15-19, 1999.

ZUBILLAGA, M.; WEILL, R.; POSTAIRE, E.; GOLDMAN, C.; CARO, R.; BOCCIO, J. Efeito de probióticos e alimentos funcionais e seus usos em diferentes doenças. **Nutricion – Research**, v. 21, n. 3, p. 569-579, 2001.

ANEXOS

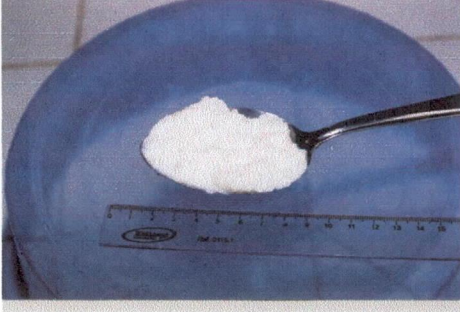


Fig. 01 Grãos de quefir

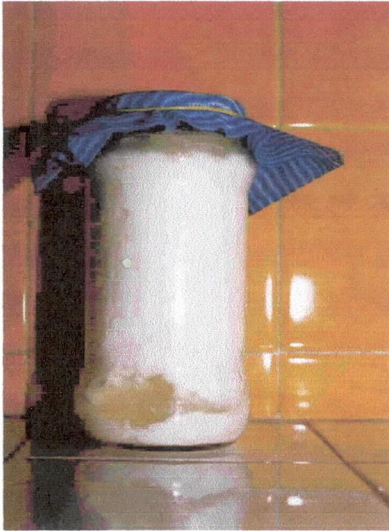


Fig. 02 Incubação por 144 Horas

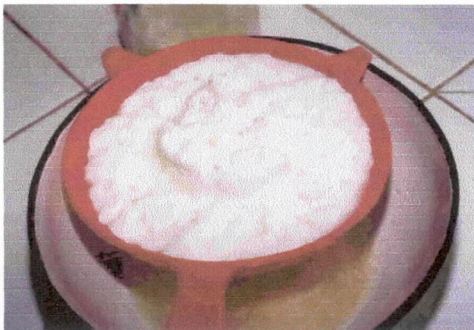


Fig. 03 Recuperação dos grãos