



Análise da TOXICIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS EM CÉLULAS DE HEPATOMA E MELANOMA

Isabela de Camargo Stecca, João Carlos Facin Rodrigues Braz e Profa. Luciana Cristina Nowacki

1 Introdução

O kefir é um produto fermentado de leite originado na cordilheira do Cáucaso, e o seu consumo foi disseminado pela Europa, pelo Canadá e nos últimos anos pelo Brasil. O seu consumo foi associado com efeitos benéficos à saúde como antimicrobiais, antitumorais, imunológicos hipocolesterômicos e antivirais (Bergmann, 2010).

A fermentação do leite é feita por uma associação simbiótica de fungos e bactérias, sendo estes principalmente *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Acetobacter* *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* e *Kluyveromyces marxianus*. Entre eles identifica-se o gênero *Lactobacillus* como o de maior importância (Hamida, 2021).

O problema abordado foi o hábito desenvolvido atualmente para criação de kefir, o qual é feito de maneira deveras artesanal. Um indivíduo coleta um grão de cultura de kefir com outro indivíduo que já o possui, não passando por nenhum processo de controle de verificação ou controle de qualidade a nível industrial principalmente voltado à ausência de microrganismos patogênicos (Miguel, 2009). Foram identificados como objetivos então a identificação da viabilidade e da vida de prateleira do kefir, para assim viabilizar o seu uso comercial encapsulado como probiótico.

2 Materiais e Métodos

Foi obtido um grão de kefir o qual foi acrescentado em leite UHT e o teve trocado a cada semana. Com a obtenção de uma quantidade suficiente de kefir após a repetição deste processo algumas vezes foram iniciados os testes.

Foram feitos testes de microscopia ótica para a identificação visual dos organismos que compunham a amostra obtida, seguidos de testes de coloração de gram para a visualização das bactérias envolvidas na amostra. Foi feita a inoculação em meio YPG e MRS e o seu resultado foi observado em microscopia novamente após coloração de gram (Carneiro, 2010; Zarinati, 2012).

Ensaio de liofilização com o kefir foram efetuados, utilizando diferentes meios para a sua crioproteção e para a retomada, sendo estes o próprio leite utilizado para a amostra, leite UHT estéril, e soluções aquosas de glicose e sacarose ambas a 10% (Golowczyc, 2010; Papapostolou, 2008; Chen, 2006)

A liofilização foi feita com o uso do Liofilizador da própria universidade, localizado no laboratório 113 do bloco C por um período de 48 horas, seguida de transferência para ambiente refrigerado a 4 °C.

A partir da transferência as amostras foram separadas em grupos, em triplicata, para os testes de retomada de crescimento do kefir, grupos de 1 semana de armazenamento, 2 semanas de armazenamento, 1 mês de armazenamento, 3 meses de armazenamento, 6 meses de armazenamento e grupos de inoculação imediata (controle). As amostras foram suspendidas em alíquotas de 2mL de água à temperatura ambiente e misturadas com o uso de agitador vortex por 5 minutos. Em seguida foram incubadas em ágar MRS, e postas em incubadora a 37°C por 48 horas (Papapostolou, 2008).

Os resultados serão analisados com o software GraphPrisma, com os valores das repetições e tratamentos analisados pela análise de variância (ANOVA) e para as diferenças entre os valores obtidos por teste de Tukey, com nível de significância definida como $p < 0,05$.

3 Resultados e Discussão

No meio YPG foi observada a presença de cocus gram positivos e de bacilos gram negativos, os quais também foram observados no meio MRS, condizendo com o material encontrado na literatura, e foi observado crescimento de 146 colônias quando feita a inoculação do kefir diretamente em meio MRS, comprovando a presença do gênero *Lactobacillus* no material obtido, e estabelecendo um total a ser esperado deste microrganismo nas próximas etapas.

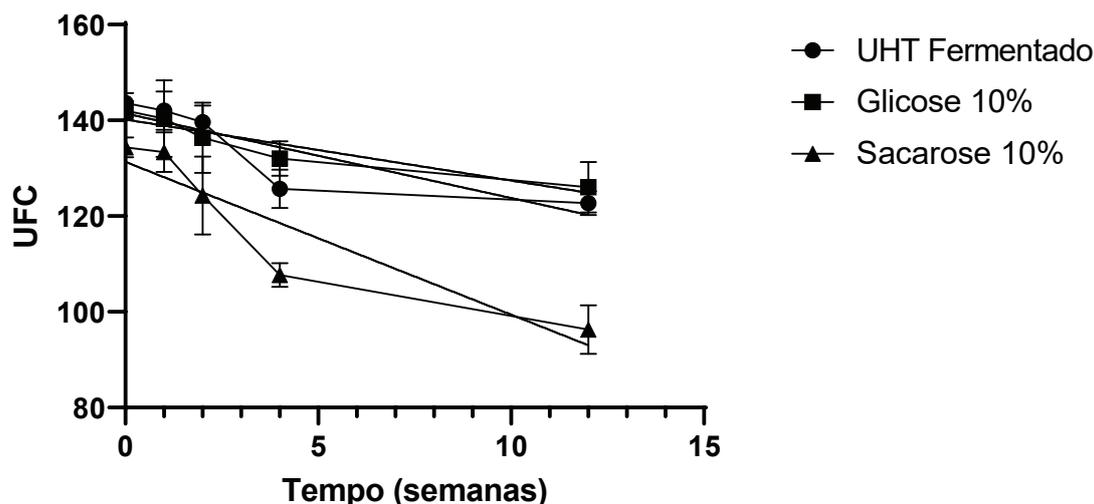
Quadro 1: Valores em Unidades Formadoras de Colônias de *Lactobacillus* para cada repetição e meio crioprotetor utilizado

Tempo (semanas)	UHT Fermentado (UFC)			Glicose 10% (UFC)			Sacarose 10% (UFC)		
0	146	143	142	142	144	140	135	136	132
1	146	142	138	148	132	141	132	130	138
2	140	136	143	139	142	128	130	128	115
4	125	130	122	133	128	135	110	105	108
12	125	120	123	130	128	120	102	95	92

O leite estéril não mostrou nenhum crescimento no teste inicial de retomada, enquanto os demais meios demonstraram crescimento de *Lactobacillus* (descrito no quadro 1) com as médias de 143, 142, 139, 125 e 122 UFC para as alíquotas liofilizadas em UHT fermentado; 142, 140, 136, 132 e 126 UFC para as alíquotas liofilizadas em glicose 10%; 134, 133, 124, 107 e 96 UFC para as alíquotas liofilizadas em sacarose 10% (valores respectivos para 0 dias, 1 semana, 2 semanas, 1 mês e 3 meses). De acordo com Papapostolou (2008) estes valores são considerados normais para este microrganismo.



Gráfico 1: Disposição da quantidade de UFC de cada meio crioprotetor ao longo do tempo decorrido em semanas.



Em análise estatística todos valores obtidos foram determinados como relevantes com $p < 0,05$. Foi observada queda no total de unidades formadoras de colônias em todos os meios crioprotetores, no entanto a queda observada no meio de sacarose a 10% foi mais intensa que todas as demais (gráfico 1).

Identifica-se até então que o crescimento tanto antes quanto depois da liofilização foi dos mesmos microrganismos, mas a sua quantidade foi extremamente reduzida. Pode-se identificar que com o armazenamento em meio frio o kefir pode ser encapsulado e vendido, tendo até então a vida de prateleira máxima de 3 meses, se utilizando o meio crioprotetor de glicose ou leite UHT fermentado

Conclusão

A partir do decorrido pode-se verificar a capacidade de armazenamento de grãos de kefir liofilizados por até três meses, viabilizando interesses de produção e distribuição deste probiótico em escala industrial, considerando necessária somente a manutenção do ambiente em pelo menos 4°C.

Referências

BERGMANN, Rafaela Strada de Oliveira et al. Perfil microbiológico de preparações de uma amostra de quefir: grãos in natura, liofilizado e suspensão fermentada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [online]. 2010, vol.30, n.4, pp.1022-1026. ISSN 0101-2061.



Carneiro, Raphaella P.; Desenvolvimento para uma cultura iniciadora de kefir. Faculdade de farmácia UFMG, Belo Horizonte, MG, 2010

Chen H-C, Lin C-W, Chen M-J. The Effects of Freeze Drying and Rehydration on Survival of Microorganisms in Kefir. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* [Internet]. 2005 Dec 6;19(1):126–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2006.126>

Golowczyc MA, Gerez CL, Silva J, Abraham AG, De Antoni GL, Teixeira P. Survival of spray-dried *Lactobacillus kefir* is affected by different protectants and storage conditions. *Biotechnol Lett.* 2011 Apr;33(4):681-6. doi: 10.1007/s10529-010-0491-6. Epub 2010 Dec 8. PMID: 21140192.

Hamida RS, Shami A, Ali MA, Almohawes ZN, Mohammed AE, Bin-Meferij MM. Kefir: A protective dietary supplementation against viral infection. *Biomed Pharmacother.* 2021 Jan;133:110974. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110974. Epub 2020 Nov 11. PMID: 33186795; PMCID: PMC7655491.

Miguel, Maria Gabriela da Cruz Pedrozo. Identificação de microrganismos isolados de grão de kefir de leite e de água de diferentes localidades. Universidade Federal de Lavras, UFL, Minas gerais-MG, 2009

Papapostolou, H., Bosnea, L., Koutinas, A. and Kanellaki, M., 2008. Fermentation efficiency of thermally dried kefir. [online] Available at: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852408000515>> [Accessed 25 November 2019].

Zarinati, Débora Ferreira. Caracterização de bactérias lácticas da microbiota do grão de kefir cultivado em leite ou água com açúcar mascavo por metodologias dependentes e independentes de cultivo. Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, Minas Gerais-MG, 2012.