

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO SORO DE KEFIR ESTÉRIL FRENTE À *Escherichia coli*

Kely Tatianne Costa Santana¹, Joanes Pereira Andrade Júnior², Matheus Dias Carvalho², Maximiliano Soares Pinto³

¹Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Graduanda em Engenharia de Alimentos

²Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Graduando em Engenharia de Alimentos

³Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Professor Associado
E-mail: kelytcs@gmail.com

RESUMO – O kefir é uma bebida fermentada por uma cultura simbiótica presente em uma matriz de polissacarídeos, que é constituída principalmente por microrganismos do tipo *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacter* e leveduras, vem sendo alvo de pesquisas quanto à sua capacidade antimicrobiana sobre diversos microrganismos patogênicos. Sabendo-se da elevada patogenicidade da *E. coli*, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a concentração inibitória mínima de soro de kefir sobre tal bactéria. Os resultados obtidos indicam que para as concentrações testadas, o soro de kefir não apresentou atividade inibitória, sendo preciso a análise de outras concentrações ou sobre outros microrganismos. Concluiu-se que a Concentração inibitória mínima do soro de kefir não se encontra dentre as testadas no presente trabalho.

ABSTRACT – Kefir is a drink fermented by a symbiotic culture present in a polysaccharides' matrix, which is constituted mainly by microorganisms of the type *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacter* and yeasts, it has been the subject of Researchs, regards its antimicrobial capacity on various pathogenic microorganisms. Knowing the high pathogenicity of *E. coli*, the present study aims to evaluate the Minimal Inhibitory Concentration of kefir serum on such bacteria. The obtained results indicate that at the concentrations tested, the kefir serum did not present inhibitory activity, being necessary the analysis of other concentrations or on other microorganisms. It is concluded that the Minimal Inhibitory Concentration of kefir serum is not any of the ones tested in the present work.

INTRODUÇÃO

Leite fermentado pode ser definido como o produto obtido a partir da fermentação do leite por culturas lácteas próprias, incluindo-se o leite cultivado, leite acidófilo, coalhada, *kefir*

e demais (BRASIL, 2000). Dentre tais, o *kefir* é um leite fermentado que possui certa acidez, levemente alcoólico, ligeiramente efervescente e espumoso.

O *kefir* é obtido artesanalmente a partir de grãos que contêm uma população relativamente estável de microrganismos simbióticos, que muitas vezes sofre influência da região geográfica de origem, do tempo de utilização, do substrato utilizado para proliferação dos grãos e das técnicas utilizadas no cultivo, uma vez que os grãos são encontrados imersos em uma matriz composta de polissacarídeos e proteínas (ABRAHAM & DE ANTONI, 1999; WITTHUHN *et al.*, 2004; WSZOLEK *et al.*, 2001)

Segundo Santos (2008), a principal característica do *kefir* é a presença de uma microbiota diversificada, mantida pela matriz de polissacarídeos, proteínas e gorduras que formam os seus grãos. Ainda, de acordo com Garrote *et al.*, (2001) e Chen *et al.*, (2008), a maior parte da população da microbiota do *kefir* é formada por *Lactobacillus*, além de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Acetobacter* e leveduras.

Muitas espécies de *Lactobacillus* são capazes de produzir uma variada gama de substâncias, que podem ser inibidoras para outras bactérias. Tais substâncias incluem: compostos antimicrobianos, como ácidos orgânicos, dióxido de carbono, etanol, polissacarídeos e bacteriocinas, que apresentam potencial no controle de patógenos (MESSES; DE VUYST, 2002).

Um microrganismo potencialmente patogênico largamente difundido na natureza *Escherichia coli*, bactéria gram-negativa, aeróbia facultativa, que tem como principal *habitat* o trato intestinal de animais de sangue quente, vem merecendo crescente atenção epidemiológica, considerando os riscos para os humanos a ela expostos, dentre os quais pode-se destacar infecções intra-abdominais, infecção do trato urinário, podendo disseminar-se para os rins, ou ainda para a próstata, meningite neonatal e doenças gastrointestinais que são as mais frequentes (ACHA, ZYFRES, 2003; KOHLER, DOBRINDT, 2011; WESCHENFELDER *et al.*, 2009).

Tendo em vista que pode haver uma diferenciação entre cada kefir de acordo as referências acima citadas e o elevado grau de patogenicidade da *E. coli*, faz-se necessário o presente trabalho, que teve como objetivo avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) do soro de *kefir* com pH corrigido e esterilizado em filtro de membrana, frente à *Escherichia coli*.

MÉTODOS E TÉCNICAS

O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, campus Montes Claros. O kefir utilizado é cultivado em leite e oriundo do Laboratório de Produtos Lácteos da mesma instituição, adquirido por doação. A cultura de *E. coli* utilizada foi isolada no Laboratório de Microbiologia da instituição, de esponjas e passaram por testes bioquímicos e microbiológicos de identificação.

Preparo do soro

Primeiramente foi realizada a fermentação do leite por grãos de Kefir por um período de 24h à temperatura ambiente, em seguida os grãos foram coados e o permeado foi resfriado à 5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) por aproximadamente 12h. Foi feita uma nova filtração em papel filtro por gravidade para separação do soro presente na bebida láctea. O soro passou por uma correção de pH com uso de Solução de Hidróxido de Sódio 10%, de um pH de 2,88 à 6,37 eliminando assim a possível inibição dos patógenos devido a ácido do meio.

A etapa de esterilização dos soros ocorreu em capela de exaustão através do uso de filtro de membrana estéril (PES) para seringa descartável com porosidade 0,22 micrometros da Marca

Kasvi K-18230. Após a esterilização os soros foram reservados para preparo determinação da CIM.

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

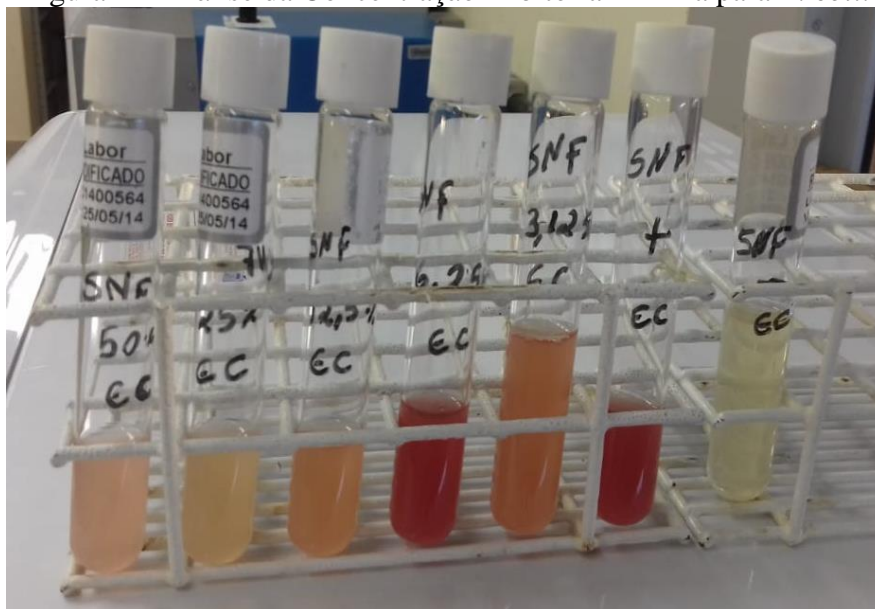
A determinação da concentração mínima é avaliada através da determinação da quantidade mínima da substância necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste (OSTROSKY, 2008). A análise foi realizada como descrito em NCCLS (2003) com o método de macrodiluição em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI).

Para a CMI, foram produzidas diluições subsequentes, contendo 2,5 mL de soro de kefir e 2,5 mL do caldo BHI, obtendo-se as concentrações finais de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125% de soro em 5 tubos. Em seguida foi inoculado 12 µL da suspensão de *E. coli*, previamente ativada. O controle positivo foi realizado com acréscimo de 12 µL da suspensão direta do microrganismo e o controle negativo foi avaliado em tubos sem o acréscimo de microrganismo, apenas com o soro de kefir e BHI. Todos os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas em Estufa Bacteriológica (BOD). Após esse período foi avaliado o crescimento microbiano, com auxílio de 125 µL do Cloreto de Tetrafeniltetrazólico (TTC), que indica a multiplicação celular, apresentando coloração avermelhada na presença de células viáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 representa o Teste CIM realizado para *E. coli*. Uma vez que os 5 primeiros tubos diferiram do controle negativo devido sua coloração rósea, conclui-se que não houve inibição do crescimento de *E. coli* pelas concentrações testadas: 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12% de soro de kefir *in natura*.

Figura 1 - Análise da Concentração inibitória mínima para *E. coli*.



Legenda: Da Esquerda para a direita as concentrações de soro nos tubos são de 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,125%, o sexto e sétimo tubos são, respectivamente, o controle positivo e negativo. **Fonte:** Próprio autor.

Diferentemente dos resultados obtidos por Weschenfelder, Wiest, Carvalho (2009), que constataram uma capacidade de inibição de soro de kefir sobre *E. coli*, o presente estudo não constatou pela análise da CIM uma concentração que inibisse o crescimento de tal microrganismo em BHI. Tais resultados podem ser justificados por questões como o tipo e as

técnicas de manipulação dos grãos de kefir, a duração do processo fermentativo que influencia na produção de diversos metabólitos que podem ser os responsáveis pela atividade inibitória e pela composição microbiana do soro empregado.

Caetano e Montanhini (2014) por outro lado, avaliaram a inibição de *E. coli* através da fermentação do kefir em leite artificialmente contaminado pelo patógeno, e constataram que a fermentação do kefir não inibiu a atividade da bactéria contaminadora, sendo fundamental o uso de um substrato livre de contaminantes e que seja produzido em um ambiente com boas condições de higiene.

Como ressalta Weschenfelder, Wiest, Carvalho (2009), os diferentes resultados obtidos nos trabalhos realizados à respeito da atividade antibacteriana do kefir justificam-se pelas diferentes técnicas de manipulação e padronização das amostras, bem como ao tipo de substrato utilizado para proliferação dos grãos, assim como a origem dos mesmos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as concentrações de soro de kefir testadas sobre *E. coli* não promoveram a inibição da mesma, tais resultados podem ser justificados pela baixa concentração de substâncias inibitórias, geradas durante o processo fermentativo, além de outras variáveis como a composição dos grãos, origem e cultivo dos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Characterization of kefir grains grow in cow's milk and soya milk. **Journal of Dairy Research**, v. 66, n. 2, p. 327-333, 1999. Disponível em: <journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=11539>. Acesso em: 09 de jul. 2018.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis and communicable diseases common to men and animals: bacteriosis and mycosis. 3 ed. Washington: **World Health Organization. Cientifical and Technical Publication** n. 580. 2003, 398p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução n.05, de 13 de novembro de 2000. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Diário Oficial da União, Brasília, 27 Nov. 2000. Seção I, p. 9-12. Disponível em: <extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=3285>. Acesso em 09 jul. 2018.

CHEN, H.C.; WANG, S.Y.; CHEN, M.J. Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture independent methods. **Food Microbiology**, v. 25, p. 492-501, 2008. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002008000208>. Acesso em: 09 jul. 2018.

DIAS, P.A.; SILVA, D.T.; TEJADA, T.S.; LEAL, M.C.G.; CONCEIÇÃO, R.C.S.; TIMM, C.D. Survival of pathogenic microorganisms in kefir. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 177-181, 2012. Disponível em: <revista.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=27&func=fileinfo &id=797>. Acesso em: 26 jun. 2018.

GARROTE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L. Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. **Journal of Dairy Research**, v. 68, p. 639-652, 2001.

Disponível em: <[http:// www.radioprotection.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=100585](http://www.radioprotection.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=100585)>. Acesso em: 28 dez. 2012. doi: 10.1017/ S0022029901005210.

KOHLER, C.D. & DOBRINDT, U. What defines extraintestinal pathogenic Escherichia coli? **International Journal of Medical Microbiology**, v.301, p.642–647, 2011.

MESSES, W.; DE VUYST, L. Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs - a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 31-43, 2002. Disponível em: <[www.sciencedirect.com/science/article/pii/ S0168160501006110](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160501006110)>. Acesso em: 24 jun. 2018.

NCCLS. **NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 6 ed. Pennsylvania, 2003.

OSTROSKY, E. A., et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(2): 301-307, Abr./Jun. 2008

SANTOS, J. P. V. **Avaliação da microbiota de grãos de kefir e atividade inibidora da bebida sobre algumas bactérias patogênicas**. 88f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

WESCHENFELDER, S.; WIEST, M.J.; CARVALHO, H.H.C. Atividade antiEscherichia coli em Kefir e soro de Kefir tradicionais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Viçosa, MG. Vol.64, n. 368, p.48-55, 2009

WITTHUHN, R.C.; SCHOEMAN, T.; BRITZ, T.J. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 383-389, 2005. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694604002134>. Acesso em: 09 de jul. 2018.

WSZOLEK, M., TAMIME, A. Y., MUIR, D. D., BARCLAY, M. N. Properties of kefir made in Scotland and Poland using Bovine, Caprine and Ovine Milk with different Starter Cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 34, p. 251-261, 2001. Disponível em: <www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380190773X>. Acesso em: 09 de jul. 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos Laboratórios de Biotecnologia do Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais - FAPEMG e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.