

# DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) DO SORO DE KEFIR ESTÉRIL SOBRE *Pseudomonas aeruginosa*

ANDRADE JUNIOR JP<sup>1\*</sup>, SANTANA KTC<sup>1</sup>, CARVALHO MD<sup>1</sup>, PINTO MS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Graduando(a) em Engenharia de Alimentos

<sup>2</sup> Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias, Professor Associado  
\*E-mail para contato: joanesandrade@outlook.com

**RESUMO** – *O kefir é um produto da fermentação, normalmente do leite, por grãos de kefir. Tais grãos são formados principalmente por Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Acetobacter e leveduras, que tem um crescimento simbiótico. Os Lactobacillus tem revelado grande potencial para controle biológico de patógenos, devido aos metabólitos produzidos durante o processo fermentativo. Sabe-se que o kefir sofre variações em sua constituição microbiana em função do local de origem, tempo de cultivo e condições do processo fermentativo. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade inibitória de soro de kefir estéril frente à Pseudomonas aeruginosa. Os resultados obtidos indicam as concentrações de soro de kefir in natura testadas: 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 3,12% não desencadearam a inibição da P. aeruginosa, apesar de muitos trabalhos revelarem um resultado diferente do apresentado, isso justifica-se na dificuldade de padronização do processo em virtude das diversas variações que o kefir pode apresentar.*

*Palavras-chave: susceptibilidade, fermentação, inibição, leite fermentado*

## DETERMINATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF STERILE KEFIR SERUM ABOUT *Pseudomonas aeruginosa*

**ABSTRACT** – *Kefir is a product of fermentation, usually of milk, by kefir grains. Lactobacillus has revealed great potential for biological control of pathogens due to the metabolites produced during the fermentation process. Thus, the present work aimed to evaluate the inhibitory activity of sterile kefir serum against Pseudomonas aeruginosa. The results indicate that the concentrations of in natura kefir serum in the tested samples: 50%, 25%, 12.5%, 6.25% and 3.12% did not trigger inhibition of P. aeruginosa, although many studies revealed a different result from the one presented, this is justified in the difficulty of standardization of the process due to the different variations that kefir can present.*

*Key-words: susceptibility, fermentation, inhibition, fermented milk*

## 1. INTRODUÇÃO

Kefir é um leite fermentado, ácido, levemente alcoólico, produzido artesanalmente a partir de grãos que contêm uma população relativamente estável de microrganismos simbióticos, constituído principalmente por bactérias ácido-lácticas, ácido-acéticas e leveduras, imersos em uma matriz de polissacarídeos e proteínas (Leite *et al.*, 2013).

Por ser um produto artesanal, é comum a variação entre os tipos de kefir produzidos, em função da origem dos grãos, formas de cultivo, período de fermentação e população de microrganismos que o constitui (Leite *et al.*, 2013). Os microrganismos predominantes são na maior parte *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Acetobacter* e leveduras (Garrote *et al.*, 2001)

As bactérias lácticas presentes neste alimento despertam grande interesse na indústria devido ao seu potencial de utilização no biocontrole de microrganismos patogênicos. Algumas espécies exercem atividade inibitória frente a outras bactérias, devido a competição direta por nutrientes ou pela produção de compostos com efeitos antagônicos, tais como ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (Hansen, 2002).

Presente no meio ambiente, *Pseudomonas aeruginosa* é um ubiqüitário da água e solo, sendo reconhecido como pertencente à microbiota normal da superfície de plantas, pele do homem e animais, porém sua relevância está em seu papel como patógeno oportunista, ocasionando infecções quando da redução dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Maia, 2009).

A *P. aeruginosa* ao ter acesso a sítios corporais normalmente estéreis pode provocar infecções deste o trato urinário ao sistema respiratório, sítios cirúrgicos, queimaduras graves, dermatites, estando algumas vezes associado com casos de meningite, endocardite, episódios de diarreia e septicemia; quadros clínicos também observados em diferentes espécies animais, especialmente sob condições de *stress* (Algun *et al.*, 2004).

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

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

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 patogênica utilizada, *P. aeruginosa* (ATCC 27853), foi adquirida na forma liofilizada e reativada em BHI.

### 2.1. 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.

## 2.2. 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. 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 seriadas, 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 3,12 % de soro em 5 tubos. Em seguida foi inoculado 12  $\mu\text{L}$  da suspensão de *P. aeruginosa*, previamente ativada. O controle positivo foi realizado com acréscimo de 12  $\mu\text{L}$  da suspensão direta do micro-organismo 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  $\mu\text{L}$  do Cloreto de Tetrafeniltetrazólico (TTC), que indica a multiplicação celular, apresentando coloração avermelhada na presença de células viáveis.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

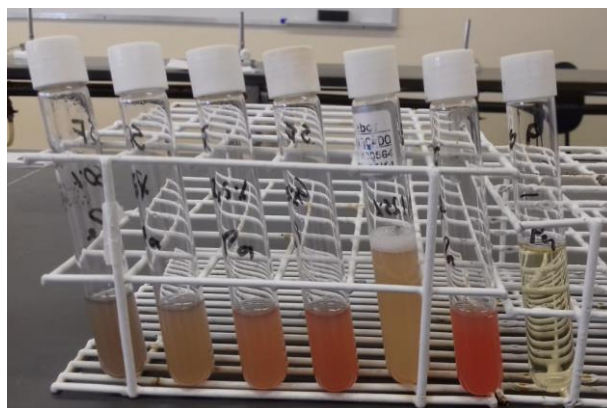


Figura 1 - Análise da Concentração Inibitória Mínima para *P.aeruginosa*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Ryan *et al.*, (appud Garrote *et al.*, 2001, p. 364) que não apresentou inibição de *P. aeruginosa* por kefir e outros microrganismos. Por outro lado, Rodrigues *et al.*, (2005) em estudos realizados com kefir proveniente de Alfenas, Minas Gerais, Brasil, revelou atividade antimicrobiana frente à *P. aeruginosa*. Assim como um trabalho realizado por Rahimzadeh *et al.*, (2011), que também relata atividade bacteriostática e bactericida de kefir sobre o mesmo microrganismo.

Segundo Weschenfelder *et al.* (2009), as bactérias ácido-lácticas presentes nos grãos de kefir produzem bacteriocinas, substâncias com propriedades antimicrobianas, que podem inibir tanto bactérias Gram-positivas quanto bactérias Gram-negativas. Já Martins *et al.* (2012), atribui o efeito antibacteriano do kefir à presença desses microrganismos probióticos, que por meio de competição impedem a colonização de bactérias patogênicas no meio.

Como ressalta Weschenfelder *et al.* (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 e a origem dos mesmos, que pode influenciar na dosagem da substância antimicrobiana no extrato testado.

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que as concentrações de soro de kefir testadas sobre *P.aeruginosa* não promoveram a inibição da mesma, tais resultados podem ser justificados pela dificuldade de padronização do processo fermentativo e diversas variações da composição dos grãos, além da origem e cultivo dos mesmos.

#### 5. REFERÊNCIAS

- ALGUN U, ARISOY A, GUNDUZ T, OZBAKKALOGLU B, The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics. *Indian J. Med. Microbi.*, v. 22, n. 2, p. 112-114, 2004.
- GARROTE GL, ABRAHAM AG, ANTONI GL, Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. Dairy Res.*, v. 68, p. 639-652, 2001 Disponível em: <<http://www.radioprotection.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=100585>>. Acesso em: 28 dez. 2012.
- HANSEN EB, Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *Int. J. Food Microbiol.* 2002.
- LEITE AMO, LEITE DC, ÁGUILA EM, ALVARES TS, PEIXOTO RS, MIGUEL MA, SILVA JT, PASCHOALIN MV, Características microbiológicas e químicas do kefir brasileiro durante processos de fermentação e armazenamento. *J. Dairy Sci.*, v. 96, p. 4149 – 4159, 2013.
- MAIA AA, CASTISANI ML, ESPOSTO EM, SILVA WCP, RODRIGUES ECP, RODRIGUES DP, LÁZARO NS, Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas*



*aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. *Ciênc. e Tecnol. Aliment.* vol.29 no.1. Campinas. Jan/Mar. 2009.

MARTINS, F.L.J; MARINHO, E., FIRMINO, H.H., RAFAEL, C.V.; FERREIRA, L.F.C.L. Avaliação da adição do Kefir em dieta hospitalar. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*. v 67, n.386, 2012.

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

RAHIMZADEH G, BAHAR M, MOZAFARI AN, SALEHI M, Antimicrobial activity Kefir on *Pseudomonas aeruginosa*. *Razi J. Med. Sci.* 2011.

RODRIGUES KL, CAPUTO LRG, CARVALHO JCT, EVANGELHISTA J, SCHNEEDORF JM, Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *Int. J. Antimicrobial.* v.25, May 2005.

WESCHENFELDER S, WIEST JM, CARVALHO HHC, Atividade anti-escherichia coli em kefir e soro de kefir tradicionais. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, v. 64, n. 368, p. 48-55, 2009.